



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2008년 8월

석사학위논문

어린 개 대뇌 겉질 손상에 따른

뇌실아래부위 재구축

Reconstruction of subventricular cytoarchitecture
after traumatic brain injury in young dog

조선대학교 대학원

의 학 과

김 경 주

어린 개 대뇌 겹질 손상에 따른 뇌실아래부위
재구축

Reconstruction of subventricular cytoarchitecture
after traumatic brain injury in young dog

2008 년 8 월 일

조 선 대 학 교 대 학 원
의 학 과
김 경 주

어린 개 대뇌겉질 손상에 따른 뇌실아래부위 재구축

지 도 교 수 장 인 엽

이 논문을 의학석사학위신청 논문으로 제출함.

2008 년 4 월 일

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

김 경 주

김 경 주의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 유 호진 인

위원 조선대학교 교수 전 제열 인

위원 조선대학교 교수 장 인엽 인

2008 년 6 월 일

조선대학교대학원

목 차

도 목 차	-----6
영 문 초 록	-----7
서 론	-----8
재 료 및 방 법	-----11
결 과	-----13
고 찰	-----15
결 론	-----21
참 고 문 헌	-----22
사 진 부 도 설 명	-----26
사 진 부 도	-----27

도 목 차

Fig. 1 - Number of immunoreactive cells -----27

Fig. 2 - Immunohistochemistry I-----28

Fig. 3 - Immunohistochemistry II-----29

Fig. 4 - Immunohistochemistry III-----29

Reconstruction of subventricular cytoarchitecture after traumatic brain injury in young dog

Kyung-ju Kim

Advisor : In-Youb Chang, MD. Ph.D.
Department of Medicine,
Graduate School of Chosun University

It has been argued that cerebral cortical neurons are either supplemented or renewable both in the normal and the injured condition by way of continuous neurogenesis throughout life. In this paper, we examined the possibility of neurogenesis in unweaned canine. The immunohistochemical method was done using BrdU as a marker for DNA replication, nestin for immature neuronal marker, and calretinin for mature neuronal marker.

Traumatic brain injury(TBI) was induced by unilateral cortical ablation, and we observed that BrdU immunoreactive cells were markedly increased, (maximum increase was about 4 fold compared to control at 8h after TBI) in ipsilateral ependyma, subventricular zone and perilesional area upto 7days after TBI. BrdU(+)/nestin(+) double-immunoreactive cells were observed in the majority cells of ependyma and subventricular zone at 8h and 24h after TBI, but hardly in perilesional cortex. Their morphologies were similar to astrocytes, not conventional neurons. Changes of calretinin-immunoreactive cortical neurons were transitorily observed with numerous dendritic arborization in perilesional area.

These results suggested that the renewal of cells has been made in cerebral cortex after brain injury, but almost not neuronal. Transient cellular proliferation of some indicators-expressed cells after TBI may effect on neurological recovery events.

I. 서론

포유동물 중추신경계는 신경세포발생이 가능한 일정 시기 동안 뇌실 근처 신경상피세포에서 새롭게 만들어지고, 그 이후에는 발생이 더 이상 이루어지지 않는 것으로 알려져 왔다. 발생시기 이후에 뇌결질의 신경세포들은 숫적으로 안정성을 보이고, 통상적으로는 재생이 불가능한 것으로 오랫동안 알려져 왔다. 대뇌결질 신경세포의 숫자의 안정성은 수명이 다할 때까지 지속적인 학습과 기억을 가능하게 하는 것으로 추측된다(Rakic, 1985). 물론 포유동물 뿐만 아니라 사람의 뇌는 나이가 들에 따라 일정하게 뇌 중량 감소를 보이고 60 세 이후에는 더욱 급격하게 감소를 초래하게 된다(Esiri, 2007). 육안적으로 중량과 용적의 감소, 뇌실 크기 증가, 뇌 고랑(sulcus) 확대, 현미경적으로 신경세포체의 감소, 형태 이상, DNA 복구능력 변화, 시냅스 밀도 등의 감소등이 소견이 나타난다(Morrison and Hof, 1997; Raz and Rodrigue, 2006). 한편 신경재생현상(neurogenesis)과 아교세포재생현상(gliogenesis)이 어른의 중추신경계에서도 가능하다는 주장이 제기되고 있다. 뇌실 주변의 신경상피세포들은 출생 전에 뇌실막세포(ependymal cells)로 분화되는 반면, 뇌실아래부위(subventricular zone)는 여러세포로 분화가능성이 있는 전구세포(multipotent progenitor cells)를 출생 이후에도 지속적으로 함유하고 있다는 이론이다(Garcia-Verdugo et al, 1998). 따라서 뇌실막과 뇌실아래부위에 분화능력을 가진 세포들이 존재한다는 것인데, 이들은 태생학적 줄기세포의 일부로 생각되고, 신경세포와 신경아교세포를 만들어 낼 수 있을 것으로 사료되고 있다 (Tonchev et al, 2003).

내인성 신경 전구체가 생체에서 유도되고 분화되어 투사능력을 소실한 특정 부위 신경세포를 분화시킨다는 가능성도 제시 되고 있다(Magavi et al, 2000; Jin et al, 2003). 최근 보고에 따르면 뇌 손상부위에 골수에서 추출한 줄기세포를 이식하면 증상이 호전된다는 보고들로 보아 뇌손상에 따른 신경재생은 국소적 뿐만 아니라 전신

적으로 이루어져 손상부위로 신경세포로 분화 가능한 세포들이 이주해 올 가능성도 있다고 여겨지고 있다(Ye et al, 2007; Liu et al, 2008). 병적상태가 진행되면 어른 뇌에서도 신경세포재생과 신경아교세포의 재생이 이루어지지만, 새로 생긴 세포의 운명, 즉 신경세포와 신경아교세포 중 어떤 세포로 분화 할 것인가에 대한 것, 그리고 이들의 정확한 기능은 아직 자세히 밝혀져 있지 않은 실정이다(Jin et al, 2003; Floyd and Lyeth, 2007; Laird et al, 2008).

외상성 뇌손상(traumatic brain injury: TBI)은 어린이나 성인에 있어서 후천적으로 뇌손상 중 가장 흔한 형태이다(Levin, 1998). TBI 에 따른 죽음과 관련된 일련의 과정 뿐만 아니라, 기능적 회복을 위한 작업도 수행되어진다. 손상 후 1 일 부터 수 주 사이에 걸쳐 이런 반응이 일어나지만, 특히 손상 후 6 일 까지가 가장 중요한 시기로 여겨지고 있다(Buytaert et al, 2001; Floyd and Lyeth, 2007). 이러한 과정 중 신경세포의 재생 및 보호에 별아교세포의 역할이 특히 강조되는 것이 최근의 새로운 관심사로 등장하였다(Floyd and Lyeth, 2007; Laird et al, 2008). 기능적 회복은 여러 인자에 의해 조절되지만 특히 연령, 손상 후 시간 경과, 손상의 크기 정도 등이 관련이 깊은 것으로 여겨지고 있다. 궁극적인 회복정도는 손상 후 나타나는 일련의 신경 반응(post-injury neural response cascade)에 달려있다. 이러한 반응은 신경세포의 죽음, 교세포의 활성화, 신경성장의 상승, 신경가지돌기의 증식, 새로운 신경 연결의 형성 등으로 일어나는 것이 알려지고 있다(Buytaert et al, 2001). 이러한 과정에 더욱 복잡하게 세포 또는 조직의 환경을 변화시킴에 따라 촉진 또는 억제시키는 현상에 대한 연구가 아울러 활발하게 진행되고 있는 중이다(Bake and Sohrabji, 2004; Chen et al, 2007; 2008 ; Lu, 2008)

뇌손상 후 나타나는 반응 중 신경세포의 재생에 대한 손상의 복구는 매우 중요한 점으로 남아있다. 이런 관점을 조사하기 위한 실험 방법으로는 타이미딘(thymidine) 계열인 bromodeoxyuridine (BrdU)를 이용한 세포분열의 DNA 복제 유무를 알아내는

방법(Doetsch et al, 1999; Johansson et al. 1999; Li et al, 2002), 제 VI 형 중간미세 섬유 단백질(class type VI of intermediate filament protein)인 nestin 을 미성숙 신경 세포의 표지자로 사용하는 방법(Schmidt-Kastner and Humpel, 2002), 칼슘결합단백질을 성숙 신경세포 표지자로 사용하는 방법(Li et al, 2002; Brandt et al, 2003) 등이 널리 이용되고 있다.

내인성 줄기세포들이 대뇌겉질 손상에 따라, 이런 손상을 복구할 수 있는 적절한 세포들을 만들어낼 수 있는지?, 또는 이러한 세포들이 기능적인 회복을 도모할 수 있는지에 대한 많은 궁금증들이 남아있는 실정이다. 지금까지의 연구들은 설치류 등 하등 포유동물에 대한 것이 주류를 이루고 있는 실정이며, 고등동물에서도 이러한 재생과정이 일어나는가에 대한 사실은 거의 알려져 있지 않은 실정이다. 따라서 본 실험에서는 포유동물 중 고등동물에 속하는 개를 대상으로 뇌손상을 가한 후 뇌실막 또는 뇌실막아래구역(subventricular zone) 세포에서 세포재생 과정이 발생하는지, 즉 다가능성 줄기세포와 유사한 성질의 세포(multipotent stem cell-like characteristics) 들이 출현하는 지를 알아보려고 한다

II. 실험재료 및 방법

2.1. 동물과 동물처치

재래종 개 12 마리를 사용하였는데, 연령은 출생 후 2 주 이내를 암수 구분없이 사용하였다. 케타민(3ml/kg)으로 마취한 후 Kernie(2001) 등이 시술한 방법을 약간 변형하여 수술하였는데 간략히 소개하면 다음과 같다. 고정기에 개 머리를 고정시키고, 두개피부를 정중으로 절개하고, 연부조직을 절한 다음, 정중선에서 2mm 바깥위치에서 5x10 mm 크기로 두개골을 절제한 다음, 대뇌겉질 손상을 가하였다. 3mm 일회용 수술용 칼날을 이용하여 1.5-2mm 깊이로 손상을 가한 후, 두개골을 다시 덮고, 두피를 봉합하여 회복시켰다. 대조 수술(sham operation)은 동일 방법으로 마취하고 대뇌겉질 손상없이 두개골 절개를 실시하였다.

TBI 후 시간에 따른 증식세포들의 발현을 조사하기 위하여, 실험군과 대조수술군 모두 0.9% NaCl 용액에 녹인 BrdU (Sigma, 100mg/kg)를 희생시키기 3 시간 전에 복강내 주사하였다. BrdU 면역염색을 위해서는 1N Hcl(60° C, 30min)을 반응시킨 다음 염색하였다.

2.2. 조직처리

수술 후 8 시간, 1 일, 3 일, 7 일, 14 일에 각각 2 마리씩 희생시켰으며, 대조수술을 시행한 개 각각 1 마리씩 사용 시켰다.

동물을 ether 로 마취시킨 다음, 심장을 통하여 0.9% NaCl 용액을 관류시키고, Zamboni 고정액으로 관류고정을 실시하였다. 30 분 후 뇌를 적출하여 5mm 두께로 조각낸 후 동일 고정액에서 24 시간 동안 고정시킨 후 30% sucrose 용액에서 24-48 시간 동안 탈수시켜 냉동에 따른 조직 손상을 방지하였다. 냉동절편기로 30- μ m 두께로 관상절편을 얻어 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 증류수, 인산완충액(phosphate buffered saline: PBS) 으로 구성된 보관용액에 넣어 냉장고에 저장하였다가 염색에 이용하였다(glycerol, ethylene glycol, distilled water, 0.05 M PBS, 3:3:3:1 volume ratio, pH 7.3-7.4).

2.3. 면역조직형광염색

표본을 PBS 로 세척한 후 0.3% Triton X-100 으로 20 분간 처리하고 다시 PBS 로 세척하였다. 비특이적 결합을 억제하기 위해 10% normal horse serum(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)에 1 시간 동안 실온 상태에서 반응시켰다. 일차 항체의 반응은 4℃에서 48 시간 동안 동안 반응시켰다. 일차항체로는 sheep anti-BrdU (Fitzerald, Ma, USA; diluted 1:1000), mouse anti-Nestin (BD Biosciences, USA; diluted 1:200), rabbit anti-calretinin (Sigma; diluted 1:500), mouse anti-calbindin(Sigma; diluted 1:500) 항체를 사용하였다. PBS 로 씻어낸 다음 발색제로는 Alexa Fluor 488(anti-rabbit and anti-mouse 1:100, Molecular probe, Eugene, OR, USA)와 Alexa Fluor 555(for BrdU, 1:100, Molecular probe, Eugene, OR, USA)를 이용했다. 이차 항체를 배양한 다음 조직을 2-3 시간 동안 세척한 다음 습윤 봉입을 하였다. 음성대조군은 일차항체 대신 인산염완충식염수를 사용하였다.

2.4. 이중형광염색

BrdU 와 nestin 에 동시에 염색되는 증식성 신경세포가 존재하는지 알아보기 위하여 조직의 일반적인 처리는 상기 기술된 면역형광염색과 동일하였고, 차이점은 두 가지 일차항체의 혼합물과 두 가지 이차항체의 혼합물을 사용하였다는 점 만 차이가 있다

2.5. 다초점 레이저 현미경적 영상(Confocal laser microscopic imaging)

형광으로 염색된 조직 슬라이드는 다초점 레이저 현미경(LSM 510, Zeiss, German)을 이용하여 검경하였는데, 흥분파장은 488nm 와 555nm 를 각각 현미경 영상 프로그램으로 사진을 얻었다.

2.6. 면역양성세포들의 계수

각각의 면역양성세포들은 1mm² 당 세포숫자로 표시하였으며, 3 회이상 무작위 부위를 선정하여 계수하여 평균치를 구하였다.

III. 결 과

A. BrdU 면역염색반응

DNA 복제의 표지자로서 BrdU 면역염색을 사용하였다. 대조군 어린 개 대뇌겉질, 뇌실막세포층, 뇌실아래구역에서 적은 수의 BrdU 면역염색 양성세포를 관찰할 수 있었으며, 대뇌겉질 손상군(traumatic brain injury: *TBI)은 대조군에 비교하여 BrdU 면역염색 양성세포들의 숫자가 확연히 증가됨을 관찰할 수 있었다(**Fig. 1A**). BrdU 면역염색반응은 뇌실막세포층의 1-3 열에 걸쳐 관찰되었으며, 뇌실 아래구역(subventricular zone)에서도 관찰되었다(**Fig. 2 B,E,H,K**). 이러한 현상은 특히 대뇌겉질 병변부위쪽 뇌실막세포층, 뇌실아래구역에서 8 시간과 24 시간 실험군에서 급속히 증가하여 대조군에 비해 400%까지 증가하였는데, 1 주일 실험군까지 지속적으로 관찰되었다(**Fig. 1-2**). 뇌실막세포층의 변화도 크게 나타났는데, 가장 뚜렷한 것은 뇌실막세포층의 다층화된 과형성(multilayered hyperplasia)이 나타나고, 뇌실막 바닥층과 뇌실아래구역사이 경계 부위에서 집중적으로 BrdU 면역염색 양성세포들이 출현한 점이다(**Fig. 2 B,E,H,K**). 대뇌겉질 병변구역의 BrdU 양성세포들의 출현은 뇌실막세포층에서 보여준 변화에 비해 상대적으로 적게 관찰되었다(**Fig. 3I,L**).

B. Nestin

미성숙 신경세포 표지자로 nestin 면역염색반응을 사용하였다. 대조군에서는 적은 수의 nestin 면역염색반응양성이 대조군수술을 시행한 대뇌겉질과 가쪽뇌실아래부위에서 관찰되었다(**Fig. 2C, 3H**). 병변인접부위 대뇌겉질에서 nestin 면역염색반응이 나타났는데, 형태학적으로 피라미드 모양을 가지는 것으로 관찰되었다. 가쪽뇌실세포층, 가쪽뇌실아래부위, 뇌량부위에서 nestin 에 염색되는 세포들을 관찰할 수 있었다(**Fig. 2-B, E**). nestin 양성염색을 보이는 세포들이 대뇌겉질 손상 후 8 시간 실험군, 특히 뇌실아래부위와 뇌실막 바닥층에서 급속히 증가하기 시작하여, 24 시간, 3 일, 7 일 실험군에서 차차 감소하는 양상을 보였다(**Fig. 2**). 가쪽뇌실아래부위 깊은구역과 병변주변 대뇌겉

질에서 나타나는 nestin 양성세포들은 세포체돌기가 발달되지 않은 형태이거나, 형태학적으로 GFAP-양성 별아교세포의 모양과 유사하였다. (Fig. 3A-C,C',F).

C. BrdU/nestin 이중염색

새로 증식된 신경세포들(BrdU 양성)이 과연 신경세포로 전환되는 가 알아보기 위하여 미성숙 신경세포 표지자인 nestin 과 이중염색을 실시하였다. BrdU/nestin 이중양성세포들이 뇌실세포층과 뇌실아래구역에서 증가함이 관찰되었고, 병변주변의 일부에서 관찰되었다(Fig. 3A-C,C',D-M). 뇌실세포층 과다형성에 비례하여 BrdU/nestin 이중양성세포들이 뇌실세포층 바닥부위와 뇌실아래구역의 경계부에서 가장 뚜렷하게 증가하였다 (Fig. 1,2). 이런 염색세포들은 손상 8 시간에 가장 많은 발현을 보였고, 7 일까지 차차 감소하는 양상을 보였지만 대조군에 비해서는 높은 수준을 유지하였다. 3 일 이후 뇌실아래구역 깊은 부위와 병변주변에서 나타나는 BrdU/nestin 이중양성세포들은 매우 낮은 수준이었으며, nestin 양성세포들의 모양은 별아교세포 양상이었다(Fig. 3A-C,C').

D. Calretinin

성숙 신경세포의 표지자로 calretinin 면역염색반응을 사용하였다. 대조군 수술을 시행한 어린 개의 calretinin 면역염색반응은 대뇌겉질의 모든 층에 걸쳐 관찰되었지만, II-III 층에서 집중적으로 관찰되었다. 미세형태학적 소견은 축삭의 끝이 갈라진 (bitufted) 형태로, 가지돌기들이 수직 방향으로 퍼져 나가고, 가지돌기들의 폭이 좁고 길이도 작은 형태들을 보였다(Fig. 4E). 대뇌겉질 손상군 병변부위와 그 인접부위에서 calretinin 면역염색반응은 현저하게 증가하였는데, 병변후 1-3 일 실험군의 II-III 층의 신경세포에서 주로 관찰되었는데, 이러한 현상은 손상 1 주일 후까지 지속되었다(Fig. 4A-C). 대조군에 비교하여 볼 때 대뇌겉질 손상군에서의 calretinin 면역염색 양성세포들의 가지돌기들이 퍼져나가는 현상(dendritic arborization)이 증가됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 4D-E).

IV. 고 안

고등동물 중 하나인 개에서 뇌손상에 따른 출생 후 뇌의 재생에 대해 알아 본 결과, 미성숙 신경세포 표지자로 사용된 nestin 면역염색반응은 대뇌겉질에서 대뇌손상 8 시간부터 증가하여 차차 감소하는 양상을 보였으며, 성숙 신경세포의 표지자로 calretinin 면역염색반응은 손상 후 7 일까지 대뇌겉질에서 증가하였다. 모든 손상군에서 병변주위에 나타난 BrdU 양성세포들의 숫자는 뇌실아래구역에 비교하여 볼 때 매우 적었으며, 뇌실아래구역 깊은 부위나 병변 주변 형태는 신경세포보다는 신경교세포에 가까운 형태였다. 하지만 뇌손상에 따라 뇌실막과형성이 초래되었고, nestin 염색반응과 BrdU 염색반응 모두 나타내는 세포들(BrdU(+)/nestin(+))도 다수 관찰되었다.

외상성 뇌손상(TBI)에 따른 대뇌겉질의 반응을 보기 위하여 nestin 을 사용하였는데, 중등도 미세섬유 표지자인 nestin 은 시험관 전구세포, 발생 과정 중 뇌와 척수의 신경전구세포 또는 미성숙 신경세포, 별아교세포들에서 발현되는데, 그 기능은 신경세포의 이동 및 신경교세포의 세포골격 안정성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Lendahl et al, 1990; Schmidt-Kastner and Humpel, 2002; Kronenberg et al, 2007). 성장이 끝난 성숙 신경조직의 특정부위, 즉 줄기세포 함유부위로 추정되는 뇌 일부분에서는 발현되지만, 통상적으로 성숙한 신경세포에서는 발현되지 않는 것으로 알려져 있다(McKay, 1997). 병적인 상태에서 혈관과 별아교세포 사이의 연결이 손상되었을 때 이를 회복시키는데 nestin 이 중요한 역할을 하는 것으로 추정되고 있다 (McKay, 1997; Sergent-Tanguy et al, 2006). 이러한 보고들은 본 실험 결과 TBI 유도 에 의한 어린 개 뇌에서 뇌실아래구역과 뇌실막세포층에서의 nestin 양성세포증식을 확인한 내용과 일치하였다.

뇌 신경교세포의 nestin 발현 증가가 효과적으로 발생할 가능성이 높다는 것은 신경교세포가 미성숙상태로 쉽게 전환되는 반응을 보인다는 가설과 관련이 있는 것으로

사료된다(Schmidt-Kastner and Humpel, 2002). 신경 발생 초기 또는 성숙 개체에서의 신경재생이 일어나는 짧은 시간 동안 nestin 발현을 나타내는 초기 신경세포 형태가 관찰되기는 하지만, 실제로 체내에서 모든 줄기세포 또는 신경전구세포들이 nestin을 발현하는 지에 대한 사실은 여전히 잘 밝혀져 있지 않은 실정이고, 좀 더 확실한 증거가 필요한 실정이다(Fillippov et al, 2003). 본 실험에서 대조군에서도 nestin 양성 세포들이 존재하고 이들 가운데 BrdU 양성을 보이는 몇몇 세포들이 있었던 것은 아직 분화가 진행되고 있지만, 본 실험 결과에 영향을 미칠 정도는 아니라고 사료된다.

배양중 신경교세포가 신경세포로 전환될 수 있다는 가설도 제시되었다. 흰쥐 신경 별아교세포 제 1형(type 1 astrocytes)를 배양하여 nestin 양성을 보이는 세포들을 추출한 다음, bFGF 와 EGF 를 첨가하여 다시 배양하면 Tuj1-양성세포, GFAP-양성세포, A2B5-양성세포 들로 분화한다는 결과를 바탕으로 특정 조건에 따라서는 별아교세포 또는 신경세포로 분화될 수도 있다는 가능성을 제시하였다(Itoh et al, 2006). 또한 nestin(+)/GFAP(-), nestin(+)/GFAP(+) 신경교세포들 중 10% 해당하는 nestin(+)/GFAP(-)세포들은 nestin(+)/GFAP(+) 신경교세포들에 비하여 훨씬 증가된 분화활성도를 보일 뿐만 아니라, 신경줄기세포의 성질을 여전히 가지고 있어 별아교세포 또는 신경세포로 모두 분화가 가능한 세포로 추정된다는 보고도 있다(Sergent-Tanguy et al, 2006). 중추신경계가 손상되면 자연스런 복구가 안되는 이유는 생체에서 신경재생과 축삭의 재구축이 잘 이루어지지 않기 때문이다. 따라서 본 실험에서 대뇌겉질에서 nestin 양성세포들 감소한 결과도 이런 이유에서 기원한 것으로 추정된다. 이런 이유로 중추신경계 병변 치료를 위한 골수에서 채취한 중간엽세포 이식이 한층 흥미를 일으키는 이유가 되었지만, 이런 이식의 치료효과를 기대하기 위해서는 중간엽세포가 신경세포로 얼마나 분화되어가는 가를 확실하게 밝힌 다음에 시도해야 한다는 주장이 제기되었다. 즉 세포이식이 신경분화의 유발을 초래하는 대신 신경교세포로의 분화를 촉진한다는 것이다(Wislet-Gendebien et al, 2004). 따라서 근거없는 줄기세포 이식은 병변부위를 비롯하여 환자의 중추신경계에 아직 남아있는 신경세포들에 해로운 영향을 미칠 수 있어, 더욱 병의 진행을 악화시킬 수도 있다는 조심스런

판단이다. 중간엽세포에서 발현하는 사이토카인들은 LIF, CNTF, BMP2, BMP4 인데, 신경아교세포로의 분화촉진은 BMP4 에 의해서 이루어지는 것으로 알려지고 있다 (Wislet-Gendebien et al, 2004). 이러한 상황은 트롬빈이 분열촉진효과(mitogenic effect)를 통하여 별모양 신경교세포의 신경전구세포 표지자인 nestin 발현을 유도하는 기능을 수행하고, 골수 중간엽줄기세포에서는 반대로 nestin 발현을 억제한다는 것 과도 관련이 있어 세심한 검증이 필요로 할 것으로 보인다(Wautier et al, 2007).

또 신경세포로 분화되는 가소성을 보이는 종류는 골수 기질세포와 별모양 신경교세포로 알려지고 있다. 골수 중간엽줄기세포는 뼈, 연골, 지방세포들로 분화할 뿐만 아니라 비중간엽세포인 신경세포로도 분화가 가능한 것으로 알려지고 있다(Wislet-Gendebien et al, 2005). 또한 생쥐 중간엽세포에서 신경세포가 분화된다는 다른 보고는 nestin 양성 중간엽세포들 가운데 특정 조건하에서 신경표지자로 알려진 NF-L (neurofilament-light; neurofilament 70 kDa)과 class III beta-tubulin 의 발현이 나타나고, 여러 자극에 따라 세포질 칼슘이온 농도가 상승하는 등 신경세포 기능을 보인다고 하였다 (Tropel et al, 2006). 또 nestin small interfering RNA(siRNA)는 별아교세포종양 세포의 성장을 억제한다는 최근 보고는 nestin 의 신경조직 분화에 대한 새로운 증거가 될 수 있다(Wei et al, 2008).

따라서 본 실험에서 나타난 뇌 손상 후 뇌실막세포층과 뇌실아래구역의 nestin 양성 반응세포들의 증가는 이러한 신경교세포에 의한 신경재생이 가능할 수도 있다는 기대를 하게 한다. 본 실험에서 미성숙 신경세포 표지자로 사용된 nestin 면역염색반응은 대뇌겉질의 병변주위 피라밋 형태의 신경세포에서 관찰되었고, 성숙 신경세포의 표지자로 calretinin 면역염색반응은 전체 대뇌겉질에서 증가됨이 관찰되었지만, 형태학적으로 이들 두 종류 세포들 사이의 특이한 차이점은 없었다.

본 실험에서 병변 주변과 뇌실아래구역 깊은 부위의 BrdU 양성세포들이 nestine 과 이중으로 염색되는 현상을 관찰하였다. 하지만 그들의 형태는 신경세포보다는 신경교세포에 가까웠고, 염색되는 세포의 숫자도 뇌실에서 멀어질수록 감소되는 양상을

보였다. 이러한 본 실험의 형태학적인 소견은 nestin(+)/GFAP(-)세포들이 nestin(+)/GFAP(+) 신경교세포들에 비하여 높은 분화활성도를 보이고, 신경줄기세포의 성질을 여전히 가지고 있어 별아교세포 또는 신경세포로 모두 분화가 가능한 세포로 추정된다는 보고와도 관련이 있을 것으로 사료된다(Sergent-Tanguy et al, 2006). 본 실험에서는 거기에 대한 조사는 이루어지지 않았지만 향후 조사가 이루어질 예정이다. 본 실험 자체가 포유류 중 고등동물에서 이루어졌다는 고유한 중요성이 있는바 현 시점에서는 이러한 반응을 확인하였다는 것 자체도 중요한 실험결과로 여겨진다.

흥미로운 보고는 같은 종류의 손상을 주어도, 새겔질(neocortex)의 BrdU 양성세포들의 대다수 세포는 별아교세포와 미세아교세포이 표지자에, 그리고 후각망울의 BrdU 양성세포들의 대부분은 신경전구세포 표지자에 염색되는 것이다. 즉 뇌 부위에 따라 손상에 따른 반응이 각기 다른 세포증식, 분화를 보인다는 사실이다(Herrera et al, 1999; Tonchev et al, 2003). 설치류 뇌에서 내인성 신경 줄기세포들이 뇌손상 후 별아교세포로 분화된다고 알려졌지만(Johansson et al, 1999; Kernie et al, 2001), 최근에는 이들 내인성 신경전구세포들이 대뇌겔질 IV 층의 소실된 특정 신경세포를 대체할 수 있다는 주장들이 제기되고 있다(Jin et al, 2003; Magavi et al, 2003). 하지만 이들의 주장은 설치류에서의 결과이고 고등동물 포유류에서는 아직 보고된 바 없고, 본 실험 결과로는 이런 현상은 관찰되지 않았다. 이들 분화된 세포들 중에는 신경아교세포 또는 중간엽 줄기세포에서 유래된 nestin 양성 세포들과 섞여 있을 가능성도 본 실험이나 지금까지 알려진 바로는 이들을 구분하기 힘든 실정이다(Tropel et al, 2006; Wautier et al, 2007). 또 Koketsu 등(2003)은 재생되는 신경세포가 설사 있다 할지라도 극히 적은 수, 즉 대뇌겔질 대부분에서 대략 1-2 개의 신경세포만이 재생된다고 주장하였다. 이러한 주장은 영장류의 신경재생이 비포유류의 재생에 비해 극히 제한적이라는 주장과도 연관이 있는 것으로 사료된다(Rakic, 1985). 또 이들이 신경세포로 분화가 이루어졌다고 해도 병변부위로 이동할수있다는 증거 또는 가능성이 아직까지 알려져 있지 않은 실정이다. 대뇌겔질에서 가끔 발견되는 nestin(+)/BrdU (+) 이중양

성세포들에 대한 가능성을 제시해 보면, 퇴행중인 신경세포, 혈액에서 이동되어 온 줄기세포, 원래 존재하던 신경전구세포, 신경교세포 전구세포 들 중 하나라고 여겨진다 (Jin et al, 2003; Koketsu et al, 2003). 따라서 본 실험에서 증가된 BrdU (+) 양성세포들도 신경교세포증 반응에 해당되리라고 사료된다.

Calretinin 면역염색반응은 주로 대뇌겉질 II-III 층에 주로 분포하며, 발생과정 도중에는 시냅스 형성(synaptogenesis), 축삭 길이성장, 가지돌기 재구성, 신경세포 이주에 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Andressen et al, 1993; Hof et al, 1999). 신경재생과정 동안 일시적으로 calretinin 이 발현되는 것으로 알려져 있는데, 뇌 손상에 따른 일련의 반응으로 분열후 단계 초기(early postmitotic stage)의 과립세포 발생과 이주에 관련 있는 것으로 알려졌다(Li et al, 2002; Brandt et al, 2003). 손상 후 2 일까지 calretinin 양성세포들의 세포고사(apoptosis) 반응이 증가되고, 그 이후 6 주까지 calretinin 의 과발현이 초래된다(Li et al, 2002; Brandt et al, 2003). 이런 과발현의 원인으로 추정되는 것으로는 생존 세포들의 증식이 의해서, 또 하나는 칼슘 증가로 인한 세포고사에 대한 보호작용으로 일어난다는 것이다. 뇌신경질환에 있어서 세포고사를 통한 신경세포 죽음이 매우 중요한 역할을 수행하고, 칼슘결합단백질 중 하나인 calretinin 은 세포내 칼슘농도를 완충시켜 세포고사를 억제시킨다(Wernyi et al, 1999; Hof et al, 1999). 본 실험에서 나타난 뇌손상에 따른 nestin 과 calretinin 발현 증가들은 대부분 신경교세포 형성과 관련되었지만, 일부에서는 신경재생과 연관이 있다는 주장들도 제기되고 있다(Li et al, 2002; Schmidt-Kastner and Humpel, 2002; Brandt et al, 2003). 현재로서는 nestin 은 신경발생의 전구세포 표지자로, calretinin 은 분화가 진행된 세포의 표지자로 여겨지고 있다.

본 실험에서 나타난 뇌손상에 따른 뇌실막세포층과 뇌실아래구역에서 나타난 과형성 반응세포들은 nestin 이나 BrdU 에 양성되었고, 이중염색되는 세포들의 비율은 예비실험으로 흰쥐를 대상으로 한 결과(자료미제공)와 기존 보고들에 비해 매우 높은

편이었다. 뇌손상 후 나타나는 성체 포유동물 BrdU(+) 신경줄기세포들은 뇌실막과 뇌실아래구역(subventricular zone: SVZ)에서 생성된다고 여겨지고 있으며(Doetsch et al, 1999; Li et al, 2002), 어떤 이는 뇌실막세포층이 신경줄기세포의 원천이라고(Johansson et al. 1999), 다른 이는 뇌실아래구역의 세포만이 줄기세포의 성격을 가진다고 보고하였다(Chiasson et al. 1999). BrdU(+) 세포들의 증식은 손상 후 1-2 주 정도 관찰된 다음 4 주경에는 정상적으로 되돌아온다고 알려지고 있는데, 이런 가소성(plasticity)을 조절하는 특수한 입구(window)가 존재할 것으로 여겨지고 있다(Zhang et al, 2001). 하지만 이들 세포들이 일정하게 미성숙 별아교세포 형태를 보이고, 대뇌겔질의 세포들은 존재할 지라도 겔질신경세포로 분화되지 못하는 것으로 여겨지고 있다(Gage, 2000; Laywell et al, 2000; Alonso, 2001; Steindler and Pincus, 2002). 사람에서도 뇌손상을 받으면 손상 1 일부터 수주 동안 눈에 띄게 복구변화가 일어나는데, 이러한 변화는 보통 6 개월이 지나면 평상시와 같게 되돌아 간다(Sbordone et al, 1995; Weidner et al, 2001). 따라서 신경분화에 필요한 성장인자, 주위환경 등이 적절한 시기에 보충되어야 최대의 치료효과를 거둘 수 있을 것으로 여겨진다. 본 실험에서도 보여준 바와 같이 뇌실막과 뇌실아래구역의 세포증식이 뇌손상 회복반응에 관련된 것으로 추정되지만, 이들 세포들의 분화정도, 이주 능력, 이들을 도와주는 성장인자들이 모두다 세포의 생존에 중요한 것으로 여겨진다. 아직 이들이 기능적으로 시냅스를 형성하여 신경세포로서의 활성도를 나타낸다는 보고는 없는 상태이지만, 여러 실험적인 치료 시도에 본 실험에서도 보여준 세포 증식 결과가 기초자료로 이용될 수 있을 것으로 사료된다

V. 결 론

정상 또는 뇌 손상 후 대뇌겉질세포들이 보충되거나, 새로이 생성한다는 주제에 대한 많은 주장들이 제기되어 왔다. 본 실험에서 포유동물 중 고등동물인 개에서도 이러한 재생과정이 일어나는 가를 알아보기 위해 뇌손상을 가한 후 뇌실막 또는 뇌실막아래구역, 손상주변 대뇌겉질에서 조사하였다. bromodeoxyuridine (BrdU)로 DNA 복제 유무를, 미세섬유 단백질 nestin 으로 미성숙 신경세포를, 칼슘결합단백질인 calretinin 으로 성숙 신경세포를 각각 동정하였다. BrdU 양성 신경세포들이 손상쪽 뇌실막 세포층과 뇌실막 아래구역에서 일시적으로 손상 후 수 일 동안 크게 증가함(최고 400% 까지)을 보였다. 이들 부위에서 나타난 BrdU(+)/nestin(+) 이중염색 세포들이 관찰되기는 하였지만, 3 일과 7 일에 뇌실아래구역 깊은 부위에서 관찰된 BrdU(+) 또는 nestin(+) 세포들은 형태학적으로 신경세포와는 완전히 다른 세포, 또는 분화가 잘 이루어지지 않은 세포들이었다. Calretinin 양성세포 가지돌기들의 퍼짐현상이 증가됨이 겉질부위에서 일시적으로 관찰되었다. 이러한 결과들을 바탕으로 뇌 손상 후 나타나는 세포증식들은 신경세포로 성장하기보다는 대부분 신경교세포로 분화되는 것으로 여겨진다. 이러한 반응은 적절한 시기와 알려지지 않은 성장인자들이 관여할 것으로 추측된다.

VI. Reference

- Andressen C, Blumcke I, Celio MR: Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells, *Cell Tissue Res* 271: 181–208. 1993.
- Alonso G: Proliferation of progenitor cells in the adult rat brain correlates with the presence of vimentin-expressing astrocytes, *Glia* 34:253–266. 2001.
- Bake S, Sohrabji F: 17beta-estradiol differentially regulates blood-brain barrier permeability in young and aging female rats. *Endocrinology*. 145(12):5471–5. 2004
- Brandt MD, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G, Reuter K, Bick-Sander A, von der Behrens W, and Kempermann G: Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol. Cell. Neurosci.* 24: 603–613. 2003
- Buytaert KA, Kline AE, Montanez S, Likier E, Millar CJ, Hernandez TD: The temporal patterns of c-Fos and basic fibroblast growth factor expression following a unilateral anteromedial cortex lesion, *Brain Res* 894: 121–130. 2001
- Chen G, Shi J, Ding Y, Yin H, Hang C: Progesterone prevents traumatic brain injury-induced intestinal nuclear factor kappa B activation and proinflammatory cytokines expression in male rats. *Mediators Inflamm.* 2007:93431. 2007
- Chen G, Shi J, Jin W, Wang L, Xie W, Sun J, Hang C: Progesterone Administration Modulates TLRs/NF- κ B Signaling Pathway in Rat Brain after Cortical Contusion. *Ann Clin Lab Sci.* 38(1):65–74. 2008
- Chiasson BJ, Tropepe V, Morshead CM, and van der Kooy D: Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J Neurosci* 19:4462–4471. 1999,
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, and Alvarez-Buylla A: Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain, *Cell* 97:703–716. 1999.
- Esiri MM : Ageing and the brain. *J Pathol.* 211(2):181–7. Review, 2007
- Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang L-P, Yamaguchi M, Kettenmann H, Kempermann G: Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characters of astrocytes, *Mol. Cell Neurosci.* 23:373–382. 2003.

Floyd CL, Lyeth BG :Astroglia: important mediators of traumatic brain injury.Prog Brain Res. 161:61–79. 2007

Gage FH: Mammalian neural stem cells. Science 287: 1433–1438. 2000.

Garcia-Verdugo J, Doetsch F, Wichterle H, Lim DA, and Alvarez-Buylla A: Architecture and cell types of the adult subventricular zone: In search of the stem cells. J Neurobiol 36:234–248. 1998.

Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A: Adult-derived neural precursors transplanted into multiple regions in the adult brain. Ann Neurol 46:867–877. 1999,

Hof PR, Glezer II, Conde F, Flagg RA, Rubin MB, Nimchinsky EA, Vogt Weisenhorn DM: Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns. J Chem. Neuroanat. 16:77–116. 1999.

Itoh T, Satou T, Nishida S, Hashimoto S, Ito H: Cultured rat astrocytes give rise to neural stem cells.. Neurochem Res. 31(11):1381–7. 2006

Jin K, Sun Y, Xie L, Peel A, Mao XO, Bateur S, Greenberg DA: Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum. Mol. Cell Neurosci. 24:171–189. 2003,

Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J: Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system, Cell 96:25–34. 1999.

Kernie SG, Erwin TM, and Parada LF: Brain remodeling due to neuronal and astrocytic proliferation after controlled cortical injury in mice. J Neurosci Res 66:317–326. 2001

Koketsu D, Mikami A, Miyamoto Y, Hisatsune T: Nonrenewal of neurons in the cerebral neocortex of adult macaque monkeys, J Neurosci 23:937–948, 2003.

Kronenberg G, Wang LP, Geraerts M, Babu H, Synowitz M, Vicens P, Lutsch G, Glass R, Yamaguchi M, Baekelandt V, Debyser Z, Kettenmann H, Kempermann G: Local origin and activity-dependent generation of nestin-expressing protoplasmic astrocytes in CA1. Brain Struct Funct. 212(1):19–35, 2007

Laird MD, Vender JR, Dhandapani KM: Opposing roles for reactive astrocytes following traumatic brain injury. Neurosignals 16(2–3):154–64. 2008

Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, Holland EC, Steindler DA: Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. Proc Natl Acad Sci USA. 97: 13883–13888. 2000.

Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RDG: CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein.

Cell 60:585–595. 1990.

Levin HS: Cognitive function outcomes after traumatic brain injury. *Curr Opin Neurol* 11:643–646. 1998,

Li Y, Chen J, and Chopp M: Cell proliferation and differentiation from ependymal, subependymal and choroid plexus cells in response to stroke in rats, *J Neurol Sci* 193:137–146. 2002.

Liu W, Jiang X, Fu X, Cui S, Du M, Cai Y, Xu R: Bone marrow stromal cells can be delivered to the site of traumatic brain injury via intrathecal transplantation in rabbits. *Neurosci Lett* 28:434(2):160–4. 2008

Lu DC: Cerebral salt wasting and elevated brain natriuretic peptide levels after traumatic brain injury: 2 case reports. *Surg Neurol*. 69(3):226–9, 2008.

Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD: Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice, *Nature* 405:951–955. 2000.

McKay R, Stem cells in the central nervous system. *Science* 276:66–71. 1997.

Morrison JH, Hof PR: Life and death of neurons in the aging brain. *Science*. 17:278(5337):412–9. Review. 1997

Rakic P: Limits of neurogenesis in primates. *Science* 227: 1054–1056. 1985.

Raz N, Rodrigue KM: Differential aging of the brain: patterns, cognitive correlates and modifiers. *Neurosci Biobehav Rev*. 30(6):730–48. 2006

Sbordone RJ, Liter JC, Pettler–Jennings P: Recovery of function following severe traumatic brain injury: a retrospective 10–year follow–up, *Brain inj* 9:285–299. 1995.

Schmidt–Kastner R and Humpel C: Nestin expression persists in astrocytes of organotypic slice cultures from rat cortex, *Int J Dev Neurosci* 20:29–38. 2002.

Sergent–Tanguy S, Michel DC, Neveu I, Naveilhan P: Long–lasting coexpression of nestin and glial fibrillary acidic protein in primary cultures of astroglial cells with a major participation of nestin(+)/GFAP(–) cells in cell proliferation. *J Neurosci Res*. 83(8):1515–24. 2006

Steindler DA and Pincus DW: Stem cells and neurogenesis in the adult human brain. *Lancet* 359:1047–1054. 2002.

Tonchev AB, Yamashima T, Zhao L, Okano H: Differential proliferative response in the postischemic hippocampus, temporal cortex, and olfactory bulb of young adult macaque monkeys. *Glia* 42:209–224. 2003.

Tropel P, Platet N, Platel JC, Noël D, Albricux M, Benabid AL, Berger F : Functional neuronal differentiation of

bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 24(12):2868–76. 2006

Wautier F, Wislet-Gendebien S, Chanas G, Rogister B, Leprince P :Regulation of nestin expression by thrombin and cell density in cultures of bone mesenchymal stem cells and radial glial cells. *BMC Neurosci*. 30:8:104, 2007

Wei LC, Shi M, Cao R, Chen LW, Chan YS: Nestin small interfering RNA (siRNA) reduces cell growth in cultured astrocytoma cells.*Brain Res*. 27:1196:103–12, 2008.

Weidner N, Ner A, Salimi N, Tuszynski MH: Spontaneous corticospinal axonal plasticity and functional recovery after adult central nervous system injury, *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:3513–3518. 2001.

Wernyj RP, Mattson MP, Christakos S: Expression of calbindin-D28k in C6 glial cells stabilizes intracellular calcium levels and protects against apoptosis induced by calcium ionophore and amyloid β -peptide. *Mol Brain Res* 64: 69–79. 1999.

Wislet-Gendebien S, Bruyère F, Hans G, Leprince P, Moonen G, Rogister B: Nestin-positive mesenchymal stem cells favour the astroglial lineage in neural progenitors and stem cells by releasing active BMP4. *BMC Neurosci*. 15:5:33, 2004

Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, Rigo JM, Moonen G, Rogister B: Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells*. 23(3):392–402. 2005

Ye M, Wang XJ, Zhang YH, Lu GQ, Liang L, Xu JY, Chen SD: Transplantation of bone marrow stromal cells containing the neurturin gene in rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* 20;1142:206–16. 2007

Zhang RL, Zhang ZG, Zhang L, and Chopp M: Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia, *Neuroscience* 105:33–41. 2001

Explanation of Figures

Fig. 1. Numbers of BrdU- and nestin- immunoreactive cells in the subventricular zone and ependymal layer after brain injury.

Fig. 2. Changes of BrdU- and nestin- immunoreactivity in the subventricular zone after brain injury.

Fig. 3. BrdU-(BrdU-IR) and nestin-immunoreactivity(NT-IR) of canine cerebral cortex after traumatic brain injury. A-C,C',F,G : BrdU- and NT-IR in deep subventricular zone 3days after traumatic brain injury. Note that the morphological features of NT-IR was similar to astrocyte, not neuronal cells. D-E: Perilesional cortex showed increased NT-IR at 3 days(D), and 7days(E) after traumatic brain injury.

Fig. 4. Calretinin-immunoreactivity(CR-IR) of canine cerebral cortex after traumatic brain injury. This shows that perilesional CR-IR was increased at 3days(A), 7days(B-C) and the morphology of cells were characterized by dendritic arborization(D1-D2; E control).

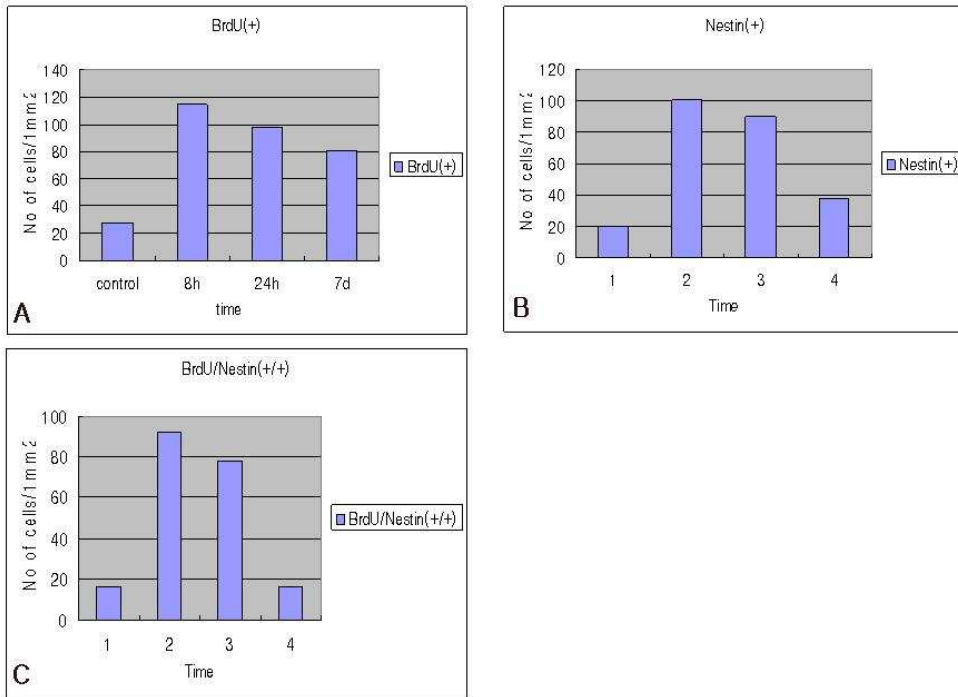


Fig 1. Numbers of BrdU- and nestin- immunoreactive cells in the subventricular zone and ependymal layer after brain injury.

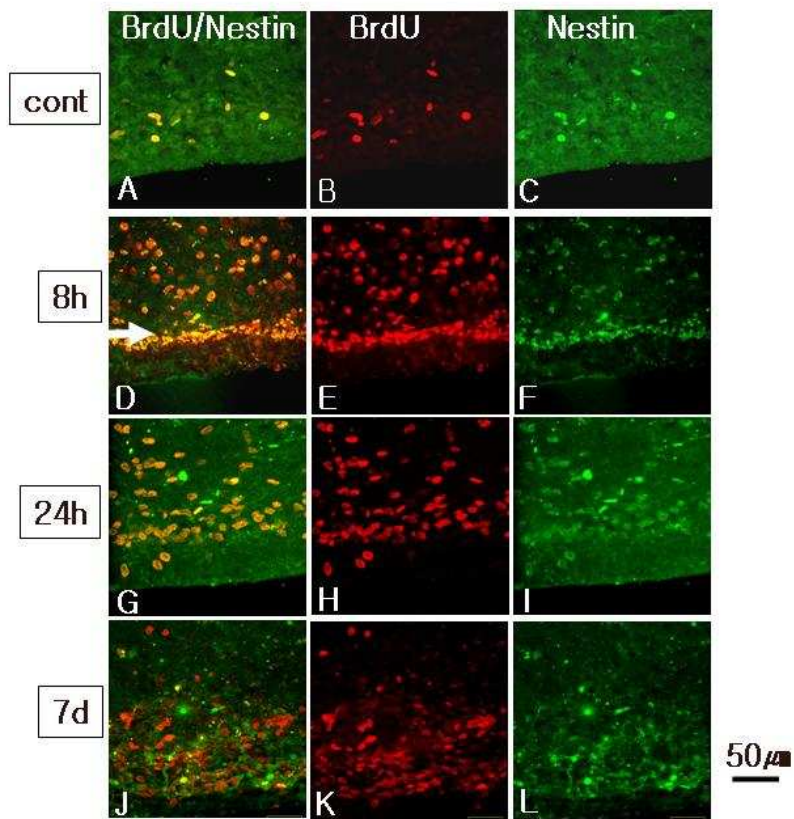


Fig 2. Changes of BrdU- and nestin- immunoreactivity in the subventricular zone after brain injury.

