

랫트 배양 신경교세포의 성장 및 분화에 대한 Cytokine의 효과*

인하대학교 의과대학 마취과학교실¹, 서울대학교 의과대학 약리학교실²

김혜경¹ · 윤용하² · 강신정² · 박찬웅² · 김용식²

= Abstract =

Effect of Cytokines on the Growth and Differentiation of the Glial Cells from Rat Brain in Culture

Hae Kyoung Kim¹, Yong Ha Youn², Shin Chung Kang², Chan Woong Park²
and Yong Sik Kim²

*Department of Anesthesiology, School of Medicine, Inha University¹ and Department of
Pharmacology, School of Medicine, Seoul National University²*

The effects of cytokines on the growth and differentiation of glial cells in culture were evaluated to confirm that cytokines could modify the number and function of glial cells. Proliferation of glial cells was determined by the ³H-thymidine uptake and the double immunostain with anti-cell specific marker and anti-bromodeoxyuridine(BrdU) antibody. To check the effect on the differentiation of glial cells, the amount of glial fibrillar acidic protein(GFAP) and the activity of glutamine synthetase(GS) were measured in astrocytes. And also the amounts of myelin basic protein(MBP) and the activity of 2',3'-cyclic nucleotide phosphohydrolase(CNPase) were measured in oligodendrocytes. Among the cytokines used, only interleukin-1 β (IL-1 β) stimulated the growth of type 1 and type 2 astrocyte as well as O-2A precursor cell. When the functional changes in these glial cells by cytokines were tested, IL-1 β did not increase GFAP content in type 1 and type 2 astrocyte, but IL-1 β increased GS activity in type 1 astrocyte, and slightly decreased this enzyme activity in type 2 astrocyte. Also interleukin-2(IL-2) and interferon- γ (IFN- γ) inhibited the activity of GS in type 1 and type 2 astrocyte.

On the other hand, all cytokines used did not modify the growth and differentiation in oligodendrocytes. From these results we could suggest that IL-1 β increases the growth of type 1 and type 2 astrocyte and also promotes the development for O-2A precursor cell to type 2 astrocyte.

Key Words: Glia, Growth, Differentiation, Cytokine

*이 논문은 한국과학재단 특정기초(91-0500-04-01-3)와 1994년도 인하대학 연구비에 의하여 연구되었음

서 론

중추신경계에서는 astrocyte와 oligodendrocyte, 그리고 말초신경계에서는 schwann cell 등의 신경교세포가 있으며, 이중 oligodendrocyte와 schwann cell은 각각 중추 및 말초신경계에서 수초(myelin sheath)를 형성하여 신경섬유 축색을 감아서 신경세포 활동전위의 전달속도를 높이는 역할을 하며(Bunge, 1968), astrocyte는 혈관-뇌장벽을 이루는데 관여하며 물질의 뇌조직내로의 운반에 기여하고 시냅스에서 방출된 신경전달물질 및 이온을 섭취하거나 제거하며, 교감신경전달물질 및 neuropeptide 등의 여러 신경전달물질의 수용체를 세포막에 갖고 있어 이들 신경전달물질에 의해 효과를 나타낼 수 있고(Murphy and Pearce, 1987), 신경조직의 발생초기에 미성숙 신경세포의 이동과 positioning에 관여하며(Rakic and Goldman-Rakic, 1982), nerve growth factor 이외에도 분자구조가 밝혀지지 않은 수종의 신경세포에 대한 trophic factor를 분비하여 신경세포의 생존과 정상적인 분화에 관여할 수 있다고 보고되고 있다(Dennis-Donini 등, 1984; Diporzio 등, 1980; Heuman 등, 1987; Hunter and Bottenstein, 1989).

그외에도 뇌조직이 손상을 받거나, 뇌질환과 관련되어 손상된 조직 부위에서 손상조직에 대한 직접적인 탐식작용을 나타내며, 또한 손상에 따른 microglia의 활성화로 인해 interleukin을 포함한 수종의 cytokine이 분비되고, astrocyte의 분열 증식이 일어나 궁극적으로 손상조직에 따른 wound healing을 초래한다(Rudge 등, 1989)는 결과들은 cytokine을 통한 면역기전이 신경세포 및 신경교세포의 증식 및 분화 그리고 기능 조절에 관여함을 알 수 있다.

최근 신경교세포의 많은 기능이 보고됨에 따라 이들 세포의 성장과 분화가 연구대상의 하나가 되고 있으며, cytokine도 이들 세포의 성장 또는 분화에 관여할 수 있다는 보고가 있는 바 본 연구에

서는 각각의 신경교세포를 분리 배양하여 cytokine에 의한 이들 세포의 성장과 분화효과를 검토해 봄으로써 궁극적으로 cytokine이 이들 신경교세포의 성장 및 분화 또는 기능조절에 관여할 수 있는지를 알아보았다.

재료 및 방법

1) 재 료

DMEM(Dulbecco's modified Eagle's Medium)은 Gibco제를, 그리고 Glucose, glutamine, 항생제(penicillin G-streptomycin-amphtericin B), trypsin, DNase I, Bromodeoxyuridine(BrdU)와 poly-L-lysine은 sigma제를 사용하였고, Interleukin $I\beta$ (IL- 1β), Interleukin 2(IL-2), Interferon- γ (IFN- γ) 등의 cytokine은 Boeringer Mannheim (B.M)제를, 세포톡이 marker로 rabbit anti-GFAP(glial fibrillar acidic protein)은 Sigma제품, rabbit anti myelin basic protein(MBP)은 Dacopatt, rabbit anti-peripheral myelin과 mouse anti-BrdU는 Monosan제품을 사용하였다. 2차 항체인 goat anti-mouse IgG-Rho, goat anti-rabbit IgG-FITC는 B.M, 3H -thymidine은 NEN, 배양용기는 Falcon 제품을 사용하였다.

2) 방 법

(1) 신생 랫트 대뇌세포의 일차배양: 생후 1~2일된 Sprague-Dawley 랫트를 사용하여, 뇌를 분리하고 Ca^{++} , Mg^{++} 이 들어있지 않은 10 mM phosphate buffered saline(pH 7.4: 이하 D-PBS)에 6 mg/ml glucose가 첨가된 용액에서 대뇌 부위를 절제하고 meninges를 벗겨내고, 1 mm³되게 잘게 썰은 후 D-PBS 용액이 들은 배양용 시험관에 옮겨 상온에서 10분간 방치한 후 상층액을 제거한다. 그후 0.1% trypsin(1: 250)이 함유된 D-PBS 용액으로 대뇌 절편을 부유한 후 37°C에서 30분간 처치한다. 30분 후 trypsin이 들은 용액을 제거하고 10% fetal bovine serum(FBS), 그리고 6 mg/ml glucose, 2 mM glutamine과 50 U/ml

penicillin, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin이 첨가된 Eagle's minimum essential medium(MEM) 이 들은 배양액(이하 SSM)을 넣은 다음 조심스럽게 pipetting하여 single cell로 분리시킨다. 이 때 필요에 따라 세포들간의 aggregation이 일어나지 않도록 0.002% DNase I을 첨가하여 사용하고, 분리된 세포는 800 \times g에서 10분간 원심 분리시킨 후 상층액을 제거하고 SSM을 첨가한다. 같은 조작을 2번 시행하여 세포를 분리, 세척한 후 50 μm nylon mesh에 통과시켜 분리되지 않은 세포들은 제거하고, 얻어진 세포로부터 세포수와 세포생존율을 측정 한 후 미리 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ poly-L-lysine으로 도포된 75 cm^2 배양용기에 세포수가 2×10^7 되게 넣은 후 SSM을 첨가하여 37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2 와 95% air 그리고 100% 습도가 유지된 CO_2 incubator (Forma)에서 세포배양을 시작한다. 배양 4일에 그리고 그 후 일주일에 2번씩 SSM을 사용하여 배양액을 교환하였다.

(2) 신경교세포의 분리, 배양: 일차 배양세포는 신경교세포 이외에도 fibroblast, endothelial cell, microglia 및 소수의 신경세포 등이 같이 존재하여, 이들 세포중 type 1 astrocyte와 fibroblast는 배양용기에 견고히 붙어서 자라게 되고, 이들 세포 위에서 신경돌기를 갖는 phase-dark한 작은 세포를 관찰할 수 있으며 이들 세포가 주로 0-2A precursor와 oligodendrocyte 또는 type 2 astrocyte이다.

그러므로 각 type의 신경교세포는 Saneto and deVellis(1987)의 방법을 사용하여 분리하였다.

① 0-2A precursor 및 oligodendrocyte, type 2 astrocyte 배양; 일차 배양된 세포가 confluent 해지도록 7일 정도 기다린 후 배양 7~9일에 SSM을 다시 교환하고 rotary shaker (Labline orbit shaker)를 사용하여 37 $^\circ\text{C}$ 에서 250 rpm으로 1시간 진탕시킨 후 배양액을 제거하고, 다시 SSM을 첨가한 후 37 $^\circ\text{C}$ 에서 300 rpm에서 6시간 동안 진탕시킨다. 이 동안 배양액으로 떨어져 나온 세포를 모으고 다시 SSM을 첨가하여 16~18시간 진탕한 후 배양액을 함께 모은 다

음 33 μm nylon mesh에 통과시킨 후 800 \times g에서 10분간 원심분리한다. 상층액을 버리고 cell pellet을 SSM으로 부유한 후 한번 더 nylon mesh로 여과하고, 그 후 세포수를 측정 한 다음 $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ 되게 배양 용기에 또는 9 mm Aclar coverslip에 2×10^4 되게 세포를 넣고 배양하였다.

위와 같이 얻어진 세포는 주로 0-2A precursor와 oligodendrocyte 및 type 2 astrocyte로 구성되어 있으며 0-2A precursor는 배양조건에 따라 혈청이 있는 경우에는 type 2 astrocyte로, 혈청이 없는 경우에는 oligodendrocyte로 분화된다고 알려져 있음으로(Hunter and Bottenstein 1989) oligodendrocyte-enriched culture는 상기 방법으로 얻어진 세포를 serum-free media(DMEM/Ham's F12에 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bovine insulin, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ human transferrin, 10 ng/ml biotin, 30 nM sodium selenite와 penicillin-streptomycin이 들어있는 배양액: 이하 SFM)에서 4일동안 더 배양하고, type 2 astrocyte는 SSM에서 4일간 더 배양한 후 사용한다. 0-2A precursor는 분리후 배양용기에 넣고 다음날 즉시 실험에 사용하였다.

② Type 1 astrocyte 배양; Type 1 astrocyte는 앞에서 기술한 0-2A precursor 분리중 배양용기에 계속 붙어 있게 됨으로 배양용기에 SSM을 첨가하고 300 rpm에서 4시간동안 다시 진탕시켜, 남아있는 precursor cell들을 제거하고, 0.05% trypsin이 든 D-PBS 용액으로 처리하여 세포를 분리한 후 SSM으로 세포를 세척하고 다시 배양용기에 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 또는 9 mm Aclar coverslip에 $1 \sim 2 \times 10^4$ 되게 넣어 배양하였다.

3) 신경교세포의 성장에 대한 Cytokine의 효과

성장효과는 ^3H -thymidine uptake방법(Saneto and DeVillis, 1987)과 bromo-deoxyuridine (BrdU)과 세포 특이 marker에 대한 항체를 사용하여 double immunostain 방법(Yong등, 1988)을 사용하여 측정하였다.

(1) ^3H -thymidine uptake: 분리된 각 신경

교세포를 24 well plate에 넣어 배양한 후 배양액에 일정 농도의 cytokine을 첨가하여 2일 동안 반응시킨다. Type 1 astrocyte의 경우 반응 6시간 동안, 그리고 0-2A precursor, oligodendrocyte, Type2 astrocyte의 경우에는 24시간 동안 동일 배양액에 ^3H -thymidine($1 \mu\text{Ci/ml}$)를 첨가한 후 배양액을 제거하고 세포를 ice-cold PBS로 세척한 후 10% trichloroacetic acid 용액 1 ml를 각 well에 첨가하고 40°C 에서 1시간 동안 방치한다. 그 후 PBS로 다시 세척한 후 15분 이상 건조시키고 0.5 M NaOH 용액 1 ml를 각 well에 넣어 상온에서 6시간 이상 solubilize 시키고 그 후 0.5 M HCl 용액으로 중화시켜 scintillation vial에 옮겨 radioactivity를 측정하였다.

(2) Double immunostain: 각 신경교세포가 배양된 coverslip을 35 mm dish에 2개씩 옮겨 놓은 후 1 ml 배양액을 첨가하고 일정농도의 cytokine을 2일 동안 처리한다. 그 후 type 1, type 2 astrocyte의 경우 cytokine처리 2일째 마지막 6시간 동안, 그리고 0-2A precursor cell과 oligodendrocyte에서는 cytokine 처리 2일 동안 중 둘째날 24시간 동안 $10 \mu\text{M}$ BrdU를 배양액에 첨가하여 세포의 DNA 합성시 thymidine대신 BrdU이 uptake되도록 하였다. 반응이 끝난 후 세포는 필요에 따라 pre-또는 post fixation시키고 BrdU에 대해서는 mouse anti-BrdU(1:10)과 goat anti-mouse IgG-FITC(1:50)으로, 세포 특이 marker로 type 1과 type 2 astrocyte에서는 rabbit anti-GFAP(1:50), goat anti-mouse IgG-Rho(1:50)을 oligodendrocyte는 rabbit anti-galactocerebroside(1:10), goat anti-rabbit IgG-Rho(1:50) 사용하여 면역형광표식을 하고, 현광현미경으로 관찰하였다.

4) 신경교세포의 분화에 대한 cytokine의 효과

신경교세포의 분화는 생화학적 지표를 사용하여 즉 type 1 astrocyte의 분화 정도는 GFAP량과 glutamine synthetase, 그리고 oligodendrocyte의

분화 정도는 MBP량과 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase(CNPase) 지표 활성도를 측정하여 비교하였다.

(1) GFAP 및 MBP immunoblotting: 60 mm dish에 배양된 세포를 PBS로 2번 세척한 후 rubber policeman으로 분리 수집한 후 원심분리하여 cell pellet을 얻고 ice cold-PBS에 부유하여 sonicate하여 aliquot를 얻는다. 그 후 1% SDS로 37°C 에서 30분간 반응시킨 후 1:2 serial dilution을 만들어 96 well manifold에 놓인 nitrocellulose membrane에 $100 \mu\text{l}$ 씩 넣고 30분동안 방치한 다음 vacuum을 사용해 결합시켰다.

그 후 40°C 에서 16~18시간동안 반응시킨 후 horse radish peroxidase가 결합된 goat anti-rabbit IgG(1:200)으로 1시간, ABC complex(Vectorstain ABC)를 40분동안 반응시키고 4-chloro-1-naphrol을 사용하여 발색시킨 다음 scanning densitometer를 사용하여 정량하였다.

(2) Glutamine synthetase와 CNPase 활성도: 상기와 같은 방법으로 얻어진 cell pellet에 0.5 ml lysis buffer(10 mM imidazole-HCl, 0.5 mM EDTA pH 7.0)를 첨가하고 sonicate하여 효소분획으로 사용하였다.

Glutamine synthetase 활성도는 1 ml 반응액에 최종농도가 40 mM imidazole-HCl(pH 7.0), 3 mM glutamine, 0.4 mM sodium ADP, 30 mM MnCl_2 , 20 mM sodium arsenate와 60 mM hydroxylamine이 되도록 첨가하고 37°C 에서 효소분획 일정량을 첨가하여 반응을 시작하고 30분 후 40% TCA에 0.6M FeNO_3 가 들어있는 용액 2 ml를 첨가하여 반응을 끝내고 형성된 γ -glutamylhydroxamate를 spectrophotometer를 사용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다(Miller등, 1978). 그리고 CNPase 활성도 측정엔 얻어진 효소 분획에 Triton X-100을 1% 되게 첨가한 후 0.2 M MES buffer(pH 6.0) 용액에서 1 mM 2',3'-cyclic NADP를 기질로 사용하여 1시간 동안 반응시키고 생성되는 NADPH를 fluorescence spectrophotometer를 사용하여 측정하였다

(Weissbarth 등, 1980).

결 과

1) 분리 배양된 세포의 특성

신생 랫트 대뇌 부위로 부터 일차 신경교세포배양을 한 후 배양 10~14일에 돌기를 갖는 있는 형태학적으로 0-2A precursor 세포가 많이 관찰되었고 이 배양을 이용하여 18~24시간 동안 orbital shaker로 진탕 분리한 후 얻어진 세포는 mouse anti A2B5에 반응하는 0-2A precursor 세포임을 알 수 있었고, 분리순도는 80~85% 정도 이었다(Fig. 1). 한편 같은 배양조건에서 myeline basic protein에 대한 면역반응(immunoreactivity)를 나타내는 세포는 10% 이내였다.

2) 신경교세포의 성장에 대한 cytokine의 효과

(1) Type 1 astrocyte에 대한 cytokine의 성장 효과: 배양후 얻어진 astrocyte에 대한

cytokine의 성장효과를 알아보기 위해 1% FBS가 함유된 DMEM 배양용액으로 세포를 세척하고 같은 배양용액으로 교환해준 후 일정 농도의 cytokine을 첨가한 후 2일 동안 배양하고 마지막 6시간 동안 ^3H -thymidine을 첨가하여 thymidine uptake를 측정한 결과 1% 혈청 함유 대조군에서는 484 ± 80 cpm의 uptake를 볼 수 있었다. 같은 조건에서 1% 혈청함유 배양세포에 10 U/ml, 20 U/ml 1L-1 β 를 처리한 경우 thymidine uptake가 대조군에 비해 124.8 ± 21.4 , $145.4 \pm 16.8\%$ 이었고 10 U/ml, 20 U/ml 1L-2는 118.8 ± 16.3 , $94.0 \pm 12.8\%$ 이었고 100 U/ml, 200 U/ml IFN- γ 에서는 110.9 ± 24.3 , $102.5 \pm 8.9\%$ 로 1L-1 β 에 의해 type 1 astrocyte의 성장이 대조군에 비해 25~45% 정도 촉진됨을 보였다. 한편 double immunocytochemistry(GFAP/BrdU)를 시행한 결과 대조군에서는 $13.8 \pm 2.4\%$ 가 BrdU양성인 결과를 보였다. 그러나 1L-1 β 에서는 $17.6 \pm 3.4\%$ (10 U/ml), $21.6 \pm 7.1\%$ (20 U/ml), 1L-2에서는 $15.3 \pm 2.7\%$ (10 U/ml), $14.6 \pm 3.3\%$ (20 U/ml), IFN- γ 에 의해

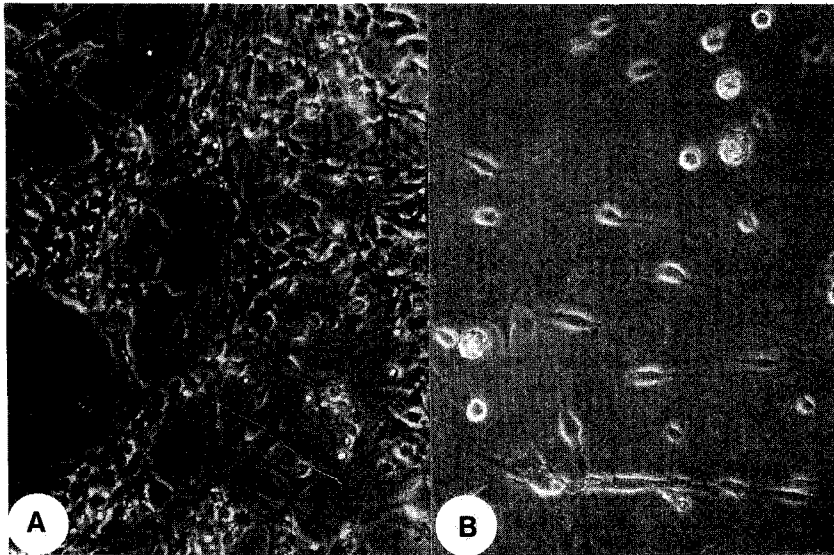


Fig. 1. Phase contrast photomicrograph of primary glial cell culture from newborn rat brain. A: Mixed glial cells(2DIV), B: 0-2A precursor cells. 0-2A precursor cells were mechanically prepared from mixed glial cultures at 10~14 DIV as described in Material and Methods($\times 200$).

서는 9.8 ± 2.1 (100 U/ml), 10.1 ± 3.5 (200 U/ml)로서 type 1 astrocyte의 성장이 약간 감소하는 경향을 보였으나 IL-1 β 에 의해서 astrocyte의 성장이 촉진됨을 알 수 있었다(Table 1).

(2) 0-2A precursor세포에 대한 cytokine의 성장효과: 얻어진 precursor 세포에 대해 cytokine의 성장 효과를 보기 위해 cytokine을 처치후 이틀동안 배양을 계속 시켰고 마지막 24시간 동안 ^3H -thymidine을 첨가한 후 thymidine uptake를 측정된 결과 대조군에서 5192 ± 432 cpm으로 16% 정도가 uptake되는 것을 볼 수 있었다. IL-1 β 10 U/ml, 20 U/ml를 처리한 경우 thymidine uptake가 대조군에 비해 $120.4 \pm 21.2, 169.1 \pm 3.38\%$, 그리고 IL-2 10 U/ml, 20 U/ml에서는 $130.7 \pm 46.5, 89.8 \pm 26.1$, IFN- γ 100 U/ml, 200 U/ml에서는 $114.4 \pm 23.8, 98.2 \pm 14.5$ 로 IL-1 β 에 의해 용량 의존적으로 0-2A precursor의 증식이 관찰되었다. 또한 specific marker와 BrdU를 사용하여 면역세포화학적으로 염색한 후 anti-BrdU 반응한 세포를 측정된 결과 대조군에서 $60.4 \pm 3.3\%$ 가 IL-1 β 10 U/ml, 20 U/ml를 처리한 경우 $74.7 \pm$

$3.4, 73.5 \pm 4.9\%$, 그리고 IL-2 10 U/ml, 20 U/ml에서는 $64.3 \pm 5.1, 63.8 \pm 2.6$, IFN- γ 100 U/ml, 200 U/ml에서는 $65.9 \pm 4.6, 64.5 \pm 3.7\%$ 이었다. anti BrdU에 반응하는 세포는 IL-1 β 처리시 proliferation index가 1.24로 증가된 결과를 보여 IL-1 β 는 0-2A precursor 세포에 대해서도 증식 효과를 나타냄을 알 수 있었다(Table 2).

(3) Type 2 astrocyte에 대한 cytokine의 성장효과: 0-2A precursor 세포배양을 이용하여 fetal calf serum(FBS)이 10% 함유된 DMEM 배양액에서 3~4일 동안 키운 후 10% FBS가 함유된 같은 배양액에 cytokine을 2일간 처리한 후 마지막 6시간 동안 ^3H -thymidine 또는 BrdU로 첨가한 후 type 2 astrocyte에 대한 이들 cytokine의 성장효과를 관찰하였다. 10 U/ml, 20 U/ml IL-1 β 를 처리한 경우 thymidine uptake가 대조군에 비해 $133.8 \pm 8.2, 173.2 \pm 36.5\%$, 그리고 10 U/ml, 20 U/ml IL-2에서는 $101.5 \pm 18.5, 87.0 \pm 13.4\%$, 100 U/ml, 200 U/ml IFN- γ 에서는 $87.6 \pm 13.4, 84.7 \pm 7.1$ 로 IL-1 β 에 의해 astrocyte의 증식이 관찰되었다. 한편 double immunocytochemistry

Table 1. Effect of cytokines on the growth of rat type 1 astrocyte in culture

	^3H -thymidine uptake (% of control)	Double immunostatin (%)
Control	100	13.8 ± 2.4
IL-1 β 10 U/ml	124.8 ± 21.4	17.6 ± 3.4
20 U/ml	145.4 ± 16.8	21.6 ± 7.1
IL-2 10 U/ml	118.8 ± 16.3	15.3 ± 2.7
20 U/ml	94.0 ± 12.8	14.6 ± 3.3
IF- γ 100 U/ml	110.9 ± 24.3	9.8 ± 2.1
200 U/ml	102.5 ± 8.9	10.1 ± 3.5

Astrocytes were plated onto a 24-well culture dish in 0.5 ml medium containing 1% FBS. Cytokines were treated at 37°C for 2 days in vitro. During the last 6h radioactive thymidine (1 $\mu\text{Ci/ml}$) was added in this culture. The TCA-insoluble radioactivity and double immunostain were determined as described in Materials and Methods. Each value represents mean \pm SEM.

Table 2. Effect of cytokines on the growth of 0-2A precursor cell in culture

	^3H -thymidine uptake (% of control)	Double immunostatin (%)
Control	100	60.4 ± 3.3
IL-1 β 10 U/ml	1240.4 ± 21.2	74.7 ± 3.4
20 U/ml	169.1 ± 33.8	73.5 ± 4.9
IL-2 10 U/ml	130.7 ± 46.5	64.3 ± 5.1
20 U/ml	89.8 ± 26.1	63.8 ± 2.6
IF- γ 100 U/ml	114.4 ± 23.8	65.9 ± 4.6
200 U/ml	98.2 ± 14.5	64.5 ± 3.7

0-2A precursor cells were plated onto a 24-well culture dish in 0.5 ml medium containing 1% FBS. Cytokines were treated at 37°C for 2 days in vitro. During the last 24h radioactive thymidine (1 $\mu\text{Ci/ml}$) was determined as described in Materials and Methods. Each value represents mean \pm SEM.

Table 3. Effect of cytokines on the growth of type 2 astrocyte in culture

	³ H-thymidine uptake (% of control)	Double immunostatin (%)
Control	100	5.7±2.8
IL-1β 10 U/ml	133.8±18.2	7.9±3.2
20 U/ml	173.2±36.5	8.6±3.8
IL-2 10 U/ml	101.5±18.5	6.8±3.1
20 U/ml	87.0±13.4	5.8±2.5
IF-γ 100 U/ml	87.6±13.4	6.6±3.0
200 U/ml	87.7± 7.1	6.8±3.3

0-2A precursor cells were plated onto a 24-well culture dish in 0.5 ml medium containing 10% FBS. Cytokines were treated at 37°C for 2 days in vitro. During the last 6 h radioactive thymidine(1 μCi/ml) was added in this culture. The TCA-insoluble radioactivity and double immunostain was determined as described in Materials and Methods. Each value represents mean ± SEM.

(GFAP/BrdU)의 경우에서는 대조군이 5.7±2.8%, 10 U/ml, 20 U/ml IL-1β에서는 7.9±3.2, 8.6±3.8%로 GFAP양성이며 BrdU양성인 세포로 IL-1β에 의해 type 2 astrocyte의 proliferation index도 140% 정도 증가하였다. 10 U/ml, 20 U/ml IL-2에서는 6.8±3.1, 5.8±2.5, 100 U/ml, 200 U/ml IFN-γ에서는 6.6±3.0, 6.8±3.3%로 처리한 모든 cytokine에 대해 proliferation index가 대조군에 비해 변화하지 않았다(Table 3).

(4) Oligodendrocyte에 대한 cytokine의 성장 효과: 상기 precursor 분리 방법과 동일한 과정을 거쳐 얻어진 세포를 사용하여 oligodendrocyte에 대한 cytokine의 성장 효과를 보기 위해 세포를 serum-free defined medium에 키우고 cytokine을 이틀 동안 처리한후 마지막 24시간 동안 ³H-thymidine을 첨가한후 radioactivity를 측정 한 결과 처리한 모든 cytokine에서 유의있는 증가효과를 보지 못하였다. 또한 myelin basic protein을 세포 표적으로 사용하고 BrdU을 처리한 후 성장효과를 측정 한 결과에서는 대조군이 8.2±

Table 4. Effect of cytokines on the growth of rat oligodendrocyte in culture

	³ H-thymidine uptake (% of control)	Double immunostain (%)
Control	100	8.17±6.3
IL-1β 10 U/ml	122.0±15.0	6.4±4.7
20 U/ml	101.6±20.2	4.9±3.6
IL-2 10 U/ml	92.2±10.8	6.1±4.7
20 U/ml	116.8±15.7	5.3±4.1
IF-γ 100 U/ml	122.4±15.8	7.2±5.3
200 U/ml	96.1±23.7	6.2±5.1

0-2A precursor cells were plated onto a 24-well culture dish in 0.5 ml serum free medium. Cytokines were treated at 37°C for 2 days in vitro. During the last 24h radioactive thymidine(1 μCi/ml) was added in this culture. The TCA-insoluble radioactivity and double immunostain were determined as described in Materials and Methods. Each value represents mean ± SEM.

6.3, IL-1 10 U/ml, 20 U/ml에서는 6.4±4.7, 4.9±3.6 IL-2 10 U/ml, 20 U/ml에서는 6.1±4.7, 5.3±4.1 IFN-γ 100 U/ml, 200 U/ml에서는 7.2±5.3, 6.2±5.1%로 처리한 모든 cytokine에 대해 oligodendrocyte의 성장이 다소 감소하는 경향을 보였다(Table 4).

3) 신경 교세포의 분화에 대한 cytokine의 효과 측정

(1) Type 1, Type 2 astrocyte에 대한 cytokine의 분화효과: 배양된 astrocyte의 분화 또는 기능에 대한 cytokine의 효과를 검토하기 위해 glutamine synthetase 활성도와 GFAP 함량을 생화학적 지표로 사용하여 측정 비교하였다. Type 1 astrocyte에서의 glutamine synthetase (GS) 활성도는 대조군에서 62.0±16.0(mean±S.E.M.) umoles/mg prot/30 min이었으며 IL-1β 10 U/ml, 20 U/ml에서는 138.4±79.4, 95.1±55.1, IL-2 10 U/ml, 20 U/ml에서는 45.1±12.0, 56.1±9.1, IFN-γ 100 U/ml, 200 U/ml 에서는 47.8±7.8, 41.0±6.0 umoles/mg prot/30 min으로 type 1

Table 5. Effect of cytokines on the glutamine synthetase activity in rat astrocytes in culture

	Glutamine synthetase (umoles/mg prot./30 min)	
	Type 1 astrocyte	Type 2 astrocyte
	Control	62.0 ± 16.0
IL-1 β 10 U/ml	138.4 ± 39.7	221.2 ± 37.1
20 U/ml	95.1 ± 27.6	182.5 ± 16.9
IL-2 10 U/ml	45.1 ± 12.0	120.9 ± 18.4
20 U/ml	56.1 ± 9.1	75.1 ± 13.9
IF- γ 100 U/ml	47.8 ± 7.8	99.7 ± 17.5
200 U/ml	41.0 ± 6.0	241.7 ± 50.7

Astrocytes were plated onto a 35 mm culture dish in 1 ml medium containing 1% FBS. Cytokines were treated at 37°C for 2d in vitro. For assay, the cells were scrapped off and sonically disrupted. GS activity was determined as described in Materials and methods. Each value represents mean ± SEM.

astrocyte에서는 IL-1이 GS 활성도를 증가시키고, IL-2와 IFN- γ 은 억제효과를 보였다(Table 5).

한편 type 2 astrocyte의 glutamine synthetase 활성도는 대조군에서 205.1 ± 28.9 umoles/mg prot/30 min이었으며, IL-1 β 10 U/ml, 20 U/ml에서는 221.2 ± 37.1, 182.5 ± 16.9, IL-2 10 U/ml, 20 U/ml에서는 120.9 ± 18.4, 75.1 ± 13.9, IFN- γ 100 U/ml에서는 99.7 ± 35.0 241.7 ± 50.7 umoles/mg prot/30 min으로 IL-2와 IFN- γ 처리에 의해 효소의 활성도가 억제되는 양상을 보였고 IL-1 β 는 약한 억제효과를 보였다(Table 5).

또한 cytokine 전처치로 인해 astrocyte내 존재하는 GFAP 단백질 발현정도가 어떻게 영향을 받는가를 알아보기 위해 anti-GFAP 항체를 이용하여 immunoblotting한 결과 type 1 astrocyte, type 2 astrocyte에서 실험에 사용된 모든 cytokine에 의해 단백질 GFAP 함량이 대조군에 비해 유의한 변화를 볼 수 없었다(Table 6).

(2) Oligodendrocyte에 대한 cytokine의 분화효과: Cytokine이 oligodendrocyte의 분화에

Table 6. Effect of cytokines on GFAP immunoblotting type 1 and type 2 astrocyte

	GFAP Immunoblotting(%of control)	
	Type 1 astrocyte	Type 2 astrocyte
	Control	100
IL-1 β 20 U/ml	94.0 ± 9.8	92.3 ± 3.8
IL-2 20 U/ml	93.1 ± 11.9	93.7 ± 5.3
IF- γ 100 U/ml	91.9 ± 12.0	96.4 ± 11.9

Astrocytes were plated onto a 35 mm culture dish in 1 ml medium containing 1% FBS. Cytokines were treated at 37°C for 2d in vitro. For assay, the cells were scrapped of and sonically disrupted. Immunoblotting was determined as described in Metrials and Methoss. Each value represents mean ± SEM.

Table 7. Effect of cytokines on CNPase activity and MBP immunoblotting in oligodendrocyte

	CNPase (μ moles/mg prot./30 min)	MBP immunoblotting (% of control)
	Control	28.0 ± 5.4
IL-1 β 10 U/ml	24.3 ± 8.4	—
20 U/ml	33.9 ± 6.6	104.4 ± 5.8
IL-2 10 U/ml	22.2 ± 2.6	—
20 U/ml	26.2 ± 3.6	101.9 ± 12.2
IFN- γ 100 U/ml	31.4 ± 4.6	—
200 U/ml	23.0 ± 5.2	104.6 ± 20.3

CNPase activity and MBP immunoblotting were degtermined as described in Materials and Methods. Each value represents mean ± SEM.

미치는 효과를 검토하기 위해 일차적으로 CNPase 활성도를 측정하고, MBP 함량의 변화를 측정하였으나 처치한 모든 cytokine에 의해 CNPase 활성도 그리고 MBP immunoblotting 결과 모두에서 유의한 효과를 볼 수 없었다(Table 7).

고 찰

Cytokine이 신경교세포의 성장 또는 분화에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 배양된 신생 랫트 astrocyte 1, 2 그리고 oligodendrocyte의 성장과 분화에 대한 interleukin 1, 2 그리고 interferon- γ 의 효과를 관찰한 결과 IL-1 β 는 astrocyte type 1과 2에서 성장을 촉진하였으나 oligodendrocyte대해서는 아무런 영향을 미치지 못하였고, IL-2와 IFN- γ 는 각각의 세포에 대해 유의한 효과를 발견할 수가 없었다.

Astrocyte type 1과 2의 경우 20 u/ml IL-1 β 의 처리로 ^3H -thymidine uptake가 type 1에서는 45% 정도, type 2의 경우 73% 정도가 증가되는 결과를 보였다. 이러한 결과는 배양과정중 오염된 fibroblast나 microglia가 일부 존재할 수 있으며 microglia도 IL-1 β 에 의해 성장이 촉진되는 것으로 알려져 있으므로(Morganiti-Kossmann등, 1992) IL-1 β 이 astrocyte type 1과 2에 직접작용을 나타내기보다는 이러한 세포에 의한 복잡한 결과로 해석될 수 있으므로 double immunostain을 시행한 결과, 20 u/ml IL-1 β 의 농도에서 proliferation index는 type 1에서는 57%, type 2에서는 39%가 증가하여 ^3H -thymidine uptake의 수치와 약간의 차이가 있지만 이러한 결과는 IL-1 β 가 astrocyte type 1과 2에 작용하여 성장을 촉진한 것으로 해석된다.

최근의 여러 연구에서 신경교세포는 lymphocyte와 유사하게 Thy1, myelin-associated glycoprotein과 class I 및 class II 조직적합성(major histocompatibility)항원을 표현할 수있으며, 뇌 질환에서 표현 정도가 변화될 수 있으며 뇌 조직의 손상 또는 뇌 질환시 혈액내 monocyte 또는 macrophage와 유사하게 여러 종류의 soluble factor를 분비하거나, 이러한 factor에 반응할 수 있음이 알려졌다(Giulian등, 1988; Merrill, 1987). 이러한 현상은 혈관 뇌 장벽이 충분히 발달하지못한 시기에 신경교세포와 lymphocyte와의 교통에 의

해서 일어날 수있는 현상이나, 현저한 뇌손상이 없는 상태에서도 T cell을 포함한 lymphoid cell이 뇌조직내 유입, 존재할 수있다고 보고되고 있다. 한편 뇌조직에서도 interleukin 1이 검출되고, 뇌 질환이나 뇌손상시 뇌조직에 존재하는 microglia가 자극을 받아 활성화되어 IL-1을 분비하며 이렇게 유리된 IL-1은 astrocyte에 대한 강력한 증식인자로 작용하여 IL-1에 의해 자극을 받은 astrocyte가 IL-3등 여러 soluble factor를 분비함으로써 IL-3는 microglia의 증식을 일으키며(Giulian등, 1988) IL-2는 oligodendrocyte의 증식을 유발하고 myelin basic protein mRNA와 단백질이 증가되는 등 oligodendrocyte의 성숙에 관여할 수있다고 보고하였다(Russell등, 1986). 그러므로 본 실험에서 얻은 IL-1 β 의 astrocyte에 대한 효과는 이러한 보고와 일치하는 것이었다. 그러나 Benveniste와 Merrill등(1986)의 보고와는 달리 IL-2에 의한 oligodendrocyte의 증식을 촉진시키는 결과를 얻을 수 없었다.

Cytokine 들의 신경교세포의 기능에 대한 효과를 알아보기위해 type 1과 type 2 astrocyte에 대해서는 주로 astrocyte에 존재하며 glutamate를 glutamine으로 전환하여 흥분성 아미노산 신경전달물질의 대사에 중요한 역할을 맡고있는 glutamine synthetase(GS)의 활성도와 astrocyte의 특이 marker인 GFAP의 면역정도를, 그리고 oligodendrocyte에 대해서는 myelin 합성에 관여하는 CNPase의 활성도와 myelin basic protein(MBP) 함량을 측정하여 비교하였다. IL-1 β 는 type 1과 type 2 astrocyte에서 단위단백당 GFAP함량의 변화를 초래하지 않았으나 type 1 astrocyte에서는 glutamine synthetase의 활성도가 증가되었고, type 2 astrocyte에서는 다소 감소되는 결과를 보였다. 이러한 결과는 IL-1 β 가 type 1과 type 2 astrocyte의 성장을 촉진시켜 세포수의 증가를 초래하지만 단위단백당 GFAP함량의 변화가 없는 결과로 미루어 보아 IL-1 β 에 의해 type 1과 type 2 astrocyte에서 총 GFAP 단백질량은 증가되는 것으로 생각되어진다.

이와함께 type 1 astrocyte에 있어서 IL-1 β 에 의해 GS활성도가 증가하는 결과는 reactive gliosis에서 나타나는 생화학적 변화와 일치하는 현상으로 뇌조직 손상시 reactive astrocytosis에 IL-1 β 를 포함한 여러 면역매개물질이 관련될 수 있다는 보고와 일치하는 현상이다. 그러나 type 1과 type 2 astrocyte에서 GS활성도가 IL-2, IFN- γ 에 의해서 억제되는 현상은 제대로 설명할 수 없는 실정이다.

한편 astrocyte는 형태학적으로 protoplasmic과 fibrous type으로 구분될 수 있으며 형태 및 면역세포화학적 성상 뿐만 아니라 기능적으로도 달라 type 1 astrocyte는 활발하게 분열할 수 있는 potential을 갖고 있으나 type 2 astrocyte는 type 1 astrocyte와 달리 분열속도가 매우 낮으며, γ -aminobutyric acid(GABA)에 대한 high affinity 운반기전이 있어 GABA를 세포질 내로 축적하고 (Johnston등, 1986) 흥분성 아미노산 신경전달물질에 대한 수용체가 세포막에 존재하며(Gallo등, 1986, 1987) 그외에도 proteoglycan chondroitin sulfate를 합성할 수 있는 것으로 알려져 있다. 그리고 최근의 여러 연구 결과에 의하면 type 2 astrocyte는 type 1 astrocyte와는 세포계열이 달라 O-2A precursor라는 전구세포로부터 유래되며 세포배양을 이용한 실험에서 혈청 존재하에서는 type 2 astrocyte로 그리고 혈청이 없는 조건에서는 oligodendrocyte로 분화되는 등 세포외 조건에 의해 분화되는 양상이 다른 것으로 알려져 있으며 또한 이 전구세포가 type 2 astrocyte로 분화되는 데에는 type 1 astrocyte가 영향을 미친다고 알려져있는바(Aliosi등, 1988; Goldman등, 1986) oligodendrocyte 및 이들의 전구세포의 성장 및 분화는 세포발생학적 관점 이외에도 수초 형성에 관여하는 oligodendrocyte에 일차적인 손상을 나타내는 demyelinating disease와 같은 질병에서 정상기능을 갖는 oligodendrocyte의 보충 또는 재생이라는 관점에서 관심의 대상이 되고있다.

본 실험의 결과에서는 IL-1 β 가 type 1과 type 2 astrocyte의 성장을 촉진시키는 이외에도 O-2A

precursor 세포에 대한 thymidine uptake를 70% 정도, 그리고 double immunostain의 경우 20% 정도 증가시킴으로 미루어 O-2A precursor 세포의 성장도 촉진시킴을 보였다.

이러한 결과는 O-2A precursor 세포가 IL-1 β 에 의해 성장이 촉진되고 이후 이들 전구세포로부터 oligodendrocyte 또는 type 2 astrocyte로 발달이 촉진될 수 있는 결과로 생각될 수 있다. 한편 oligodendrocyte 또는 type 2 astrocyte로 발달과정은 상기한 여러 인자에 의해 영향을 받을 수 있음이 보고되어 있고, 본 연구에서는 O-2A precursor 세포로부터 배양일수에 따른 GFAP 함량과 GS 활성도의 변화를 직접 측정하지 못하였으므로 이들 생화학적 지표에 대한 IL-1 β 의 효과는 언급할 수 없었다. 그러나 본 실험결과에서 보듯 IL-1 β 는 astrocyte의 성장과 GS 활성도에 영향을 미치지만 oligodendrocyte는 아무런 효과를 나타내지 못함으로 보아 IL-1 β 는 O-2A precursor 세포로부터 type 2 astrocyte로 발달되는 과정에도 작용할 수 있으리라 믿어진다.

결론

배양 환경 신경교세포에 대한 cytokine의 성장 또는 분화 효과를 검토하였다. 실험에 사용된 cytokine 중 IL-1 β 만이 type 1과 type 2 astrocyte 그리고 O-2A precursor 세포의 성장을 촉진시키는 결과를 보였다. 한편 신경교세포에서의 생화학적 변화는 IL-1 β 에 의해 type 1과 type 2 astrocyte에서 단위단백량 GFAP함량은 변화가 없었으나 glutamine synthetase 활성도가 type 1 astrocyte에서는 증가되었고 type 2 astrocyte에서는 약간 감소하는 경향을 보였다. 한편 oligodendrocyte의 경우 사용된 cytokine에 의해 성장 또는 분화와 관련된 변화를 볼 수 없었다.

이상의 결과는 IL-1 β 를 포함한 여러 cytokine이 각각의 신경교세포에 대해 다양한 생화학적 변화를 초래할 수 있으나 IL-1 β 의 주요한 효과는 type 5r1 astrocyte와 type 2 astrocyte에 대해 성장을

촉진시키는 것으로 믿어지며 그 외에도 0-2A precursor 세포로부터 type 2 astrocyte로 발달을 촉진시킬 수 있으리라 사료된다.

참 고 문 헌

- Aloisi F, Agresti CD, Urso D and Levi G: *Differentiation of bipotential glial precursors into oligodendrocytes is promoted by interaction with type-1 astrocytes in cerebellar cultures. Proc Natl Acad Sci USA 85: 6167-6171, 1988*
- Benveniste EN and Merrill JE: *Stimulation of oligodendroglial proliferation and maturation by Interleukin 2. Nature 521: 610-612, 1986*
- Bunger RP: *Glial cells and the central myelin sheaths Physol. Res 48: 197-251, 1968*
- Dennis-Donni S, Glowinsky J and Prochiantz: *Glial heterogeneity may define the three dimensional shape of mouse mesencephalic dopaminergic neurons. Nature Lond 307: 641-643, 1984*
- DiPorzio U, Daguet MC, Glowinski J and Prochiantz A: *Effects of striatal cells on in vitro maturation of mesencephalic dopaminergic neurons grown in serum-free conditions. Nature Lond 288: 370-373, 1980*
- Frei K, Bodmer S, Schwerdel C and Fontana A: *Astrocyte-derived interleukins as a growth factor for microglia cells and peritoneal macrophage. J Immunol 137: 3521-3527, 1986*
- Gallo V, Bertolotto A and Levi G: *Kainic acid stimulate GABA release from a subpopulation of cerebellar astrocytes. Eur J Pharmacol 133: 319-322, 1986*
- Gallo V, Bertolotto A and Levi G: *The proteoglycan chondroitin sulfate is present in a subpopulation of cultured astrocytes and in their precursors. Dev Biol 123: 282-285, 1987*
- Giulian D, Allen RL, Baker TJ and Tomozawa Y: *Brain peptides and glial growth. I. Glia-promoting factors as regulators of gliogenesis in the developing and injured central nervous system. J Cell Biol 102: 803-811, 1986*
- Giulian D, Woodward J, Young DG, Krebs JF and Lachman LB: *Interleukin-1 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. J Neurosci 8: 2485-2490, 1988*
- Heumann R, Korsching S and Thoenen H: *Changes in nerve growth factor synthesis in non-neuronal cells in response to sciatic nerve trans- actions. J Cell Biol 104: 1623-1631, 1981*
- Hunter SF and Bottenstein JE: *Bipotential glial progenitors are targets of neuronal cell line-derived growth factors. Dev Brain Res 49: 33-49, 1989*
- Johnstone SR, Levi G, Wilkin GP, Schneider A and Ciotti MT: *Subpopulations of rat cerebellar astrocytes in primary culture: Morphology, cell surface antigens, and [³H]GABA transport. Dev Brain Res 24: 63-75, 1986*
- Merrill JE: *Macroglia: Neural cells responsive to lymphokines and growth factors. Immunol. Today 8: 146-150, 1987*
- Miller RE, Hackenberg R and Gershman H: *Regulation of glutamine synthetase in cultured 3T3-L1 cells by insulin, hydrocortisone, and dibutyryl cyclic AMP. Proc Natl Acad Sci USA 75: 1418-1422, 1978*
- Morganiti-Kossmann MC, Kossmann T and Wahl SM: *Cytokines and Neuropathology. TiPS 13: 286-291, 1992*
- Murphy S and Pearce B: *Functional receptors for neurotransmitters on astroglial cells. Neuroscience 22: 381-394, 1987*
- Rakic P and Goldman-Rakic PS: *The development and modifiability of the cerebral cortex. Neurosci Res Prog Bull 20: 433-438, 1982*
- Rudge JS, Smith GM and Silver J: *An in vitro model of wound healing in the CNS: Analysis of cell reaction and interaction at different ages. Exp Neurol 103: 1-16, 1989*
- Saneto RP and deVellis J: *Neuronal and glial cells: cell culture of the central nervous system In neurochemistry a practical approach (eds Turner AJ and Bacheland HS) IRL press. Ox-*

ford, pp27-63, 1987

Weissbarth S, Maker HS, Lehrer GM, Schneider S and Bornstein MB: *A sensitive fluorometric assay for 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase. J Neurochem 35: 503-505,*

1980

Yong VW, Kim SU and Pleasure DE: *Growth factors for fetal and adult human astrocytes in culture. Brain Res 444: 59-66, 1988*
