

# Transforming growth factor $\beta_1$ 이 배양래트 신경교세포의 성장 및 생화학적 변화에 미치는 영향

서울대학교 의과대학 약리학교실

김용식 · 윤용하 · 박난향 · 박찬웅

= Abstract =

## Effects of TGF $\beta_1$ on the Growth and Biochemical Changes in Cultured Rat Glial Cells

Yong Sik Kim, Yong Ha Youn, Nan Hyang Park and Chan Woong Park

*Department of Pharmacology, College of Medicine  
Seoul National University, Seoul 110-799, Korea*

Recent evidence indicates that glial cells have a wide range of functions which are critical for maintaining a balanced homeostatic environment in the central nervous system (CNS) peripheral nervous system(PNS). Moreover, astrocytes are known to participate in the tissue repair and neuroimmunologic events within the CNS through many kinds of growth factors and cytokines. We investigated the effect of TGF  $\beta_1$  on the growth and biochemical changes of rat glial cells in culture. The proliferative effect was determined by  $^3\text{H}$ -thymidine uptake and the double immunostain with anti-cell-specific marker and anti-Bromodeoxyuridine(BrdU) antibody. To check the effect of biochemical changes we compared the amounts of glial fibrillar acidic protein(GFAP) and the activity of glutamine synthetase(GS) in astrocyte. And the amounts of myelin basic protein and the activity of 2',3'-cyclic nucleotide phosphohydrolase(CNPase) were measured in oligodendrocyte and the amounts of peripheral myelin in Schwann cell. When TGF  $\beta_1$  was treated for 2 days with cultured glial cell, TGF  $\beta_1$  decreased the  $^3\text{H}$ -thymidine uptake and proliferation index of double immunostain of astrocytes, which indicates the inhibition of astroglial DNA synthesis, but stimulated the growth of Schwann cell. Also, TGF  $\beta_1$  decrease the GS activity and increased the amounts of GFAP in astrocyte. In the case of Schwann cells the amounts of peripheral myelin was increased when treated with TGF  $\beta_1$ . However, TGF  $\beta_1$  didn't show any effect on the proliferation and biochemical changes in oligodendrocyte. These results suggest that TGF  $\beta_1$  might have a critical action in the regulation of proliferation and biochemical changes in glial cells, especially astrocyte.

**Key Words:** 신경교세포, TGF  $\beta_1$ , 성장, GFAP

\*이 논문은 1992년 교육부 기초의학 학술연구 조성비와 1994년도 서울대학교 병원 임상연구비의 지원으로 이루어 졌음.

## 서 론

Transforming growth factor  $\beta$ (TGF $\beta$ )는 cytokine의 일종으로 70년대 말 Maloney sarcoma virus에 의해 변형된 마우스 3T3 세포에서 생산되고 세포외로 분비되는 polypeptide로 처음 sarcoma growth factor(SGF)로 언급되었으며(DeLarco and Todaro, 1978) 정상 NRK 세포의 형태학적 변형 및 anchorage-비의존성(independent) 성장을 촉진시킨다고 알려졌다(Roberts 등, 1980). 그 후 SGF는 TGF $\alpha$ 와 TGF $\beta$ 의 각기 다른 작용을 갖는 두 성분으로 구성되어 있는 것으로 보고 되었고(Anzano 등, 1980) 그 외에도 소 골격, 인체 glioblastoma, 돼지 platelet에서 분리되는 등 대부분의 조직 및 세포에서 검출되고(Childs 등, 1982; Robert 등, 1981; Seyedin, 1987; Wrann, 1987) 지금까지 TGF는 3가지 이상의 형태 즉 TGF $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  등이 있다고 보고 되었다(Roberts and Sporn, 1990).

TGF $\beta$ 의 생리학적 기능은 초기에는 변형세포에서 분비되어 transformed phenotype을 유지하는 것이 중요한 역할이라고 믿어졌으나(DeLarco and Todaro, 1978) 최근에는 Xenopus 태아에서 mesodermal mark의 초기 발달에 관여하는 등 태생기 형태학적 발달 과정에 관여하며, 신생마우스의 섬유아세포와 osteoblast에 대한 증식효과를 나타내지만(Robey 등, 1987), 표피세포, 혈관내피세포와 여러 악성세포에서 성숙을 억제하고 분화를 촉진시킨다고 보고되고 있다(Roberts 등, 1985; Tucker 등, 1984). 또한 면역계 세포에 작용하여 T와 B 림프구 활성을 억제하고, monocyte/macrophage에 대해 강력한 화학주성(chemotaxis) 효과를 가지며, interleukin을 포함한 여러 cytokine과의 상호작용을 통해 염증반응 및 조직손상 후 회복과 관련된 작용을 보이는 등 다양한 효과를 나타낸다고 알려지고 있다(Kehrl 등, 1986a,b; Sporn and Roberts, 1989; Wahl 등, 1987). 그 외에도 심근세포에서 TGF $\beta$ 의 역할이 특히 심근

경색후 심근손상의 회복과 관련지어 연구가 되고 있는 실정이다(Thompson 등, 1988).

그러나 신경계에 대한 TGF $\beta$ 의 연구보고는 TGF $\beta_1$ 을 포함한  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ 가 랫트 태아 및 성인 뇌 그리고 말초신 경조직에서 전반적으로 분포되어 있고(Kathleen 등, 1990), glioblastoma 환자에서 TGF $\beta_1$ 이 분비되어 생체 면역기전을 억제함으로써 암세포 증식이 유지된다는 보고가 있으나, TGF $\beta$ 의 신경교세포에 대한 생리적 작용에 대한 연구는 랫트 astrocyte의 증식을 억제하고 생화학적 분화를 유도한다는 보고(Toru-Delbauffe 등, 1990)와 Schwann cell의 증식을 조절한다는 보고(Eccleston 등, 1989; Ridley 등, 1989) 이외에는 거의 없는 실정임으로 말초 및 중추신경계의 발달과정 및 그 기능조절에 대한 연구의 일환으로 cytokine의 하나인 TGF $\beta_1$ 가 신경교세포의 성장과 생화학적 변화에 어떠한 영향을 미치는지를 검토해 보고자 하였다.

## 방법 및 재료

### 1. 재 료

DMEM(Dulbecco's modified Eagle's Medium, Gibco), 그리고 glucose, glutamine, 항생제(penicillin G-streptomycin-amphotericin B), trypsin, DNase, Bromodeoxyuridine(BrdU)와 poly-L-lysine은 Sigma제를 사용하였고, TGF- $\beta$ 은 사람 유전자재조합으로 얻어진 제품(Genzyme Co.)을, 세포특이 marker로 rabbit anti-GFAP(glia fibrillar acidic protein)은 Sigma제품, rabbit anti-myelin basic protein(MBP)은 Dakopatt, rabbit anti-peripheral myelin과 mouse anti-BrdU는 Monosan제품을 사용하였다. 2차 antibody인 goat anti-mouse IgG-Rho, goat anti-rabbit IgG-FITC은 Boehringer Mannheim,  $^3\text{H}$ -thymidine은 NEN, 배양용기는 Falcon 제품을 사용하였다.

## 2. 방 법

### 가. 신생 랫트 대뇌세포의 일차배양

생후 1~2일된 Sprague-Dawley 랫트를 사용하여, 뇌를 분리하고  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ 이 들어 있지 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 mm<sup>3</sup> 되게 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 들어있는 용액을 제거하고 10% fetal bovine serum(FBS), 그리고 6 mg/ml glucose, 2 mM glutamine과 50 U/ml penicillin, 50 µg/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 I 을 첨가하여 사용하고, myelin debris를 제거하기 위해 30% Percoll 용액에 load하여 4°C에서 15,000 xg로 30분간 원심분리한다. 분리된 세포는 800 xg에서 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 µg/ml poly-L-lysine으로 도포된 75 cm<sup>2</sup> 배양 flask에 세포수가  $2 \times 10^7$  되게 넣은 후 SSM을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>와 95% air 그리고 100% 습도가 유지된 CO<sub>2</sub> incubator (Forma)에서 세포배양을 시작한다. 배양 4일에 그리고 그 후 일주일에 2번씩 SSM을 사용하여 배양 액을 교환한다.

### 나. 신경교세포의 분리, 배양

일차 배양세포는 신경교세포 이외에도 fibro-

blast, endothelial cell, microglia 및 소수의 neuron등이 같이 존재하여, 이들 세포중 type 1 astrocyte와 fibroblast는 culture flask에 견고히 붙어서 자라게 되고, 이들 세포 위에서 process를 갖는 phase-dark한 작은 세포를 관찰할 수 있으며 이들 세포가 주로 0-2A precursor와 oligodendrocyte 또는 type 2 astrocyte이다. 그러므로 각 type의 신경 교세포는 Saneto and De Vellis (1987)의 방법을 사용하여 분리한다.

**1) 신생 랫트 oligodendrocyte 배양:** 일차 배양된 세포가 confluent 해지도록 10일 정도 기다린 후 배양 10~14일 에 SSM을 다시 교환하고 rotary shaker(Labline orbit shaker)를 사용하여 37°C에서 250 rpm으로 1시간 진탕시킨 후 배양액을 제거하고, 다시 SSM을 첨가한 후 37°C에서 300 rpm에서 6시간 동안 진탕시킨다. 이 동안 배양액으로 떨어져 나온 세포를 모으고 다시 SSM을 첨가하여 16~18시간 진탕한 후 배양액을 함께 모은 다음 33 µm nylon mesh에 통과시킨 후 800 xg에서 10분간 원심분리한다. 상층액을 버리고 cell pellet을 SSM으로 부유한 후 한번 더 nylon mesh로 여과하고, 그후 세포수를 측정 한 다음  $2 \times 10^5/cm^2$ 되게 배양 용기에 또는 9 mm Aclar coverslip에  $2 \times 10^4$ 되게 세포를 넣고 배양 한다.

Oligodendrocyte-enriched culture는 상기 방법으로 얻어진 세포를 serum-free media(DMEM/Ham's F12에 10 µg/ml bovine insulin, 5 µg/ml human transferrin, 10 ng/ml biotin, 30 nM sodium selenite와 penicillin-streptomycin이 들어있는 배양액: 이하 SFM)에서 4일동안 더 배양한 후 실험에 사용한다.

**2) Astrocyte 배양:** Astrocyte는 앞에서 기술한 oligodendrocyte 분리중 flask에 계속 붙어 있게 됨으로 flask에 SSM을 첨가하고 300 rpm에서 4시간동안 다시 진탕시켜, 일부 돌기를 갖고 있는 세포들을 다시 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  $1.2 \times 10^4$  되게 넣어 배양한다.

**3) Schwann cell의 분리 및 배양:** 생후 1~2일된 랫트의 dorsal root ganglion을 분리한 후 신생랫트 대뇌세포의 일차 배양과 같은 방법으로 분리세포를 얻은 후 세포수를 측정하고  $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ 되게 배양용기에 또는 9 mm coverslip에  $2 \times 10^4$ 되게 세포를 배양한다. 이때 배양액에 NGF를 첨가하지 않으면 신경절(ganglion) 신경세포는 7~10일 후 소멸하게 되므로 Schwann cell을 분리할 수 있으며, 이후 astrocyte와 동일 조건으로 배양된다.

#### 다. 신경교세포의 성장에 대한 TGF $\beta_1$ 의 효과 측정

성장효과는  $^3\text{H}$ -thymidine uptake방법(Saneto and DeVillis, 1987)과 bromodeoxyuridine (BrdU)과 세포 특이 marker에 대한 항체를 사용하여 double immunostain 방법(Yong 등, 1988)을 사용하여 측정한다.

**1)  $^3\text{H}$ -thymidine uptake:** 분리된 각 신경교세포를 24 well plate에 넣어 배양한 후 배양액에 일정 농도의 TGF $\beta_1$ 을 첨가하여 2일동안 반응시킨다. 반응 마지막 6시간 동안 동일 배양액에  $^3\text{H}$ -thymidine(1 Ci/ml)를 첨가한 후 배양액을 제거하고 세포를 ice-cold PBS로 세척한 후 10% trichloroacetic acid 용액 1ml를 각 well에 첨가하고 40°C에서 1시간 동안 방치한다. 그 후 PBS로 다시 세척한 후 15분이상 건조시키고 0.5 M NaOH 용액 1ml를 각 well에 넣어 상온에서 6시간이상 용해 시키고 그후 0.5 M HCl 용액으로 중화 시켜 scintillation vial에 옮겨 radioactivity를 측정한다.

**2) Double immunostain:** 각 신경교세포가 배양된 coverslip을 35 mm dish에 3개씩 옮겨 놓은 후 1 ml 배양액을 첨가하고 일정농도의 TGF $\beta_1$ 을 2일동안 처리한다. 그후 astrocyte의 경우 TGF $\beta_1$  처리 2일째 마지막 6시간 동안, Schwann cell의 경우 마지막 1일동안 그리고 oligoden-

drocyte에서는 TGF $\beta_1$  처리 2일동안 계속  $10 \mu\text{M}$  BrdU을 배양액에 첨가하여 세포의 DNA 합성시 thymidine대신 BrdU이 uptake되도록 한다. 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 astrocyte에서는 rabbit anti-GFAP(1:50), goat anti-rabbit IgG-Rho(1:50), oligodendrocyte는 rabbit anti-myelin basic protein(1:100), goat anti-rabbit IgG-Rho(1:50)을 사용하여 면역형광표식을 하고, 현광현미경으로 관찰한다. Schwann cell의 경우에는 anti-BrdU 염색만을 시행하여 관찰하였다.

#### 라. 신경교세포의 분화에 대한 TGF $\beta_1$ 의 효과 측정

신경교세포의 분화는 생화학적 지표를 사용하여 즉 astrocyte의 분화정도는 GFAP량과 glutamine synthetase, 그리고 oligodendrocyte의 분화정도는 MBP량과 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase(CNPase) 활성도를 그리고 Schwann cell에서는 Peripheral myelin량을 측정하여 비교한다.

**1) GFAP 및 MBP immunoblotting:** Astrocyte와 oligodendrocyte는  $10^{-6}$  M hydrocortisone을 24시간 전처리한 후 배양된 세포를 PBS로 2번 세척한 후 rubber policeman으로 분리 수집한다. 원심분리하여 cell pellet을 얻고 ice cold-PBS에 부유하여 sonicate하여 aliquot를 얻는다. 그후 1% SDS로 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1:2 serial dilution을 만들어 96 well manifold에 놓인 nitrocellulose membrane에  $100 \mu\text{l}$ 씩 넣고 30분동안 방치한 다음 vaccum을 사용해 결합시킨다.

그후 상온에서 16~18시간동안 반응시킨 후 horse radish peroxidase가 결합된 goat anti-rabbit IgG(1:200)로 1시간, ABC complex(Vectastain ABC)를 40분동안 반응시키고 4-chloro-1-naphthol을 사용하여 발색시킨 다음 scanning den-

sitometer를 사용하여 정량한다.

단백농도는 Lowry등(1951)의 방법을 사용한다.

**2) Glutamine synthetase와 CNPase 활성도 측정:** 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 사용한다. 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<sub>2</sub>, 20 mM sodium arsenate와 60 mM hydroxylamine이 되도록 첨가하고 37°C에서 효소분획 일정량을 첨가하여 반응을 시작하고 30분 후 40% TCA에 0.6  $\mu$ M FeNO<sub>3</sub>가 들어있는 용액 2 ml를 첨가하여 반응을 끝내고 형성된 r-glutamylhydroxamate를 spectrophotometer를 사용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하여 계산한다(Miller 등, 1978). 그리고 CNPase 활성도 측정은 얻어진 효소 분획에 Triton X-100을 1% 되게 첨가한 후 0.2M MES buffer(pH 6.0) 용액에서 1 mM 2',3'-cyclic NADP를 기질로 사용하여 1시간 동안 반응시키고 생성되는 NADPH를 fluorescence spectrophotometer를 사

용하여 측정한다(Weiss-barth 등, 1980).

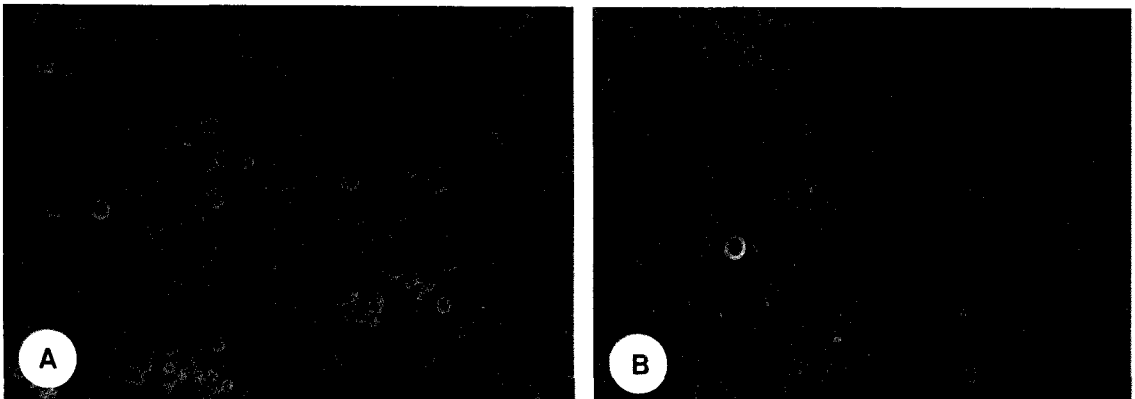
## 결 과

### 1. 신경교세포의 배양

신생랫트 대뇌부위로 부터 일차 신경교세포배양을 한 결과 배양 10~14일에 돌기를 갖는 세포들이 평평하고 경계가 불분명한 fibroblast-like 세포 위에서 관찰되었고 이 배양을 이용하여 18~24시간동안 orbital shaker로 진탕 분리한 후 얻어진 세포는 우태아 혈청이 포함되지 않은 DMEM 배양용액에 10  $\mu$ g/ml insulin, 5  $\mu$ g/ml transferrin 1.0 ng/ml biotin, 30 nM sodium selenite와 항생제를 첨가하여 배양한 후 oligodendrocyte로 사용하였고, 배양용기에 붙어 있던 신경교세포는 0.05% trypsin으로 사용하여 이차 분리한 후 astrocyte로 이용하여 실험에 사용하였다(Fig. 1).

### 2. Astrocyte에 대한 TGF $\beta$ 의 성장 효과

배양후 얻어진 astrocyte에 대한 transforming growth factor  $\beta_1$ (TGF $\beta_1$ )의 성장효과를 알아보기 위해 poly-L-lysine으로 미리 도포된 24 well 배양

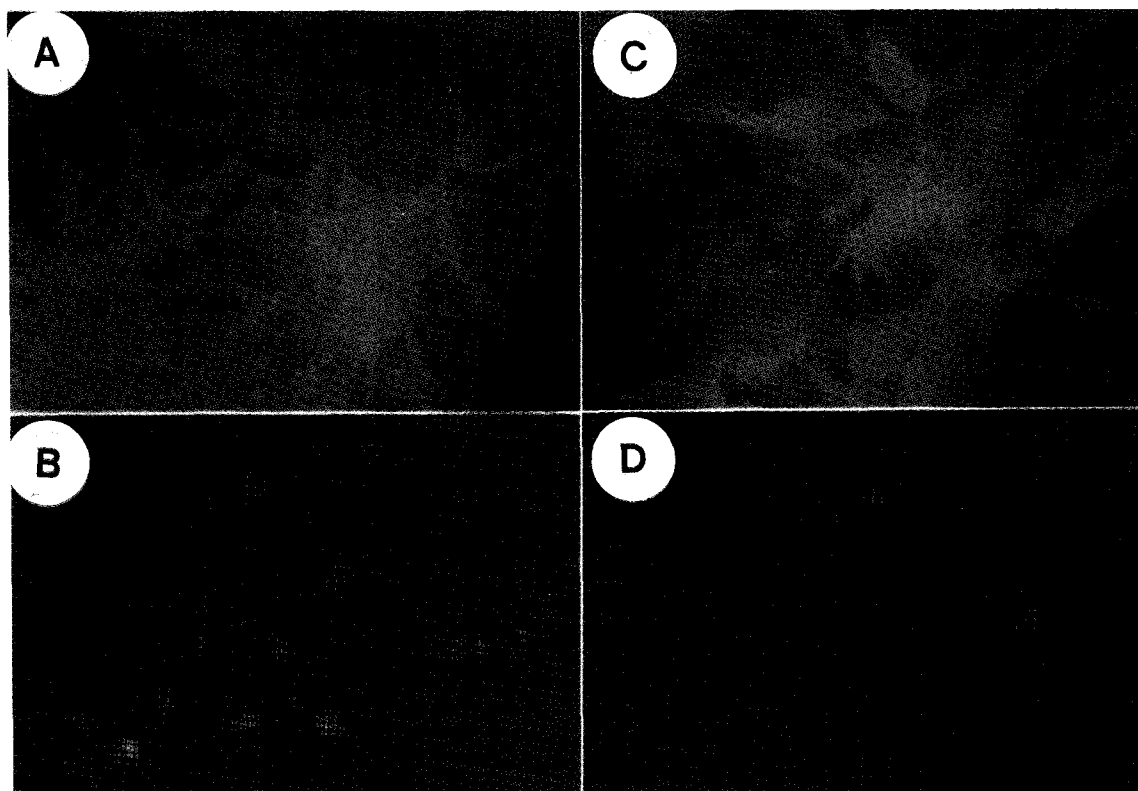


**Fig. 1.** Phase contrast photomicrograph of primary glial cell culture from newborn rat brain. Primary cell cultures of glial cells were obtained from the cerebral hemispheres of 1-day-old-rats and grown to confluence(10-14 days) in Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum. Contaminating cells were separated by mechanical agitation. Culture purity was determined by immunostain with a polyclonal antibody to GFAP and >95% of the cells stained positively for the astrocytic marker. A: Mixed glial cell culture, B: Purified astrocytes

**Table 1.** Inhibitory effect of TGF $\beta_1$  on the growth of rat astrocytes

	$^3\text{H}$ -thymidine uptake(% of control)		Double immunostain(%)
	1% FBS	10% FBS	1% FBS
Control	100	100	15.5 $\pm$ 2.3
2 ng/ml TGF $\beta_1$	90.4 $\pm$ 13.6	70.0 $\pm$ 17.2	11.1 $\pm$ 2.4
4 ng/ml TGF $\beta_1$	83.1 $\pm$ 16.1	59.3 $\pm$ 18.2	5.9 $\pm$ 1.4

Astrocytes were plated onto a 24-well culture dish in 0.5 ml medium containing 10% or 1% FBS. TGF- $\beta_1$  was 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 was determined as described in Materials and Methods. Each value represents mean  $\pm$  SEM.



**Fig. 2.** GFAP(A and C)and BrdU(B and P) double immunostain in cultured astrocytes. Cultured astrocytes on coverslip were maintained in the presence or absence with 4 ng/ml TGF  $\beta_1$  at 37°C for 48 h and 10  $\mu\text{M}$  BrdU was added for the last 6 h of incubation. Cultures were immunocytochemically stained using antibody against BrdU and GFAP which is one of specific marker for astrocytes.  $\times 400$

용기에 24시간동안 부착시킨후 1% FBS가 함유된 DMEM 배양용액으로 세포를 세척하고 같은 배양용액으로 교환해준 후 일정 농도의 TGF $\beta_1$ 을 첨가한 후 2일동안 배양하고 마지막 6시간동안  $^3\text{H}$ -thymidine을 첨가하여 thymidine uptake를 측정 한 결과 1% 혈청 함유 대조군에서는  $484 \pm 80$  cpm이었고, 10% 혈청 함유 대조군에서는  $936 \pm 122$  cpm으로 0.4~1% 정도가 uptake 되는 것을 볼 수 있었다. 같은 조건에서 1% 혈청함유 배양 세포에 TGF $\beta_1$ 을 처리하면  $^3\text{H}$ -thymidine uptake 정도가 2 ng/ml TGF $\beta_1$ 에서는  $90.4 \pm 13.6\%$  (Mean  $\pm$  S.E.M.) 그리고 4 ng/ml TGF $\beta_1$ 에서는  $83.1 \pm 16.1\%$ 이었으며, 10% 혈청함유 배양세포에서는 각각  $70.0 \pm 17.2$ ,  $59.3 \pm 18.2\%$ 로 TGF $\beta_1$ 에 의해 astrocyte의 성장이 억제되는 양상을 보였으며 특히 10% 혈청이 함유된 경우 TGF에 의한 성장억제효과가 현저하였다(Table 1). 또한 배양된 astrocyte에 10  $\mu\text{M}$  Brdu를 6시간 전처리한 후 specific marker와 thymidine analog인 BrdU에 대한 항체를 사용하여 면역 세포화학적으로 염색한 후 현광 현미경하에서 세포를 관찰한 결과 (Fig. 2) anti-GFAP와 그리고 anti-BrdU 항체에 반응하는 세포 즉 astrocyte로서 Brdu 처리동안 DNA 합성이 일어난 세포는 대조군에서  $15.5 \pm 2.3\%$ , 2 ng/ml TGF $\beta_1$ 에서는  $11.1 \pm 2.4\%$ , 4 ng/ml TGF $\beta_1$ 에서는  $5.9 \pm 1.4\%$ 로 proliferation index가 각각 0.82, 0.43으로 TGF $\beta_1$ 에 의해 astrocyte의 성장이 유의하게 억제됨을 볼 수 있었다 (Table 1).

### 3. Oligodendrocyte의 성장에 대한 TGF $\beta_1$ 의 효과

Oligodendrocyte에 대한 TGF $\beta_1$ 의 성장효과를 알아보기 위해 serum free defined medium에 키우고 TGF $\beta_1$ 를 2일동안 처리한 후 마지막 24시간 동안  $^3\text{H}$ -thymidine을 첨가한 후 radioactivity를 측정 한 결과  $^3\text{H}$ -thymidine uptake 정도가 대조군에 비해서 2 ng/ml TGF $\beta_1$ 에서는  $94.9 \pm 6.5\%$ 이었고 4 ng/ml TGF $\beta_1$ 에서는  $101.4 \pm 8.2\%$ 로 TGF $\beta_1$  전처리로 인해 oligodendrocyte의 성장이 변화되지 않은 양상을 보였다(Table 2). 또한 myelin basic protein과 Brdu에 대한 항체를 사용하여 double immunostain 방법을 시행한 결과에서도 proliferation index가 각각 0.95, 0.81로 유의한 차이를 보이지 못하였다. 이상의 결과로 미루어 보아 TGF $\beta_1$ 은 oligodendrocyte의 성장에 대해 영

**Table 2.** Effect of TGF $\beta_1$  on the growth of rat oligodendrocytes

	$^3\text{H}$ -thymidine uptake (% of control)
Control	100
2 ng/ml TGF $\beta_1$	$94.9 \pm 6.5$
4 ng/ml TGF $\beta_1$	$101.4 \pm 8.2$

All conditions were same as described in Materials and Methods. Each value represents mean  $\pm$  S.E.M.

**Table 3.** Effect of TGF $\beta_1$  on the growth of rat Schwann cells

	$^3\text{H}$ -thymidine uptake(% of control)		BrdU Immunostain(%)
	1% FBS	10% FBS	
Control	100	100	$10.8 \pm 0.7$
2 ng/ml TGF $\beta_1$	$267.4 \pm 43.2$	$137.0 \pm 10.4$	$12.9 \pm 1.2$
4 ng/ml TGF $\beta_1$	$251.0 \pm 32.4$	$122.6 \pm 20.7$	$23.3 \pm 2.8$

Reaction conditions were same as described in Materials and Methods. Brdu was treated for the last 24 h and then Schwancell were immunostained with mouse monoclonal antibody. Each value represents mean  $\pm$  S.E.M.

향을 미치지 않음을 알 수 있었다(Data not shown).

#### 4. Schwann cell의 성장에 대한 TGFβ<sub>1</sub>의 효과

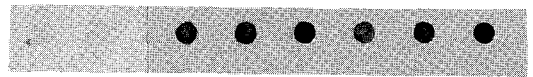
신생 랫트의 dorsal root ganglia로 부터 Schwann cell을 분리하고, 분리된 Schwann cell을 TGFβ<sub>1</sub>과 전처리한 후 Schwann cell의 성장에 대한 효과를 검토한 결과, TGFβ<sub>1</sub>은 Schwann cell로부터 <sup>3</sup>H-thymidine uptake를 2배이상 증가시킨 결과를 보였고 anti-BrdU immunostain에서도 proliferation index는 4 ng/ml TGFβ<sub>1</sub>에서 2.16으로 증가되는 양상을 보였다. 한편 10 % 혈청이 함유된 배양조건에서 TGFβ<sub>1</sub>을 처리한 경우 <sup>3</sup>H-thymidine uptake의 증가정도는 현저하지 않았다(Table 3).

#### 5. Astrocyte의 분화에 대한 TGFβ<sub>1</sub>의 효과

배양 astrocyte의 분화에 대해 TGFβ<sub>1</sub>가 미치는 영향을 검토하고자 glutamine synthetase 활성도와 GFAP 함량을 생화학적 지표로 사용하여 측정 비교하였다. 배양용액에 1 μM hydrocortisone을 24시간 전처리한 후 TGFβ<sub>1</sub>를 첨가함으로써 glutamine synthetase 활성도가 TGFβ<sub>1</sub>의 농도 증가에 따라 억제되었고 4 ng/ml TGFβ<sub>1</sub>에서는 30~40%의 억제 효과를 볼 수 있었다.

또한 astrocyte의 세포질내 존재하는 intermediate filament의 하나인 GFAP 함량은 anti-GFAP로 immunoblotting한 결과 1% FBS 함유 배양 조건에서는 대조군에 비해 2 ng/ml TGFβ<sub>1</sub> 첨가에서는 98.7±6.5이었고 4 ng/ml TGFβ<sub>1</sub> 첨가에서는 109.2±6.0 %으로 TGFβ<sub>1</sub>에 의한 GFAP의 증가를 볼 수 없었으나 10 % FBS 함유 배양 조건에서는 각각 121.9±4.8, 153.2±17.4%로 GFAP 함량이 증가된 결과를 보였다(Table 4 및 Fig. 3).

1 2 3 4 5 6 7 8



**Fig. 3.** Increase of GFAP amount by TGFβ<sub>1</sub> in astrocyte. Cultured astrocytes in 35 mm dish pretreated with hydrocortisone for 24 h and maintained without(3) or with 2 ng/ml TGFβ<sub>1</sub>(4), 4ng/ml TGFβ<sub>1</sub>(5) in DMEM supplemented with 1% FBS or 10% FBS(6, 7,8) at 37°C for up to 48 h and scrapped off and sonically disrupted. Immunoblotting was determined as described in Materials and Methods. This figure showed that TGFβ<sub>1</sub> was increased the amounts of GFAP in astrocyte. 1. Negative control, 2. Control(10 μg BSA)

**Table 4.** Effect of TGFβ<sub>1</sub> on Glutamine synthetase activity and GFAP immunoblotting in astrocyte

	Glutamine synthetase activity (μmoles/30min/mg prot.)		GFAP immunoblotting (% of control)	
	1% FBS	10% FBS	1% FBS	10% FBS
Control	122.7±11.0	218.5±18.9	100	100
2 ng/ml TGFβ <sub>1</sub>	108.2±12.1	155.9±8.5	98.7±6.5	121.9±4.8
4 ng/ml TGFβ <sub>1</sub>	89.9±10.1	140.8±8.0	109.2±6.0	153.2±17.4

Astrocytes were plated onto a 35 mm culture dish in 1 ml medium containing 10% or 1% FBS and pretreated with hydrocortisone(HC) for 24h. TGFβ<sub>1</sub> was treated at 37°C for 2 d in vitro. For assay, the cells were scrapped off and sonically disrupted. GS activity and immunoblotting were determined as described in Materials and Methods. Each value represents mean±S.E.M.



**Table 5.** Effects of TGF $\beta_1$  on the biochemical changes of oligodendrocyte and Schwann cells

	Oligodendrocyte		Schwann cell
	Cnpase activity ( $\mu$ moles NADPH/30 min/mg prot)	MBP immunoblotting (% of control)	Peripheral myelin immunoblotting (% of control)
Control	1.81 $\pm$ 0.35	100	100
2 ng/ml TGF $\beta_1$	1.55 $\pm$ 0.23	92.8 $\pm$ 10.3	103.6 $\pm$ 8.4
4 ng/ml TGF $\beta_1$	1.65 $\pm$ 0.32	110.4 $\pm$ 11.2	162.8 $\pm$ 13.2

CNPase activity and MBP immunoblotting was determined as described in Materials and Methods. Each value represents mean  $\pm$  SEM.

## 6. Oligodendrocyte와 Schwann cell 분화에 대한 TGF $\beta_1$ 의 효과

TGF $\beta_1$ 이 oligodendrocyte의 분화효과에 미치는 효과를 검토한 결과 TGF $\beta_1$ 은 CNPase 활성도와 MBP immunoblotting에 대해 증가효과를 나타내지 못하였다. 그러나 Schwann cell에서 4 ng/ml TGF $\beta_1$ 의 처리한 경우 peripheral myelin에 대한 immunoblotting이 대조군에 비해 63% 정도 증가되는 결과를 보였다. 이상의 결과는 TGF $\beta_1$ 은 oligodendrocyte의 분화에 대해 영향을 미치지 못하나 Schwann cell의 peripheral myelin 단백질의 생성 또는 발현정도를 증가시킬 수 있는 결과였다 (Table 5).

## 고 찰

본 실험에서 랫트 astrocyte, oligodendrocyte와 Schwann cell 성장과 분화에 대한 TGF $\beta_1$ 의 효과를 관찰한 결과 TGF $\beta_1$ 은 랫트 astrocyte의 성장을 억제하였으나, oligodendrocyte의 성장에는 영향을 미치지 못하였다. 그리고 Schwann cell의 성장은 반대로 촉진시킨 결과를 보였다. Astrocyte의 경우 1% fetal bovine serum이 첨가된 배양액에서 4 ng/ml 농도의 TGF $\beta_1$ 에서 17% 정도 억제하는 결과를 보였으나 10% fetal bovine serum이 첨가하여 대조군의 astrocyte의 성장이 증가된

조건에서는 4 ng/ml TGF $\beta_1$ 의 처리로  $^3$ H-thymidine uptake가 40% 정도 억제되는 결과를 보였다. 이러한 결과는 astrocyte의 성장이 촉진된 경우 TGF $\beta_1$ 에 의한 억제효과가 더욱 현저함을 알 수 있었다. 한편 세포배양 과정중 leptomenings 등에서 유래된 fibroblast, microvessel에서 유래된 endothelial cell 등이 일부 존재할 수 있으며 이들 세포는 정상 배양조건에서 astrocyte에 비해 성장속도가 빠르고 일부세포는 TGF $\beta_1$ 에 의해 성장이 억제된다는 것이 잘 알려져 있으므로 TGF $\beta_1$ 이 astrocyte에 직접 작용을 나타내기 보다는 이들 모든 세포에 대한 복합적인 결과로도 해석될 수 있으나 double immuno-train 실험에서 proliferation index가 0.43 정도로 감소된 결과는 TGF $\beta_1$ 이 astrocyte에 직접 작용하여 astrocyte의 성장을 억제시키는 것으로 해석된다.

TGF $\beta_1$ 의 효과는 매우 다양하여 세포의 종류, mitogen의 생성여부, 그리고 배양 조건에 따라 성장을 억제하거나 반대로 촉진시키는 등 결과가 다르게 나타날 수 있다고 알려져 있다(Sporn 등, 1987). TGF $\beta_1$ 의 성장 억제효과는 아직까지 제대로 밝혀져 있지 않으나 일반적으로 TGF $\beta_1$  자체가 직접 DNA 합성에 효과를 나타내지 못하고 cAMP 신호전달계를 조절하거나(Morris 등, 1988) extracellular matrix 생성을 증가시키는 등 다른 성장인자의 분열촉진 효과를 상쇄하는 인자로 작용할 수 있다고 보고되고 있다(Rizzino 등, 1988).

그러므로 본 실험 결과에서 보듯 astrocyte에 대한 TGF $\beta_1$ 의 성장억제효과도 상기 여러 기전을 매개하여 나타난 결과로 믿어지나 본 실험만으로는 그 기전을 이해할 수 없었다. 한편 TGF $\beta_1$ 은 oligodendrocyte의 성장에 대해서는 영향을 미치지 않았으나 Schwann cell의 성장을 촉진시킨 결과는 astrocyte에서와의 반대되는 결과로 매우 흥미로운 현상으로 TGF $\beta_1$ 가 세포의 종류에 따라 성장을 억제 또는 촉진한다는 연구결과를 입증하는 것이다.

본 실험에서도 TGF $\beta_1$ 의 astrocyte의 분화와 관련된 이와같은 생화학적 변화를 알아보기 위해 신경교세포의 발달과 신경-신경교세포간의 상호작용에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 glutamine synthetase (De Vellis 등, 1986)와 astrocyte의 특이 marker인 GFAP 면역반응정도 (immunoreactivity)를, oligodendrocyte에 대해서는 myelin 합성에 관여하는 CNPase의 활성도와 myelin basic protein(MBP) 함량을, 그리고 Schwann cell에 대해서는 peripheral myelin 단백질 함량을 측정하였다. TGF $\beta_1$ 은 astrocyte에서 glutamine synthetase 활성도를 감소시키고, GFAP 함량을 증가시키는 결과를 보였으나 Schwann cell에서는 말초 myelin 단백질 함량을 증가시키는 등 생화학적 기능에도 영향을 나타낸 결과를 보였다.

Glutamine synthetase는 주로 astrocyte에 존재하는 것으로 알려져 있어 초기에는 astrocyte의 특이표적으로 사용되기도 했으나, 최근에는 astrocyte뿐만 아니라 일부 neuron, oligodendrocyte도 존재하고 있는 효소로서 흥분성 신경전달물질과 관련된 glutamate를 glutamine으로 변화시키거나 그 기능에 대해서는 제대로 밝혀져 있지 않다. 일반적으로 astrocyte가 hormone에 의해 자극을 받으면 glutamine synthetase의 활성도가 현저히 증가되는 것으로 알려져 있으며 이러한 hormone으로 hydrocortisone 등 steroid hormone이 astrocyte 성숙과 관련되어 나타나는 점으로 미루어 astrocyte의 분화정도를 검토하는데 이용되고 있다. 본 실험에서 TGF $\beta_1$ 은 glutamine synthetase

의 활성도를 감소시킨 결과를 보여 앞서 실험한 결과(Feige 등, 1987; Rainey 등, 1988; Lin 등 1987)와 일치하지 않으나 이러한 결과는 배양조건, 배양세포이외에도 효소의 turnover속도, 배양액내에서의 TGF $\beta_1$ 의 손실속도의 차이가 원인이 될 수 있다. 그러나 본 실험의 결과에서는 TGF $\beta_1$ 은 astrocyte의 GS활성도를 억제하였으며 Chao 등 (1992)의 TGF $\beta_1$ 에 의한 GS활성도의 억제 결과와 일치하였다. 한편 TGF $\beta_1$  처리로 astrocyte의 GFAP 면역반응정도(immunoreactivity)가 증가됨을 보였다. 이 결과는 astrocyte내 GFAP 함량이 증가되어 있다는 것을 직접적으로 증명하지는 못하지만 TGF $\beta_1$ 의 성장 억제효과와 연결지어 TGF $\beta_1$ 의 astrocyte 성장을 억제하여 배양조건내 astrocyte의 숫자가 대조군에 비해 감소되어 있으나 세포단백 단위당 GFAP 면역 반응 정도가 증가되어 있다는 결과는 astrocyte 세포질내 GFAP 함량이 증가됨으로 나타날 수 있는 결과로 믿어짐으로 TGF $\beta_1$ 가 astrocyte 성숙에 촉진효과를 보이는 것으로 생각될 수 있다.

한편 뇌손상 또는 뇌염증질환에서 뇌조직내 microglia와 astrocyte등의 세포가 활성화되며 이렇게 활성화된 astrocyte는 세포증식과 함께 여러가지 생화학적 변화를 나타내는데 이중 하나가 GFAP합성의 증가(Amaducei 등 1981)와 GS활성도의 증가이며 이러한 변화는 면역반응과도 관련이 있고 또한 뇌조직손상에 대한 반응성인 결과라고도 알려져 있다(Condorelli 등, 1990). 그러나 본 실험에서는 TGF  $\beta_1$ 은 astrocyte의 성장을 억제하고 GS 활성도를 감소시키지만 GFAP함량을 증가시키는 결과를 보여 astrocyte의 hypertrophy를 초래하는 양상을 보였다. 일반적으로 TGF  $\beta_1$ 은 성장을 억제하고 세포의 분화를 촉진시킨다고 알려져 있는 바 본 실험에서도 TGF  $\beta_1$ 은 astrocyte의 GS활성도를 억제시켜 reactive astrogliosis에서 나타나는 생화학적 변화를 억제함으로써 조직 손상 후 수복에 관여할 수 있다고 추측할 수 있으나 astrocyte내 GFAP가 증가되는 astrocyte의 hypertrophy가 생체내에서 조직손상에 직접 관여

하는지 또는 조직손상후 수복과 관련지어 나타날 수 있는 현상인지의 여부는 아직 밝혀져 있지 않은 실정이다.

한편 이러한 TGF  $\beta_1$ 의 생화학적 변화는 oligodendrocyte에서는 볼 수 없었으며 Schwann cell에서는 말초 myelin단백합량이 증가된 결과를 보였다. 이러한 결과는 Schwann cell의 성장과 함께 분화도 촉진되는 것으로 TGF  $\beta_1$ 은 말초신경조직에서 신경조직손상시 회복 또는 재생에 관여할 수 있으리라 믿어지며, 재생기전에 대해서는 collagen등 다양한 extracellular adhesion molecule의 생성을 통해 나타나는 현상이라고 보고되고 있으나 아직도 많은 연구가 필요한 실정이다.

이상의 결과를 종합하면 TGF $\beta_1$ 은 oligodendrocyte에 대해서는 아무 영향을 미치지 못하였으나 astrocyte에서는 성장을 억제시키지만 생화학적인 변화를 나타내었고, Schwann cell에 대해서는 성장 및 말초 myelin 단백질 합량을 증가시키는 등 다양한 효과를 보임으로 미루어 TGF $\beta_1$ 은 중추 및 말초신경계에서 repair 기전과 관련되어 중요한 역할을 하리라 믿어지며 이와같이 세포의 종류에 따라 다양한 효과를 보이는 기전에 대해서는 제대로 검토되지 않았으나 astrocyte와 Schwann cell등을 이용하여 두 세포간에 TGF $\beta_1$ 의 결합능력 또는 수용체의 발현에 대한 반응등을 서로 비교함으로써 TGF $\beta_1$ 의 신경교세포의 성장 또는 분화효과를 밝히는 등 많은 연구가 필요한 실정이다.

## 참 고 문 헌

- Childs CB, Proper JA, Tucker RF and Moses HL: Serum contains a platelet derived transforming growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 5312-5316, 1982
- Chao CC, Hu S, Tsang M, Weatherbee J, Molitor TW, Robert Anderson W and Peterson PK: Effects of transforming growth factor- $\beta$  on murine astrocyte glutamine synthetase activity. *J Clin Invest* 90: 1786-1793, 1992
- Condorelli DF, Dell'Albani P, Kaczmarek L, Messina L, Spaminato G, Avola R, Messina A and Giuffrida Stella AM: Glial fibrillary acidic protein messenger RNA and glutamine synthetase activity after nervous system injury. *J Neurosci Res* 26: 251-257, 1990
- da Chunha A, Jefferson JJ, William RT, Jonathan DG, Frank SJ and Ljubisa V: Control of astrocytosis by interleukin-1 and transforming growth factor- $\beta_1$  in human brain. *Brain Res* 631: 39-45, 1993
- DeLarco JE and Todaro GJ: Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 4001-4005, 1978
- De Vellis J, Wu DK and Kumar S: Enzyme induction and regulation of protein synthetase In *Astrocyte: Biochemistry, Physiology, and Pharmacology of Astrocytes* S Fedoroff and A Vernadakis, editors Academic Press, Inc, Orlando, FL: 209-237, 1986
- Eccleston PA, Jessen KR and Mirsky R: Transforming growth factor- $\beta$  and r-interferone have dual effects on growth of peripheral glia. *J Neurosci Res* 24: 524-530, 1989
- Feige JJ, Cochet C, Rainey WE, Madani C and Chambaz EM: Type  $\beta$  transforming growth factor affects adrenocortical cell-differentiated functions. *J Biol Chem* 262: 13491-13495, 1987
- Kathleen CF, David SC, Sonia BJ, Anita BR, Shinichi W, David D and Michael BS: Immunohistochemical localization of TGF $\beta_1$  and  $\beta_2$  in the nervous system. *Ann NY Acad Sci* 593: 338-9, 1990
- Kehrl JH, Roberts AB, Wakefield LM, Jakowlew SB, Sporn MD and Fauci AS: Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B-lymphocytes. *J Immunol* 137: 3855-3860, 1986
- Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew SB, Alvarez-Mon M, Derynck R, Sporn MD and Fauci AS: Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T

- cell growth. *J Exp Med* 163: 1037-1050, 1986
- Lin T, Blaisdell J and Haskell JF: *Transforming growth factor- $\beta$  inhibits Leydig cell steroidogenesis in primary culture. Biochem Biophys Res Commun* 146: 387-394, 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
- Morris JC III, Ranganathan G, Hay ID, Nelson RE and Jiang NS: *The effects of transforming growth factor- $\beta$  on growth and differentiation of the continuous rat thyroid follicular cell line, FRTL-5. Endocrinology* 123: 168-179, 1988
- Rainey WE, Viard I, Mason JI, Cochet C, Chambaz EM and Saez JM: *Effects of transforming growth factor beta on ovine adrenocortical cells. Mol Cell Endocrinol* 60: 189-198, 1988
- Ridley AJ, Davis JB, Strocba'nt P and Land H: *Transforming growth factor  $\beta_1$  and  $\beta_2$  are mitogens for rat Schwann cell. J Cell Biol* 109: 3419-3424, 1982
- Rizzino A: *Transforming growth factor- $\beta$ : multiple effects on cell differentiation and extracellular matrices. Dev Biol* 130: 411-422, 1988
- Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM and Sporn MB: *New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor. Proc Natl Acad Sci USA* 78: 5339-5343, 1981
- Roberts AB, Anzano MA, Wakefield LM, Roche NS, Stern DF and Sporn MB: *Type beta transforming growth factor: A bifunctional regulator of cellular growth. Proc Natl Acad Sci USA* 82: 119-123, 1985
- Roberts AB, Lamb LC, Newton DL, Sporn MB, Delarco JE and Jodaro GJ: *Transforming growth factors: Isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid ethanol extraction. Proc Natl Acad Sci USA* 77: 3493-3498, 1980
- Roberts AB and Sporn MB: *The transforming growth factors- $\beta$  In Handbook of Experimental Pharmacology, Vol 95/1 Peptide Growth Factors and their Receptors M B Sporn & A B Roberts, Eds: 419-472 Springer-Verlag Heidelberg, 1990*
- Robey PG, Young MF, Flanders KC, Roche NS, Kondalah P, Reddi AH, Termine JD, Sporn MB and Roberts AB: *Osteoblasts synthesize and respond to TGF-beta in vitro. J Cell Biol* 105: 457-463, 1987
- Saneto RP and DeVillis J: *Neuronal and glial cells: cell culture of the central nervous system In Neurochemistry a practical approach (eds Turner, a J and Bachelard, H S ) IRL Press, Oxford, pp27-63, 1987*
- Seyedin PR, Segarini PR, Rosen DM, Thompson AY, Bentz H and Graycar J: *Cartilage-inducing factor- $\beta$  is a unique protein structurally and functionally related to transforming growth factor-beta. J Biol Chem* 262: 1946-1949, 1987
- Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM and De Crombrughe B: *Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. J Cell Biol* 105: 1039-1045, 1987
- Sporn MB and Roberts AB: *Transforming growth factor- $\beta$  : Multiple actions and potential clinical applications. JAMA* 262: 938-941, 1989
- Thompson NL, Bazoberry F, Speir EH, Casscells W, Ferrans VJ, Flanders KC, Kondaliah P, Geiser AG and Sporn MB: *Transforming growth factor beta-1 in acute myocardial infarction in rats. Growth Factors* 1: 91-99, 1988
- Toru-Delbarffe L, Baghdassarian-chalaye D, Gavarat JM, Courtin F, Pomerance M and Tucker RF, Shipley GD, Moses HL and Holley RW: *Growth inhibitor from BSC-1 cells colseely related to platelet type beta transforming growth factor. Science* 226: 705-707, 1984
- Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-

- Francis N, Wahl LM, Roberts B and sporn MB: *Transforming growth-factor beta(TGF-beta) induces monocyte chemotaxis and growth factor production. Proc Natl Acad Sci USA 84: 5788-5792, 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*
- Wrann M, Bodmer S, De Marton R, Siepl C, Hofer-Warbinek R, Frei K, Hofer E and Fontana A: *T Cell suppressor factor from human glioblastoma cells is a 12.5 KD protein closely related to transforming growth factor-beta. EMBO J 6: 1633-1636, 1987*
- Yong VW, Kim SU and Pleasure DE: *Growth factors for fetal and adult human astrocytes in culture. Brain Res 444: 59-66, 1988*
-