

신경세포가 별아교세포의 아교섬유성 산단백질 표현에 미치는 영향

배 형 미·박 정 선·연 동 수

연세대학교 의과대학 생리학교실

Effect of Glial-neuronal Cell Co-culture on GFAP Expression of Astrocytes. Hyungmi Bae, Jungsun Park, and Dongsoo Yeon Department of Physiology, Yonsei University College of Medicine, Seoul 120-752, Korea

Injury to brain transforms resting astrocytes to their reactive form, the hallmark of which is an increase in glial fibrillary acidic protein (GFAP), the major intermediate filament protein of their cell type. The overall glial response after brain injury is referred to as reactive gliosis. Glial-neuronal interaction is important for neuronal migration, neurite outgrowth and axonal guidance during ontogenic development. Although much attention has been given to glial regulation of neuronal development and regeneration, evidences also suggest a neuronal influence on glial cell differentiation, maturation and function.

The aim of the present study was to analyze the effects of glial-hippocampal neuronal co-culture on GFAP expression in the co-cultured astrocytes.

The following antibodies were used for double immunostaining chemistry; mouse monoclonal antibodies for confirm neuronal cells, rabbit anti GFAP antibodies for confirm astrocytes.

Primary cultured astrocytes showed the typical flat polygonal morphology in culture and expressed strong GFAP and vimentin. Co-cultured hippocampal neurons on astrocytes had phase bright cell body and well branched neurites. About half of co-cultured astrocytes expressed negative or weak GFAP and vimentin. After 2 hour glutamate (0.5 mM) exposure of glial-neuronal co-culture, neuronal cells lost their neurites and most of astrocytes expressed strong GFAP and vimentin.

In Western blot analysis, total GFAP and vimentin contents in co-cultured astrocytes were lower than those of primary cultured astrocytes. After glutamate exposure of glial-neuronal co-culture, GFAP and vimentin contents in astrocytes were increased to the level of primary cultured astrocytes.

These results suggest that neuronal cell decrease GFAP expression in co-cultured astrocytes and hippocampal neuronal-glial co-culture can be used as a reactive gliosis model in vitro for studying GFAP expression of astrocytes.

Key Words: Reactive gliosis, Astrocyte maturation, Neuron, Co-culture, Glial

서 론

중추신경계가 손상을 받으면 별아교세포(astrocyte)의 증식 및 비후와 별아교세포내에 특이적으로 존재하는 아교섬유성 산단백질(glial fibrillary acidic protein, GFAP)의 증가등이 특징적으로 나타나는 반응성 아교증식증(reactive gliosis)이 일어난다(Siver & Sidman, 1980; Giulian, 1987). 반응성 아교증식증은 중추신경계 재생에 상반된

기능을 갖고 있다. 즉, 반응성 아교증식증은 중추신경계의 흉터 조직으로 존재하면서 신경 재생의 장애 요인으로 작용한다(Berry et al, 1983). 반면에 반응성 별아교세포(reactive astrocyte)는 안정 별아교세포(resting astrocyte)와는 달리 여러 종류의 신경전달물질, 신경단백질, cytokine을 분비한다(Ferrara et al, 1988; Manthorpe et al, 1989). 이 반응성 별아교세포에서 분비되는 nerve growth factor(NGF), ciliary neurotrophic factor(CNTF), brain-derived neurotrophic factor(BDNF), neurotrophin-3(NT-3)등은 신경세포의 생존율을 증가 또는 재생을 촉진시키는 작용이 있다(McMillian et al, 1994).

책임저자 : 연동수, ☎ 120-752 서울 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 생리학교실

반응성 아교증식증은 신경세포의 파괴에 의해서만 일어나는 것은 아니고 별아교세포 자체의 손상(Takada et al, 1990), 또는 myelin을 만들어내는 회소돌기아교세포의 손상시에도 일어난다(Smith et al, 1983). 이처럼 반응성 아교증식증이 일어나는 경우는 다양하기 때문에 반응성 아교증식증은 한 종류의 기전에 의해 발생되지는 않을 것으로 믿고 있다(Callaghan et al, 1990).

반응성 아교증식증을 생체외에서 연구하고자 할 때는 태아 또는 신생 흰쥐의 별아교세포를 배양하는 방법을 이용하여 왔다. 즉, 배양된 별아교세포는 생체내의 안정 별아교세포보다는 반응성 별아교세포와 형태학적인 면에서뿐 아니라 반응성 별아교세포에서 분비되는 여러 종류의 신경전달물질, 신경단백질, cytokine을 거의 대부분 합성 분비하는 등 기능적인 면에서도 유사한 점이 많기 때문이다(Stewart et al, 1986; Eng, 1987). 그러나 태아 또는 신생 흰쥐 대뇌의 별아교세포를 배양할 때는 배양 기간을 3개월까지 유지하더라도 생체에서와는 달리 GFAP나 vimentin의 함량이 계속 높게 유지된다(Oh et al, 1993). 최근 Fedoroff 등(1984)과 McMillian 등(1994)은 반응성 아교증식증의 새로운 모델을 제시한 바 있다. 즉 배양된 별아교세포를 di-butyrac-c-AMP(dBcAMP)로 처리하면 이 세포에서는 반응성 별아교세포에 존재하는 epidermal growth factor(EGF) receptor, laminin 등이 발현되며, 형태학적으로는 별 모양의 형태를 갖는 등 더욱 반응성 별아교세포와 유사하다고 보고한 바 있다(Fedoroff et al, 1984). 반면에 Wandosell 등(1993)은 반응성 별아교세포의 세포막은 신경축삭의 성장을 촉진시키는데 dBcAMP 처리된 배양된 별아교세포의 세포막은 신경축삭의 성장을 억제하는 등 dBcAMP로 처리한 배양된 별아교세포이더라도 반응성 별아교세포와는 그 기능이 일치하지는 않는다고 보고하였다. 이처럼 반응성 아교증식증의 생체의 모델이 아직 정립되지 않았다.

한편 별아교세포와 신경세포는 발생기 때에 서로 상호작용을 거치면서 분화 및 증식이 일어나는데(Banker, 1980; Gasser & Hatten, 1990) 별아교세포가 발생기시 신경세포의 이동과 신경세포의 생존 및 신경축삭 성장 등에 관여하는 것은 잘 알려져 있다(Hatten et al, 1988). 또한 신경세포도 생체내에서 별아교세포의 분화, 성숙, 기능 등에 영향을 끼칠 수 있다는 보고도 있다(Hatten, 1985; Mearow et al, 1990). 최근 Vige 등(1992)은 별아교세포와 신경세포를 동시 배양할 때, 배양된 별아교세포에서는 nerve growth factor의 분비가 감소하며, 이 때 glutamate를 처리하여 신경세포를 죽게하면 배양된 별아교세포에서 nerve growth factor의 생성이 다시 증가한다고 보고하였다. 이는 별아교세포와 신경세포 동시 배양시 신경세포의 존재

유무에 의해 배양된 별아교세포의 기능이 안정 별아교세포 또는 반응성 별아교세포의 기능과 유사하게 됨을 암시한다.

본 실험에서는 신경세포와 별아교세포 동시 배양이 반응성 아교증식증의 하나의 모델로 이용될 수 있을 것이라는 가설하에 신경세포가 배양된 별아교세포의 GFAP 및 vimentin 함량에 미치는 영향을 보고자 하였다.

방 법

별아교세포의 일차배양

별아교세포의 일차 배양은 McCarthy 및 de Vellis(1980)의 방법을 일부 수정하여 시행하였다. 즉, 생후 1~2일된 흰쥐 머리를 절단하고 두개골을 제거한 후 대뇌를 Ca^{++} , Mg^{++} free Hank's balanced salts solution(HBSS, Gibco, Grand Island, NY, USA)에 넣었다. 수술 현미경하에서 뇌막을 제거한 후 10 ml pipette을 이용하여 조직 분쇄하였다. 이에 trypsin(Gibco)을 0.13%되게 첨가한 후 37°C에서 20분간 incubation하여 세포를 분리하였다. Incubation이 끝난 다음 이를 Nitex filter(Tetko, Elmsford, NY, USA) #210 및 #130에 통과시켜 결체조직을 제거하고, 통과된 세포는 100 x g에서 5분간 원심분리하였다. Trypsin을 제거하기 위해 세포 침전물을 신선한 HBSS에 재부유시키고 이를 다시 Nitex filter #130에 통과시킨 다음 다시 원심분리하였다. 이 세포침전물을 배양액에 재부유시켜 Nitex filter #40에 통과시켰다. 이렇게 얻은 세포부유액의 세포수는 hemocytometer를 이용하여 측정하였고, 75 cm² canted neck culture flask(Corning)에 5×10^4 cells/ml의 농도로 20 ml를 넣어 12일간 배양하였다. 배양액은 매 3일마다 교환하였으며, 배양액은 1.2 g/l NaHCO₃, 15 mM HEPES(Sigma, St Louis, MO, USA), 10 % 소태아혈청(Sigma), 0.5 unit/ml penicillin(Sigma), 0.5 µg/ml streptomycin(Sigma)을 포함한 Dulbecco's modified Eagles medium(DMEM, Gibco) 용액을 이용하였다. 이때 culture flask내에는 별아교세포 외에 회소돌기아교세포(oligodendrocytes), 미세아교세포(microglia)가 혼재되어 있으므로 별아교세포만 다음과 같은 방법으로 분리하여 배양하였다. 즉, culture flask를 orbital shaker에서 250 rpm으로 48시간 흔들어서 미세아교세포와 회소돌기아교세포가 culture flask로부터 떨어지게 한 후 이를 제거한 다음, culture flask에 붙어있는 별아교세포는 0.05% trypsin / 0.5 mM EDTA 용액으로 30 초간 처리하여 떨어지게 한 후 이를 원심분리하였다. 세포 침전물에 배양액을 가해 재부유시키고 이를 Nitex filter # 40에 통과시킨 다음 이를 5×10^4 cells/ml/well의

농도로 6-well 배양판에서 배양하였다. 이 세포들이 별아교세포임을 GFAP에 대한 면역화학염색을 시행하여 확인하였다. 이때 별아교세포는 3주까지 배양하되(별아교세포 단독 배양), 일부는 1주후에 후술하는 별아교세포-해마 신경세포의 동시 배양에 이용하였다. 동시 배양된 별아교세포-해마 신경세포는 2주간 더 배양하되(신경세포-별아교세포 동시 배양), 이중 일부는 동시 배양 1주후에 후술하는 대로 glutamate(Sigma)를 처리하여 신경세포를 손상시키고 1주일간 더 배양하였다.

해마 신경세포의 일차 배양

해마(hippocampus) 신경세포의 일차배양은 Alhø 등 (1988)의 방법을 일부 수정하여 배양하였다. 즉, 임신 17~19일된 흰쥐를 Nembutal(50 mg/kg)로 마취시킨 후 복부를 70% 알코올로 세척하였다. 복부를 절개한 후 자궁과 태아 흰쥐를 절제하고 이를 Ca^{++} , Mg^{++} free Hank's balanced salts solution(HBSS)에 넣었다. 태아 흰쥐 대뇌를 분리한 다음 수술 현미경하에서 뇌막을 제거하고, 여기서 대뇌의 양측 해마를 분리하였다. 분리된 해마를 0.13% trypsin이 포함된 Ca^{++} , Mg^{++} free HBSS로 37°C에서 20분간 incubation하여 신경세포를 분리하였다. Trypsin과 결체조직 등을 제거하기 위해 세포 침전물을 신선한 HBSS에 재부유시키고 이를 Nitex filter # 40에 통과시킨 다음 다시 원심분리하였다. 이 세포침전물을 배양액에 재부유시켜 Nitex filter # 20에 통과시켰다. 이렇게 얻은 세포부유액의 세포수는 hemocytometer를 이용하여 측정하였고, 10 μ g/ml의 poly-L-lysine(PLL, Sigma)이 처리된 덮게유리를 넣은 6-well 배양판에 5×10^4 cells/ml의 농도로 1 ml 넣어 배양하였다. 배양 24시간 후 cytosine arabinofuranoside(Sigma)가 1 μ M이 되게 배양액에 넣어주어 신경세포 이외의 세포 증식을 억제하였다. 이를 1주일간 배양하였고 배양액은 매 3일 마다 1/2씩 교환하였다. 배양액은 10% 소태아혈청, 25 mM KCl(Sigma), 60 μ M putrescine(Sigma), 20 nM progesterone(Sigma), 100 μ g/ml transferrin(Sigma), 25 μ g/ml insulin(Sigma), 30 nM selenium(Sigma), 0.5 unit/ml penicillin, 0.5 μ g/ml streptomycin이 포함된 DMEM 용액으로 조성하였다. 이 세포들이 신경세포임을 neuron specific enolase(NSE)와 neurofilament에 대한 면역화학 염색을 시행하여 확인하였다.

별아교세포와 신경세포의 동시배양

별아교세포와 신경세포 동시배양은 1주간 일차 배양된 별아교세포층 위에 해마 신경세포를 배양하는 방법을 이용하였다. 배양액은 위에서 기술한 해마 신경세포 배양액을 이용하였다. 이때 포함되는 cytosine arabinofur-

anoside는 기저층으로 존재하는 별아교세포의 증식을 억제하나 적어도 배양 1주일간은 별아교세포 자체를 죽게 하거나 별아교세포의 GFAP 및 vimentin 발현에는 영향을 미치지 않는 것을 위상차 현미경 또는 면역화학 염색으로 확인하였다.

배양된 신경세포-별아교세포의 glutamate 처리

신경세포-별아교세포를 1주일간 동시 배양한후 0.5 mM glutamate가 포함된 배양액으로 2시간 처리하여 신경세포를 손상시킨후 HBSS로 3회 세척하고 배양액을 전술한 해마 신경세포 배양액으로 교환한 다음 다시 1주일간 더 배양하였다.

별아교세포내 아교섬유성 산단백질 함량의 변동

별아교세포 단독배양시, 신경세포-별아교세포 동시 배양시, glutamate 처리로 신경세포 손상후 별아교세포내 GFAP 함량 변동을 면역화학적 염색 방법과 Western blot으로 측정하였다. 면역화학 염색은 간접 형광면역염색 방법으로 시행하였다. 즉 배양된 세포를 4% paraformaldehyde를 포함한 20 mM phosphate buffered saline(pH 7.4, PBS)에 4°C에서 10분간 고정하여 세포 표본을 만들었다. 표본을 PBS로 세척한 다음 0.1% triton X-100을 포함한 PBS에 4°C에서 20분간 노출시켜 세포막 지방질을 제거하였다. 표본을 PBS로 세척하고 37°C에서 30분간 10% 우태아 혈청이 포함된 20 mM PBS(차단 용액)에 incubation하여 비특이적 항원을 차단하였다. 차단 용액을 버리고 표본을 1차 항원 용액(일정 비율로 1차 항원이 차단용액에 희석된 것, 후술)에 37°C에서 60분간 incubation하였다. 1차 항원 용액을 버리고 표본을 PBS로 세척한 다음 2차 항원 용액(일정 비율로 2차 항원이 차단용액에 희석된 것, 후술)에 37°C에서 30분간 incubation하였다. 2차 항원 용액을 버리고 표본을 다시 PBS로 세척한 다음 glycerol(50%)과 형광 보존제인 propyl gallate(0.05%)가 포함된 PBS로 mount하였다. 이를 형광 현미경으로 관찰하고 Kodak Ektachrome 400을 이용하여 사진 기록을 하였다. 세포막에 존재하는 항원에 대한 면역조직화학적 염색을 할 때는 세포막 지방질 제거 과정을 생략하였다.

GFAP에 대한 항체로는 Rabbit anti GFAP IgG(Sigma)를, vimentin에 대한 항체로는 mouse anti vimentin IgG(Sigma)를 이용하였으며, neurofilament에 대한 항체로는 단일 클론 항체인 SMI-31(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA)과 neuron specific enolase(NSE)에 대한 항체인 rabbit anti NSE IgG(Sigma)을 이용하였다. 위에서 기술한 1차 항체의 종류 및 희석 배율은 다음과 같다. Rabbit anti GFAP IgG; 1:100, rabbit anti NSE IgG; 1:200,

mouse anti SMI-31; 1:1,000, mouse anti vimentin IgG; 1:100.

2차 항체의 종류 및 희석 배율은 다음과 같다. FITC conjugated goat anti mouse IgG(Boehringer Mannheim); 1:200, Rhodamin conjugated goat anti rabbit IgG (Boehringer Mannheim); 1:500.

세포내 GFAP 및 vimentin은 Oh 등(1993)의 방법으로 추출하고 추출한 단백질은 Lowry 등(1951)의 방법으로 정량하였다. 전기영동은 10% separating gel과 5% stacking gel로 조성된 gel을 사용하여 Laemmli 등 (1970)의 방법에 따라 시행하였다. 전기영동한 gel을 Towbin 등 (1979)의 방법에 따라 nitrocellulose 막(NC)에 전이시켰다. 단백질이 전이된 NC 막을 3% BSA/ TBS 차단 용액에 1시간 흔들면서 처리하여 비특이적 항원을 차단하였다. NC 막을 TBS로 3회 세척한 후 0.5% BSA/ TBS에 rabbit anti-GFAP, mouse anti vimentin을 각각 1:100으로 희석하여 2시간동안 흔들면서 반응시켰다. TBS로 3회 세척하고 peroxidase-conjugated sheep anti-rabbit IgG (Boehringer Mannheim), peroxidase-conjugated goat anti- mouse IgG (Boehringer Mannheim)을 0.5% BSA/TBS용액에 1:5,000으로 희석하여 1시간 30분간 흔들면서 반응시킨 후 다시 TBS로 3회 세척하였다. 기질로 1-chloro-4-naphthol, 30% H₂O₂를 사용하여 발색시킨 후 증류수로 세척하였다. 발색 정도는 컴퓨터에서 Image-pro 프로그램을 이용하여 GFAP, vimentin의 상대적인 양으로 환산하였다.

결 과

일차 배양된 별아교세포 및 배양된 별아교세포와 안정시 별아교세포내 GFAP 함량

일차 배양된 별아교세포는 위상차 현미경 관찰상 97% 이상이 다각형 별아교세포였다(Fig. 1). 이 다각형 별아교세포는 단층(monolayer)을 이룰때까지 계속 증식이 일어났으며 이 세포들은 거의 모든 세포에서 GFAP와 vimentin을 발현하는 것으로 보아 대부분의 세포가 별아교세포임을 확인할 수 있었다. 또 배양된 세포들은 fibronectin 및 OX-42 항체에 대해 면역화학적 염색상 음성인 것으로 보아 섬유아세포 및 미세아교세포는 배양된 세포중에 존재하지 않음을 알 수 있었다(결과는 나타내지 않았음).

일차배양된 별아교세포와 성숙된 흰쥐 대뇌의 별아교세포의 GFAP 함량을 Western blot으로 측정하여 Fig. 2A에 나타내었다. 일차배양된 별아교세포의 GFAP 함량(좌측 lane)이 안정 별아교세포의 GFAP 함량(우측 lane)보다 높았다. Western blot으로 측정한 배양된 별아교세포 및



Fig. 1. Phase-contrast microscopic appearance of cultured astrocytes.

Flat and polygonal shape astrocytes are shown($\times 200$).

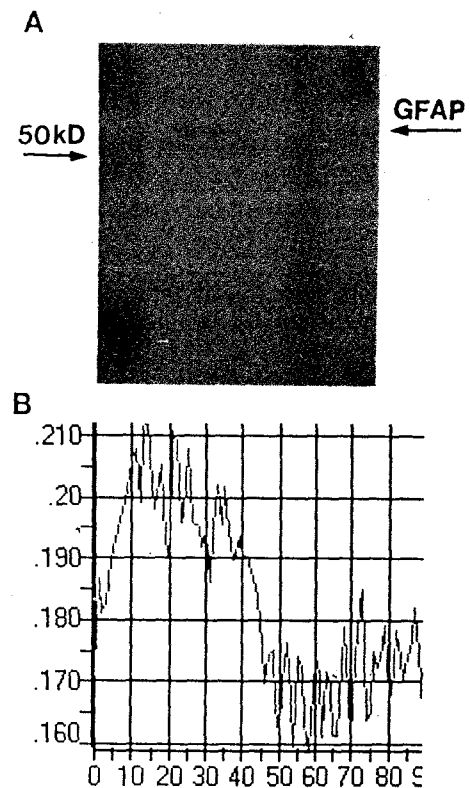


Fig. 2. Western blot analysis of GFAP contents in cultured astrocytes and *in vivo* astrocytes.

A, left lane: GFAP contents in cultured astrocytes. A, right lane: *in vivo* astrocytes.

Blot densities were measured using Image Pro program (B).

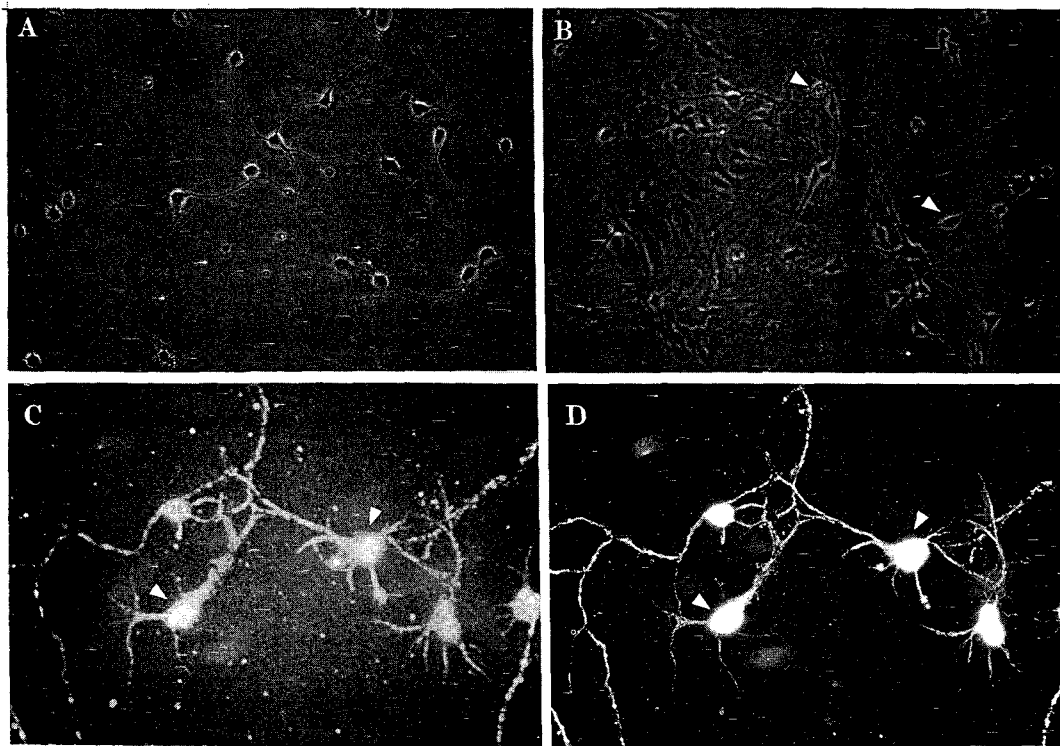


Fig. 3. Cultured hippocampal neurons(7 DIV).

A : Phase-contrast microscopic appearance of cultured hippocampal neurons. Phase-bright cell bodies and well branched neurites are shown($\times 200$).

B : Co-cultured astrocytes and neurons. Hippocampal neurons(arrow heads) were plated and cultured on astrocyte monolayer for 7 days($\times 200$).

C, D : Immunofluorescence microscopic appearances of cultured hippocampal neurons. Double immunocytochemistry of neuron specific enolase and neurofilaments were performed. Arrow heads indicate same cell($\times 400$).

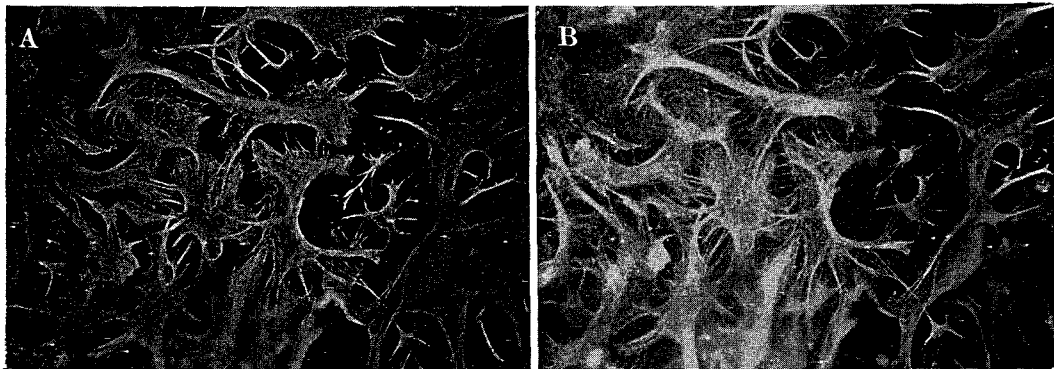


Fig. 4. Immunofluorescence microscopic appearances of cultured astrocytes.

Double immunocytochemistry of vimentin(A) and GFAP(B) were performed. Almost all cells express strong vimentin and GFAP($\times 200$).

안정별아교세포의 GFAP 함량을 컴퓨터상에서 Image Pro program을 이용하여 blotting density를 측정하여 Fig. 2B에 나타내었다.

해마 신경세포의 일차배양 및 별아교세포-신경세포의 동시 배양

일차배양된 해마 신경세포는 위상차 현미경 관찰상 밝게 빛나는 세포체와 가늘고 긴 많은 돌기의 신경축삭을 관찰할 수 있었다(Fig. 3A). 별아교세포-신경세포 동시 배양은 별아교세포가 단층을 이룰때까지 배양한 후 해마 신경세포를 그 위에 다시 배양하는 방법을 이용하였다. 신경세포는 별아교세포층 위에서 위상차 현미경상에서 밝게 빛나는 세포체와 많은 돌기의 신경축삭을 관찰할 수 있다(Fig. 3B).

배양된 해마 신경세포의 특성을 연구하기 위해 다음과 같은 실험을 진행하였다. 즉, 6-well 배양판에 넣어준 덮개 유리에서 배양된 세포를 4% paraformaldehyde로 고정시키고 NSE와 neurofilament에 대한 이중 면역화학적 염색을 시행하였다. 이 세포들은 거의 모든 세포에서 NSE,

neurofilament를 동시에 발현시켰다(Fig. 3C, D). 따라서 배양된 해마 신경세포는 신경세포의 특성을 갖고 있음을 알수 있었다.

별아교세포-신경세포 동시 배양이 별아교세포의 GFAP 및 vimentin 발현에 미치는 영향

단독 배양된 별아교세포는 거의 모든 세포에서 vimentin과 GFAP를 동시에 강하게 발현하였으며 다각형의 별아교세포의 형태를 보였다(Fig. 4A, B).

별아교세포-신경세포 동시 배양시에는 별아교세포 단독배양시에 비해 vimentin과 GFAP 발현이 감소된 세포를 많이 관찰할 수 있었다(Fig. 5A, B). 그러나 일부세포에서는 vimentin과 GFAP 발현이 계속 높게 유지된 세포도 볼 수 있었다(Fig. 5A, B). 또 별아교세포-신경세포 동시 배양시에는 별아교세포의 형태도 변형되었다. 별아교세포 단독 배양시에는 다각형 별아교세포 배양시의 전형적인 모습 즉, 일부 비교적 넓은 돌기를 가진 형태의 별아교세포를 관찰할 수 있었으나(Fig. 4A, B) 별아교세포-신경세포 동시 배양시에는 별아교세포의 형태에서 돌기

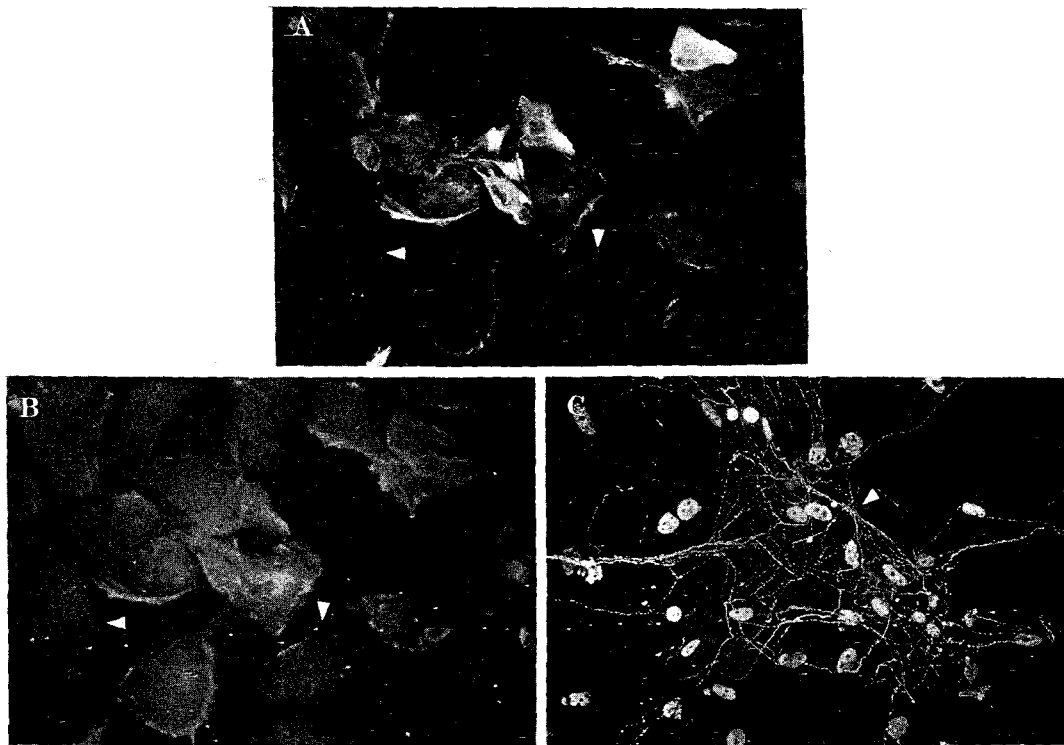


Fig. 5. Immunofluorescence microscopic appearances of co-cultured neurons and astrocytes($\times 200$). Double immunocytochemistry of vimentin(A) and GFAP(B) were performed. Some cells are negative for vimentin(A, arrow heads) and GFAP(B, arrow heads) immunostain. Co-cultured neurons on astrocyte monolayer have well branched neurites(C, arrow heads).

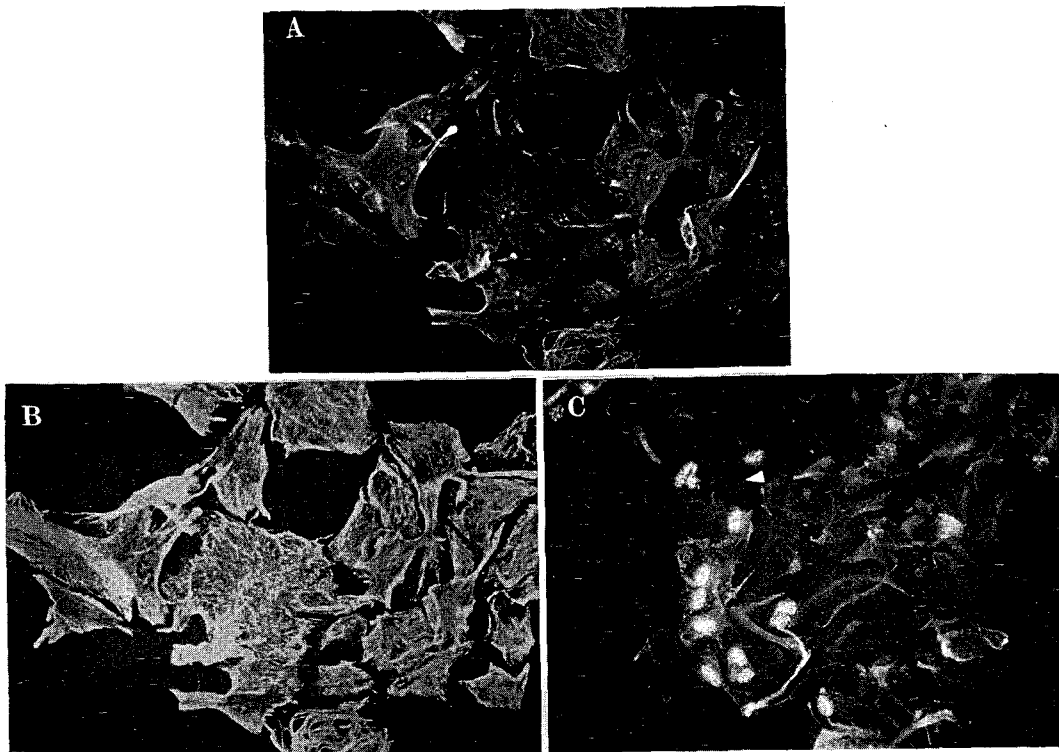


Fig. 6. Immunofluorescence microscopic appearances of glutamate exposed co-cultured neurons and astrocytes($\times 200$).

Double immunocytochemistry of vimentin(A) and GFAP(B) were performed.

Astrocytes expressed vimentin(A) and GFAP(B) moderately to strongly. Co-cultured neurons on astrocytes monolayer lost their neurites(C, arrow heads).

Table 1. Immunostain observation of GFAP and vimentin expression in astrocytes

| | Astrocyte culture | Astrocyte-neuron coculture | Glutamate exposed astrocyte - neuron coculture |
|----------|-------------------|----------------------------|--|
| GFAP | strong | negative ~ moderate | moderate ~ strong |
| vimentin | strong | weak ~ moderate | moderate ~ strong |

가 감소된 것을 볼 수 있었다(Fig. 5A, B). 별아교세포-신경세포 동시 배양시 neurofilament와 GFAP에 대한 이중 면역화학 염색을 시행하여 Fig. 5C, D에 나타내었다. 별아교세포층 위에서 배양된 신경세포에서 많은 신경축삭을 볼 수 있었으며 동시 배양된 별아교세포에서는 GFAP 발현율이 감소된 것을 볼 수 있었다(Fig. 5C, D).

별아교세포-신경세포 동시 배양 후 glutamate 처리로 신경세포를 손상시키면 별아교세포의 GFAP와 vimentin 발현은 동시배양시의 별아교세포에 비해 증가되었다(Fig. 6A, B). 신경세포를 glutamate로 처리하여 손상시킨

후 neurofilament와 GFAP에 대한 이중 면역화학 염색을 시행하여 Fig. 6C, D에 나타내었다. Glutamate 처리 후에는 대부분의 신경축삭이 소실되었으며 기저층에 있는 별아교세포의 GFAP 발현은 신경세포 손상 전에 비해 증가되었다.

별아교세포 단독배양시, 별아교세포-신경세포 동시 배양시, glutamate 처리로 신경세포를 손상시킨 후 별아교세포의 vimentin과 GFAP발현율을 Table 1에 요약하여 나타내었다.

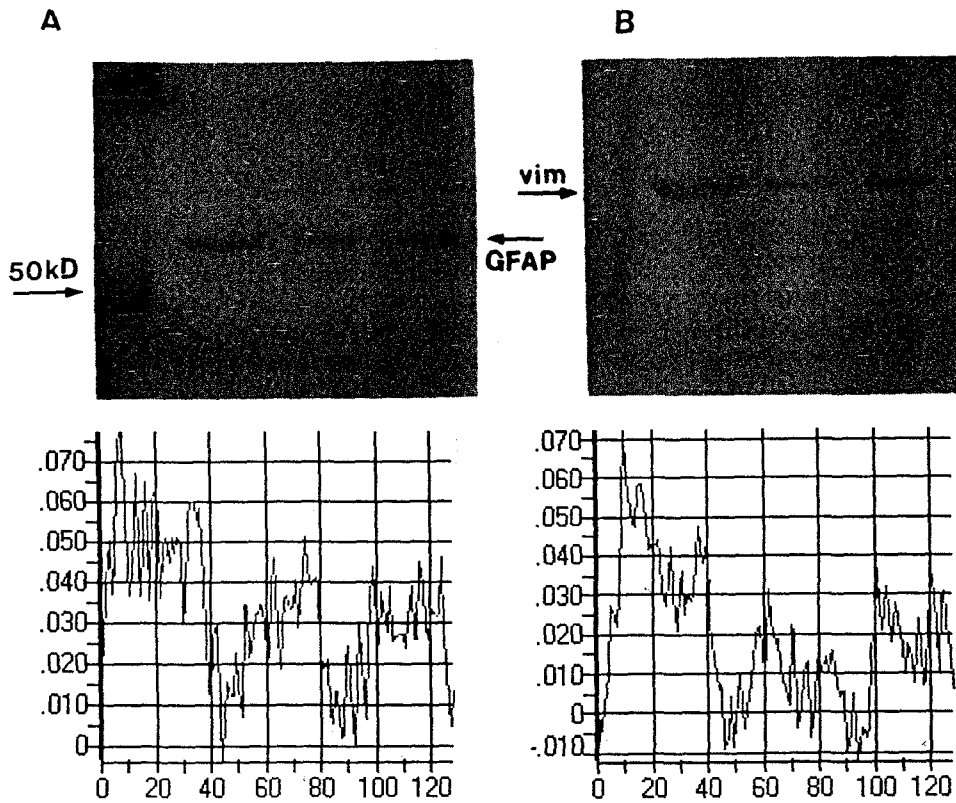


Fig. 7. Western blot analysis of GFAP(A) and vimentin(B) contents in cultured astrocytes(left lane), co-cultured astrocytes with neurons(mid lane), glutamate exposed co-culture astrocytes with neurons(right lane).

GFAP and vimentin contents in astrocytes were measured using Image Pro program.

Table 2. Western blot results of GFAP and vimentin contents in astrocytes
Unit (%): calculated values of arbitrary optical density unit and band width

| | Astrocyte culture | Astrocyte-neuron coculture | Glutamate exposed astrocyte - neuron coculture |
|----------|------------------------|----------------------------|--|
| GFAP | 2.73 ± 0.41 (100 %) | 1.81 ± 0.32* (66 %) | 2.19 ± 0.62 (80 %) |
| vimentin | 3.52 ± 0.67 (100 %) | 1.76 ± 0.55* (50 %) | 3.03 ± 0.74 (86 %) |

Data are expressed as mean ± SE(n = 4). Asterisks indicate values significantly different from the values of astrocyte culture group.

별아교세포-신경세포 동시 배양이 별아교세포내 GFAP 및 vimentin 함량에 미치는 영향

별아교세포 단독 배양시, 별아교세포-신경세포 동시

배양시, glutamate 처리로 신경세포를 손상시킨 후 별아교세포의 GFAP와 vimentin 함량을 Western blot으로 측정하여 Fig. 7에 나타내었다.

별아교세포내 GFAP(Fig. 7A 상단) 및 vimentin 함량

(Fig. 7B 상단)은 별아교세포 단독배양시(좌측 lane)에 비해 별아교세포-신경세포 동시 배양시(중간 lane) 감소하였으며 신경세포 손상 후에는(우측 lane) 다시 증가하는 양상을 보였다.

Western blot으로 측정된 별아교세포내 GFAP 및 vimentin 함량을 Image Pro program으로 density(Fig. 7A, B 하단)와 band두께를 측정하여 상대적인 양으로 환산한 값을 Table 2에 나타내었다.

고 찰

반응성 아교증식증은 중추신경계 신경 재생에 물리적 장애 요인으로 작용하나 반응성 아교 증식증을 구성하는 별아교세포 자체는 안정 별아교세포와는 달리 여러 종류의 cytokine을 분비한다(Ferrara et al, 1988; Manthorpe et al, 1989). 반응성 별아교세포에서 분비되는 대부분의 cytokine은 신경세포의 생존율을 증가시키며, 또 신경축삭의 성장을 촉진시키는 작용이 있다(McMillian et al, 1994). 반응성 별아교세포는 세포내 GFAP의 함량이 증가하는 등 형태학적인 변화가 일어나는 것 외에도 생화학, 생리학적 변화도 일어난다. 즉 반응성 별아교세포에는 안정 별아교세포와는 달리 EGF receptor, microtubule-associated protein 2(MAP 2), β -amyloid precursor protein 등이 발현된다(Geistert et al, 1989). 또 반응성 아교 증식증이 일어나는 부위에서 미세아교세포의 증식도 일어난다(Giulian & Baker, 1985). 증식된 미세아교세포는 손상 조직을 탐식하며 또 여러 종류의 cytokine을 분비하기도 한다. 특히 활성화된 미세아교세포에서 분비되는 interleukin-1(IL-1)이나 tumor necrosis factor(TNF)는 반응성 별아교세포에서 분비되는 cytokine과는 달리 신경세포 재생을 억제하고 별아교세포의 증식은 촉진시킨다(Giulian et al, 1988; Oh et al, 1993).

중추 신경계의 신경 재생을 촉진시키고자 또는 중추 신경계 손상시 신경 손상을 최소화 하고자 하는 목적으로 반응성 아교 증식증의 기전에 대한 많은 연구가 진행되어왔다(Reier & Houle, 1994). 즉 배양된 별아교세포에 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6, tetrahydro-pyridine (MPTP) 등 여러 약물을 투여하거나(O'Callaghan, 1993), 저산소 증을 유발시켜 반응성 아교증식증을 유발시키는 것처럼 배양된 별아교세포를 반응성 아교 세포증의 모델로 이용하기도 한다. 그러나 배양된 별아교세포내 GFAP 함량은 생체내 별아교세포의 GFAP 함량보다 매우 높은 등 그 특성이 안정 별아교세포 보다는 반응성 별아교세포의 특성에 가까운 것으로 알려졌다(Monnet-Tschudi & Honneger,

1989; Oh et al, 1993). 따라서 배양된 별아교세포를 반응성 아교 증식증의 직접적인 모델로 이용하기에는 한계가 있다.

또 반응성 아교 증식증의 모델로 반응성 별아교세포를 순수 분리하여 배양하는 방법도 있으나 반응성 별아교세포는 분리 과정중에 많은 수의 세포가 손상을 받고, 반응성 별아교세포만을 순수 분리하여 배양하는 것이 현재로는 불가능하다(Wandosell et al, 1993). 또 반응성 별아교세포를 일차 배양 하더라도 이 세포의 형태 및 기능은 안정 별아교세포를 일차 배양했을 때와 거의 유사한 것으로 알려졌다기 때문에 반응성 별아교세포를 배양하는 경우는 거의 보고되지 않았다(McKeon et al, 1991; Oh et al, 1992, 1993). 이외에도 생체내에서는 미세아교세포에서 여러 종류의 신경 세포 성장을 억제시키는 cytokine을 분비하며, 미세아교세포-별아교세포간의 상호 작용은 별아교세포의 세포막에 있는 세포외 기질의 조성을 변동시키는 등(Fernaund-Espinosa et al, 1994) 중추신경계의 세포들간의 생체내의 복합적인 작용을 배양시 재현하기가 어렵기 때문이다.

반응성 아교 증식증의 기전에는 미세아교세포에서 분비되는 IL-1과 TNF가 관여하는 것으로 보고되었다(Giulian & Baker, 1985; Giulian et al, 1988). 즉 중추신경계 손상 부위에는 IL-1과 TNF의 농도가 높으며, 별아교세포 배양시 IL-1이나 TNF를 처리하면 별아교세포의 증식율이 증가한다(Oh et al, 1993). 또 IL-1이나 TNF를 중추 신경계에 주입하면 주입부위에서 반응성 아교증식증이 일어나는 것으로 보고 되었다(Giulian et al, 1988). 그러나 별아교세포는 EGF(Raff et al, 1983a, b), fibroblast growth factor(Pettmann et al, 1985), thrombin(Perraud et al, 1987), platelet derived growth factor(Besnard et al, 1987)에 의해서도 증식이 일어나는 등, IL-1이나 TNF에 의해서만 반응성 아교 증식증이 일어나는 것은 아닌 것으로 알려졌다. 또 반응성 아교 증식증은 별아교세포 자체의 손상이나 희소 돌기아교세포의 손상시에도 일어나는 것으로 보고되었다(Smith et al, 1983; Takada et al, 1990). 이처럼 반응성 아교 증식증의 기전은 아직 확실히 밝혀지지 않았으며, 여러 기전이 복합적으로 작용하는 것으로 알려졌다(McMillian et al, 1994; Reier & Houle, 1994).

반응성 아교 증식증은 돌기형 별아교세포(process bearing astrocyte, 또는 type II astrocyte)에서는 일어나지 않고 다각형 별아교세포(polygonal shape astrocyte, 또는 type I astrocyte)에서만 일어나는 것으로 알려졌다(Miller et al, 1986; Godfraind et al, 1989). 배양된 별아교세포는 크게 돌기형 별아교세포와 다각형 별아교세포로 분류된다(Godfraind et al, 1989; Oh et al, 1992). 다각형 별아교세포

는 배양시 단층(monolayer)을 이룰때까지 계속 증식 및 세포비대가 일어나며 돌기형 별아교세포는 다각형 별아교세포 위에서 많은 돌기를 내면서 배양된다. 배양된 세포들의 이러한 분류 방법이 생체내의 원형질성 별아교세포(protooplasmic astrocytes) 또는 섬유성 별아교세포(fibrous astrocytes)의 분류 방법에 해당되는 지는 아직 확실하지 않다. 본 실험에서는 별아교세포를 일차배양후 orbital shaker를 이용하여 돌기형 별아교세포는 제거하고 다각형 별아교세포를 얻은 다음 이 다각형 별아교세포만을 재배양하는 방법을 이용하였다.

본 실험에서 다각형 별아교세포와 신경세포를 동시에 배양했을때 모든 별아교세포에서 GFAP와 vimentin 발현율이 감소되지는 않았는데(Fig. 5A, B) 이는 다음 원인에 의했을 것으로 생각된다.

첫째 별아교세포-신경세포 동시 배양시 별아교세포중 일부는 신경세포와 직접 접촉되지 않았기 때문일 가능성이 있다. 신경세포 및 별아교세포의 분화과정에는 세포간의 접촉 또는 세포외 기질이 관여하는 것으로 알려졌다. 즉 발생기시 신경세포는 radial glial cell 등의 세포외 기질인 laminin, type IV collagen, entactin 등에 부착되어 이동되면서 분화가 일어나는 것으로 보고되었다(Sephel et al, 1989). 또 Vige 등 (1992)은 대뇌피질 신경세포-별아교세포 동시 배양시 별아교세포에서의 NGF와 enkephalin 생성이 감소하는 반면 별아교세포 단독 배양시 신경세포 배양액(conditional medium)을 처리하면 별아교세포에서 NGF와 enkephalin 생성이 계속 높게 유지되는 것으로 보아 배양된 별아교세포에서의 NGF와 enkephalin 생성은 신경세포에서 분비되는 물질보다는 별아교세포와 신경세포간의 직접적인 접촉이 관여한다고 보고한 바도 있다.

둘째 별아교세포-신경세포간의 직접 접촉에 따라 신경세포에서 분비되는 신경 전달 물질 또는 신경영양인자(neurotrophic factor)에 의해 그 영향이 나타났을 가능성이 있다. 예를들어 신경이 절단되어 acetylcholine 또는 신경영양인자의 근육으로의 전달이 차단되면 그 신경이 지배하고 있는 근육이 퇴화되며, 또 실험적으로 근육을 절제하면 그 근육을 지배하는 운동신경의 퇴화가 오는데 이는 근육에서도 신경의 분화 및 성장에 영향을 주는 신경영양인자가 생성되기 때문인 것으로 알려졌다(Davis, 1983; Heinicke & Davis, 1985). 별아교세포는 신경세포에서 분비되는 신경전달물질을 섭취하기도 하며 또 별아교세포와 신경세포간에 상호 영향을 주는 신경영양인자의 존재가 보고된 바도 있다(Schwartz et al, 1993). 따라서 신경세포가 접촉되지않은 일부 별아교세포에서 GFAP 및 vimentin 함량감소가 나타나지 않았을 가능성이 있을 것으로 생각된다.

셋째 다각형 별아교세포의 아군(subpopulation)에 따라 신경세포에 의한 영향이 다르게 나타났기 때문일 가능성이 있다. 즉 같은 형태의 다각형 별아교세포라도 α -adrenergic receptor의 발현 유무(Lerea & McCarthy, 1989), γ -interferon에 의한 major histocompatibility complex(MHC) class II antigen의 induction 여부(Wong et al, 1984), α_2 -macroglobulin의 합성능력 여부(Gebicke-Haerter et al, 1987), 또 glutamate를 glutamine으로 전환시키는 glutamine synthetase의 존재 여부(Hallmayer & Hamprecht, 1984)에 따라 세포학적, 생리학적 기능이 다른 다각형 별아교세포가 존재하는 것으로 알려졌다. 아직까지 별아교세포의 아군이 체계적으로 분류되지는 않았지만 신경세포에서 분비되는 어떤 cytokine이 특정 별아교세포의 subpopulation에만 영향을 주었기 때문일 가능성도 있다. 그러나 본 실험 결과만으로 어떤 기전으로 신경세포에 의해 별아교세포의 GFAP 및 vimentin의 감소가 선택적으로 나타났는지는 알수 없고 이는 추후 연구할 과제로 생각된다.

동시 배양된 별아교세포-신경세포를 glutamate에 2시간 노출시켜 신경세포를 손상시켰을때 별아교세포의 GFAP 및 vimentin 발현율과 함량은 다시 증가하였다(Fig. 6A, B). 반면에 별아교세포를 단독 배양하고 여기에 glutamate를 처리했을 때는 별아교세포의 GFAP 및 vimentin 발현율에는 차이가 없었다(결과는 나타나지 않았음). 따라서 glutamate처리로 신경세포 손상후 별아교세포의 GFAP 및 vimentin 발현율이 증가한 것은 glutamate에 의한 효과는 아니며, 이는 생체내에서 신경세포 손상후 별아교세포의 GFAP 발현이 증가하는 과정과 비슷한 기전으로 나타났을 가능성이 있을 것으로 생각된다.

별아교세포-신경세포 동시 배양시에는 별아교세포 단독 배양시에 비해 별아교세포내 GFAP와 vimentin 함량은 감소하며, 신경세포 손상후에는 GFAP와 vimentin 함량이 다시 증가한 실험 결과는 해마 신경세포-별아교세포 동시 배양 모델이 별아교세포의 GFAP 및 vimentin 발현에 영향을 주는 요인을 연구할 때의 생체외 반응성 야교 증식증의 모델로 이용될 수 있음을 암시한다.

GFAP는 별아교세포에 특징적으로 존재하는 50 kd의 세포 골격 단백질이며, vimentin은 mesenchymal 세포에서 유래된 세포나 분화중인 세포에서 발견되는 세포 골격 단백질이다(Oh et al, 1993). 별아교세포내 GFAP와 vimentin 함량의 감소는 별아교세포의 성숙지표로 이용되기도 한다(Monnet-Tschudi & Honneger, 1989; Langan & Slater, 1992). 즉, 태아기때는 별아교세포는 GFAP 및 vimentin의 발현율이 높으며 성인에서의 별아교세포의 GFAP 및 vimentin 발현율은 낮아진다(Raff et al, 1983b).

별아교세포는 생체외에서도 성숙이 일어날 수 있다.

즉 Yeon 등(1993)과 von Visger 등(1994)은 EGF를 이용하여 별아교세포의 GFAP 및 vimentin의 발현을 감소시킨 결과를 보고한 바 있다. 또 별아교세포를 부유 배양(aggregation culture)하면 별아교세포내 GFAP와 vimentin 함량이 감소하며 별아교세포가 성숙되는 것으로 보고되었다(Monnet-Tschudi & Honneger, 1989). 또 별아교세포-신경세포 동시 배양시에는 별아교세포 단독 배양시에 비해 GFAP 및 vimentin 함량이 감소되었는데(Fig. 5A, B) 이는 별아교세포-신경세포 동시 방법으로도 별아교세포가 성숙될 수 있음을 암시한다.

이상의 실험결과로 보아 해마 신경세포-별아교세포 동시 배양 모델은 별아교세포의 GFAP 및 vimentin 발현에 영향을 주는 요인을 연구할 때의 생체의 반응성 아교 증식증의 모델뿐 아니라 별아교세포의 생체의 성숙 과정을 연구하는 모델로도 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Alho H, Ferrarese C, Vicini S, Vaccarino F. Subsets of GABAergic neurons in dissociated cell cultures of neonatal rat cerebral cortex show co-localization with specific modulator peptide. *Dev Brain Res* 39: 193-209, 1988
- Banker GA. Trophic interactions between astroglial cells and hippocampal neurons in culture. *Science* 209: 809-810, 1980
- Berry M, Maxwell WR, Logan A, Mathewson A. Deposition of scar in the central nervous system. *Acta Neurochir [Suppl]* 32: 31-52, 1983
- Besnard F, Perraud F, Sensenbrenner M, Laboardette G. Platelet derived growth factor is a mitogen for glial but not for neuronal rat brain cells in vitro. *Neurosci Lett* 73: 287-292, 1987
- Callaghan DJ, Engle MJ, Volpe JJ. Hypoxic injury to developing glial cells. *Pediatr Res* 27: 186-190, 1990
- Davis HL. Trophic action of nerve extract on denervated skeletal muscle in vivo. *Exp Neurol* 80: 383-387, 1983
- Eng LF. Experimental models for astrocytes activation and fibrous gliosis. In Althaus HH, Seifert W, eds. *Glial-neuronal communication in development and regeneration*. Heidelberg, Springer-Verlag, 1987, pp 27-40
- Fedoroff S, MacAuley WAJ, Houle JD, Devon RM. Astrocytes cell lineage: Similarity of astrocytes that form in the presence of dBcAMP in cultures to reactive astrocytes in vivo. *J Neurosci Res* 12: 15-27, 1984
- Fernaund-Espinosa I, Nieto-Sampedro M, Bovolenta P. Differential expression of reactive astrocytes and microglial cells in aniso- and isomorphic gliotic tissue. *Glia* 10: 126-134, 1994
- Ferrara N, Ousley F, Gospodarowicz D. Bovine brain astrocytes express basic fibroblast growth factor, a neurotropic and angiogenic mitogen. *Brain Res* 462: 223-232, 1988
- Gasser UE, Hatten ME. Neuron-glia interactions of rat hippocampal cells in vitro: Glial-guided neuronal migration and neuronal regulation of glial differentiation. *J Neurosci* 10: 1276-1285, 1990
- Gebicke-Haerter PJ, Bauer J, Brenner A, Gerok W. α 2-macroglobulin synthesis in an astrocyte subpopulation. *J Neurochem* 498: 1139-1145, 1987
- Geistert EE, Johnson HG, Binder LI. Expression of microtubule associated protein 2 by reactive astrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3967-3971, 1989
- Giulian D. Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system. *J Neurosci Res* 18: 155-171, 1987
- Giulian D, Baker TJ. Peptides released by ameboid microglia regulate astroglial proliferation. *J Cell Biol* 101: 2411-2415, 1985
- Giulian D, Woodward J, Young DG, Krebs JF, Lachman LB. Interleukin-1 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *J Neuroscience* 8: 2485-2490, 1988
- Godfraind C, Friedrich VL, Holmes KV, Dubois-Dalcq M. In vivo analysis of glial cell phenotypes during a viral demyelinating disease in mice. *J Cell Biol* 109: 2405-2416, 1989
- Hallermayer K, Hamprecht B. Cellular heterogeneity in primary cultures of brain cells revealed by immunocytochemical localization of glutamine synthetase. *Brain Res* 295: 1-11, 1984
- Hatten ME. Neuronal regulation of astroglial morphology and proliferation in vitro. *J Cell Biol* 100: 384-396, 1985
- Hatten ME, Lynch M, Rydel RE, Sanchez J. In vitro neurite extension by granule neurons is dependent upon astroglial-derived fibroblast growth factor. *Dev Biol* 125: 280-289, 1988
- Heinicke EA, Davis HL. Soluble proteins of rat muscle: effects of denervation and nerve extract. *Brain Res* 343: 176-181, 1985
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970
- Langan TJ, Slater MC. Astrocytes derived from long-term primary cultures recapitulate features of astrogliosis as they re-enter the cell division cycle. *Brain Res* 577: 200-209, 1992
- Lerea LS, McCarthy KD. Astroglial cells in vitro are hetero-

- geneous with respect to expression of the α -adrenergic receptor. *Glia* 2: 135–147, 1989
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Fan AL, Randall RT. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 263–275, 1951
- Manthrope M, Ray J, Pettmann B, Varon S. Ciliary neurotrophic factors. In Rush RA, ed. *Nerve growth factors*. New York, Wiley, 1989, pp 31–56
- McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 85: 890–902, 1980
- McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS, Silver J. Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J Neurosci* 11: 3398–3411, 1991
- McMillian MK, Thj L, Hong JS, O'Callaghan JP, Pennypacker KR. Brain injury in a dish. *Trends Neurosci* 17: 138–192, 1994
- Mearow KM, Mill JF, Freese E. Neuron-glial interaction involved in the regulation of glutamine synthetase. *Glia* 3: 385–392, 1990
- Miller RH, Abney ER, Davis HL, Raff MC. Is reactive gliosis a property of a distinct subpopulation of astrocytes? *J Neurosci* 6: 22–29, 1986
- Monnet-Tschudi F, Honneger P. Influence of epidermal growth factor on the maturation of fetal rat brain cells in aggregate culture. *Dev Neurosci* 11: 30–40, 1989
- O'Callaghan JP. Quantitative features of reactive gliosis following toxicant induced damage of the CNS. *Ann N Y Acad Sci* 679: 195–210, 1993
- Oh YJ, Francis JW, Markelonis GJ, Oh TH. Interleukin-1 and tumor necrosis factor increase peripheral-type benzodiazepine binding sites in cultured polygonal astrocytes. *J Neurochem* 58: 2131–2138, 1992
- Oh YJ, Markelonis GJ, Oh TH. Effects of interleukin-1 β and tumor necrosis factor on the expression of glial fibrillary acidic protein and transferrin in cultured astrocytes. *Glia* 8: 77–86, 1993
- Perraud F, Besnard F, Sensenbrenner M, Lobourdet G. Thrombin is a potent mitogen for rat astroblasts but not for oligodendroblast and neuroblast in primary culture. *Int J Dev Neurosci* 5: 181–188, 1987
- Pettmann B, Weibel M, Sensenbrenner M. Purification of two astroglial growth factors from bovine brain. *FEBS Lett* 189: 102–108, 1985
- Raff MC, Abney ER, Cohen J, Lindsay R, Noble M. Two types of astrocytes in culture of developing rat white matter: Differences in morphology, surface gangliosides, and growth characteristics. *J Neurosci* 3: 1289–1300, 1983a
- Raff MC, Miller RH, Noble M. A glial progenitor cell that develops in vitro an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 303: 390–396, 1983b
- Reier PJ, Houle JD. The glial scar: It's bearing on axonal elongation and transplantation approaches to CNS repair. In Waxman SG, ed. *Adv Neurol* 47: 87–155, 1994
- Schwartz JP, Sheng JG, Mitsuo K. Trophic factor production by reactive astrocytes in injured brain. *Ann N Y Acad Sci* 679: 226–235, 1993
- Sephel GC, Burrous BA, Kleinman HK. Laminin: Neural activity and binding proteins. *Dev Neurosci* 11: 313–331, 1989
- Siver J, Sidman RL. A mechanism for the guidance and topographic patterning of retinal ganglion cell axon. *J Comp Neurol* 189: 101–111, 1980
- Smith ME, Somera FP, Eng LF. Immunocytochemical staining for glial fibrillary acidic protein and the metabolism of cytoskeletal proteins in experimental allergic encephalomyelitis. *Brain Res* 264: 241–253, 1983
- Stewart MG, Bourne RC, Gabbott PLA. Decreased levels of an astrocytic marker, glial fibrillary acidic protein, in the visual cortex of dark-reared rat. *Neurosci Lett* 63: 147–152, 1986
- Takada M, Li ZK, Hattori T. Astroglial cells prevent MPTP-induced nigrostriatal neuronal death. *Brain Res* 509: 55–61, 1990
- Towbin H, Stachelm T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 4350–4356, 1979
- Vige X, Tang B, Wise BC. Cortical neurons inhibits basal and interleukin-1 stimulated astroglial cell secretion of nerve growth factor. *Brain Res* 591: 345–350, 1992
- von Visger JR, Yeon DS, Oh TH, Markelonis GJ. Differentiation and maturation of astrocytes derived from neuroepithelial progenitor cells in culture. *Exp Neurol* 128: 39–40, 1994
- Wandosell F, Bovolenta P, Nieto-Sampedro M. Differences between reactive astrocytes and cultured astrocytes treated with di-butyl-cAMP. *J Neuropathol Exp Neurol* 52: 205–215, 1993
- Wong G HW, Bartlett PF, Clark-Lewis I, Schrader JW. Inducible expression of H-2 and Ia antigens on brain cells. *Nature* 310: 688–691, 1984
- Yeon DS, von Visger JR, Oh TH, Markelonis GJ. Differentiation of EGF responsive stem cells from newborn rat forebrain in culture (Abstract). *Soc Neurosci* 370: 4, 1993