

무지개 송어(*Oncorhynchus mykiss*) 중추신경계(CNS)에 있어서 세포특징과 Nitric Oxide Synthase

장선일, 최민순*, 김영길*

전북대학교 자연과학대학 생물학과, *군산대학교 해양산업대학 수족병리학과

최근 포유동물에서 nitric oxide(NO)는 중추신경계(CNS)의 기능에 있어서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져왔다. NO는 NO synthase(NOS)에 의해 L-arginine으로부터 합성된다. 본 연구에서 저자들은 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)의 CNS에서 NOS활성을 측정했고, 소교세포와 신경교성상 세포 및 회돌기교세포의 특징을 기술하였다. CNS에서 세교세포는 포유동물에서와 유사한 큰 소교세포(large microglia : LM)와 세포질이 매우 적은 소형 소교세포(small microglia : SM)등 2가지 형태적 특징이 관찰되었다. CNS에서 신경교성상 세포는 모세섬유가 연결되지 않은 망상 구조의 형태를 보였고, 회돌기교세포는 신경교성상세포보다 더 세포질이 밀집되어 있었다. 저자들은 무지개송어의 CNS에서 NOS의 활성을 측정하였는데, 그 양은 1.04 ± 0.12 pg/min/mg이었고, N^G MMA와 EGTA에 의해 가역적 또는 비가역적으로 억제되었다. 이들의 결과는 CNS에서 L-arginine으로부터 NO형성이 calcium에 의존적이고, 초기 진화 기원의 경로를 시사해 주었다.

Key Words : Microglia, astrocytes, oligodendrocytes, CNS, nitric oxide synthase

포유동물에서 소교세포(microglia)는 중추신경계(central nervous system : CNS)내에서 세균을 비롯한 이물질은 퇴치하고 탐식할 수 있는 체세포 조직(somatic tissues)내의 탐식세포로서 알려졌다(Fishman and Savitt, 1989; Frei *et al.*, 1986). CNS의 발생과 더불어 세포증식과 분화가 이루어져 신경교성상세포(astrocytes)를 자극할 수 있는 여러가지 세포활성물질(cytokines)과 주조직적합항원 클래스 I 및 II (major histocompatibility complex class I and II : MHC class I, II)발현을 유도할 수 있고(Fierz *et al.*, 1985; Akiyama *et al.*, 1988; Righi *et al.*, 1989). 세포질내에 비특이적 esterase와 5'-nucleotide의 존재로 단핵탐식세포계(mononuclear phagocytic system : MPS)와 생화학적으로 유사한 점이 보고되었다(Kaur *et al.*, 1984; Ling *et al.*, 1982). 하등척추동물에서 CNS의 발생과 분화는 포유동물에서와 달리 성장 시기에 이르기까지 이루어질 수 있

다는 점에서 소교세포의 증식 및 성장은 매우 흥미로운 일이지만, 이들 세포의 형태적인 특징과 기능에 대해서는 거의 알려진 바 없다(Maggs and Scholes, 1990; Dowding *et al.*, 1991).

Nitric oxide(NO)는 nitric oxide syntase(NOS)에 의해 L-arginine으로부터 합성되는 paracrine 및 autocrine 방식에 의해 세포로부터 생산되는 산화물질의 일종이며(Moncada *et al.*, 1989; Hibbs *et al.*, 1990). NOS는 2가지 기전에 의해 조절되는데 내피세포(endothelium)와 소뇌세포(cerebellum)에서 존재하는 칼모듈린(calmodulin)과 칼슘(Ca^{2+})에 의존적인 것과 MPS에서 발현되는 칼슘에 비의존적인 것으로 대별된다(Bredt and snyder, 1990; Hiki *et al.*, 1991). 뇌에서 NOS는 대뇌피질(cerebral cortex), hippocampus 및 corpus striatum등 조직세포에서 출현되고(MacMiking *et al.*, 1992). 소뇌 신경세포의 과립성 세포(granule cells) 및 성

상세포(basket cells)에서도 존재하는데, 그것은 NA-DPH diaporase로 동정되었다(Hope *et al.*, 1991). 이와 같이 CNS의 여러 세포 내에서 NOS 존재는 NO가 신경 조절자로서의 역할을 제시해 주고 있다(Bredt and Snyder, 1992).

진화적인 측면에서 NO 시스템은 거의 알려진 바 없지만, 파충류(Regidor and Poch, 1988)와 양서류(Sato, 1990)에서도 존재함이 보고되었으며, 최근에 무지개송어(rainbow trout)에서도 조직학적으로 NOS가 존재함을 보고하였다(Schober *et al.*, 1993).

본 실험에서는 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*) 뇌조직 세포의 전자 현미경적 구조와 뇌조직에서의 NOS 활성도를 citrulline assay 방법으로 조사한 바 흥미로운 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험어류는 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)로 2~3개월된 치어(전장 5~7cm)를 암수 구별없이 50여 마리를 사용하였다. 이들 치어는 순환 수조내에서 수온이 12~14°C 되게 하고 펠렛 사료(Ewo, Ltd, Bathgate, U. K)를 섭식시키면서 가능한 한 스트레스를 주지 않도록 하여 유지하였다.

2. 뇌조직표본과 전자현미경 관찰

뇌조직과 세포는 0.1M 인산완충용액(phosphate buffered saline; pH 7.4)에 용해시킨 4% glutaraldehyde로 2시간 동안 고정된 후 0.1M 인산완충용액으로 세척하여 1% osmium tetroxide(pH 7.4)에 고정시키고 epon 수지로 봉입하였다(Maggs and Chchales, 1990). 봉입된 block은 ultramicrotome으로 1 μ m와 50nm의 두께로 잘라 1 μ m의 조직 절편은 toluidine blue로 염색하여 광학현미경 하에서 관찰하였으며, 50nm의 절편은 alcoholic uranyl acetate와 Reynold's lead citrate로 염색하여 투사 전자현미경(Zeiss EM 10 C)으로 뇌조직 세포를 관

찰하였다.

3. 뇌조직 세포

뇌조직내의 혈액의 오염을 방지하기 위하여 아가미 혈관을 절단한 다음 충분히 출혈시키고 70% ethanol에 두부를 2분간 침지시킨 후 뇌조직이 손상되지 않도록 주의하여 뇌조직을 적출하였다. 적출된 뇌조직을 Hanks' balanced salt solution(HBSS, pH 7.2)이 들어있는 petridish로 옮긴 다음 그 조직을 살게 세절하여 세포부유액을 준비하였다. 세포부유액은 100과 30 μ m의 nylon mesh을 이용하여 차례로 통과시킨 후 300g로 10분간 4°C에서 원심시켰다. 침전된 세포는 2mM glutamine, 1% antibiotics(penicillin과 streptomycin) 및 10% fetal calf serum(FCS, Sigma)등이 포함되어 있는 L-15 medium에 다시 부유시켜 1 $\times 10^6$ cells/ml로 적정한 후 Wilson과 Brophy(1989)의 방법에 따라 poly-D-lysine으로 전처리된 조직배양용기(Gibco-Nunc Ltd, Paisley, U. K)로 옮겨 접종한 다음 습기가 충분한 배양기(20°C)에서 배양하였다. 접종 4일 후 부유된 세포를 제거하기 위해 HBSS로 세번 씻은 다음 부착된 세포를 얻어서 400g로 원심 침전시킨 후 광학현미경 및 전자현미경 관찰에 사용하였다.

뇌조직 및 세포 효소액

Homogenisation buffer(10mM HEPES, 0.2M sucrose, 1mM dithioerythritol, 10 μ g/ml soybean trypsin, 40 μ g/ml leupertin, 2 μ g/ml aprotinin; pH 7.2, Sigma)에 뇌조직을 옮겨 0°C에서 30초간 sonication을 하여 뇌조직 효소액을 준비하였고, 말초혈액 백혈구, head kidney leucocytes, liver cells 등은 1 $\times 10^6$ cells/ml로 적정한 후 homogenisation buffer에 부유시켜 -70°C 고속 냉동기에 5분간 동결시킨 후 다시 녹인 다음 동결시키는 등 3번 반복해 세포 효소액을 준비하였다. 모든 시료는 Eppendorf tube에 옮긴 후 13,000 rpm으로 원심시켜 상층액만을 취하여 citrulline assay에 사용하였다.

Citrulline assay

NOS활성은 Bredt 등(1990)의 방법에 따라 ^{14}C arginine에서 ^{14}C citrulline으로 전환된 양을 측정하였다. 간략하게 기술하면, $25\mu\text{l}$ 의 조직 및 세포 효소액을 50mM KH_2PO_4 , 60mM L-valine, 1.2mM L-citrulline, L-arginine, $25\mu\text{l}$ ^{14}C L-arginine(100mM stock solution), 1.2mM MgCl_2 , 0.24mM CaCl_2 , $120\mu\text{M}$ NADPH, $10\mu\text{M}$ tetrahydrobiopterin, $2.5\mu\text{M}$ FAD(Sigma) 등 기질액에 주의하여 잘 섞은 다음 22°C 에서 45분간 방치하였다. 그 후 활성화된 1mL Dowex AG 50WX-8(Na form: Bio Rad Richmond, C.A.)를 각 tube에 매우 주의깊게 첨가시킨 후 2시간 동안 방치한 다음 $13,000\text{ rpm}$ 으로 Dowex AG 50WX-8을 침전시킨 후 상층액만을 취하여 ^{14}C citrulline양을 liquid scintillation counter로 측정하여 분당 DPM 값으로 계산하고, 모든 시료의 단백질량은 Bradford(1976) 방법에 따라 정량하고 분당 및 단백질당 NOS양을 환산하였다.

결과 및 고찰

최근 인간을 비롯한 포유동물에서 신경과학(neuroscience)에 대한 관심도가 높아짐에 따라 CNS를 구성하고 있는 신경세포외의 여러 세포들의 구조, 기능 및 역할에 대한 새로운 사실이 많이 밝혀지고 있다. 과거에는 뇌조직에 림프관이 분포되어 있지 않고 뇌조직이 혈관과 blood brain barrier(BBB)를 사이에 두고 있기 때문에 뇌는 면역 반응과 무관한 기관으로 간주되어 왔었다. 그러나 최근의 연구 결과에 의하면 다른 조직에서 대식세포가 MPS를 구성하듯 신경교세포(glial cells)가 뇌조직에서 MPS계의 세포로서 선천적 면역반응에 관여함이 밝혀지고 있다(Fishman and Savitt, 1989; Frei *et al.*, 1986).

Glial fibrillary acidic protein(GFAP)를 함유하는 신경교성상세포는 항원을 T세포에 전달할 수 있고 주조직 적합항원 클래스 II의 단백질이 발현되며, interleukin-1(IL-1) 및 IL-3 등을 분비함이 알려졌다(Fierz *et al.*,

1985; Frei *et al.*, 1986). 이와는 달리 뇌조직 내의 소교세포에만 주조직 적합항원 클래스 I 및 II 항원들이 발현된다는 보고(Akiyama *et al.*, 1988)들이 있을 뿐만 아니라 소교세포는 IL-1, IL-6 및 tumor necrosis factor(TNF) 등을 분비한다고 여러 보고가 있다(Giulian *et al.*, 1986; Righi *et al.*, 1989). 또한 소교세포는 표면에 면역 글로부린의 Fc 부분에 대한 수용체가 존재하고 MPS계의 탐식세포를 자극할 수 있는 물질에 대하여 비슷한 반응 양태를 보임이 알려져 와서 뇌조직에서 신경교세포들로 불리는 세포층에 면역계의 항원 전달(antigen presentation) 기능과 뇌조직에서 국부적인 선천적 면역반응(local innate immunity)을 수행할 수 있는 세포가 존재함이 확실시되고 있다.

포유동물에서와는 달리 하등척추동물에서의 뇌조직을 구성하는 세포의 형태적 구조, 기능 및 역할에 대해서는 거의 알려진 바 없다. 따라서 본 연구에서는 무지개송어 치어를 대상으로 뇌조직 세포중 미세 형태학적인 특징을 조사한 바 Fig. 1에서 나타낸 바와 같다. 무지개송어의 뇌조직 세포는 우선 포유동물에서 존재하는 신경교성상 세포, 회돌기세포(oligodendrocytes) 및 소교세포가 존재함을 알 수 있었다.

소교세포(Fig. 1, A-C)는 신경교성상세포와 회돌기교세포 등 뇌조직 세포들에 의해 둘러싸여져 있고, 세포학적 특징이 포유동물에서와 유사한 점이 관찰된 바 핵(nucleus)의 크기에 비해 세포질이 현저히 적게 관찰되었다. 그러나 포유동물에서와 달리 무지개송어의 소교세포는 형태적으로 많은 차이점이 관찰되었는데 그 하나는 크기가 매우 작고 둥근 소형 소교세포(small microglial; SM)와 다른 하나는 신경교성상세포와 회돌기교세포보다는 작지만 SM보다 큰 대형 소교세포(Large microglial; LM)가 존재함을 알 수 있었고, 분화적 특징에 있어서도 포유동물에서 알려진 소교세포보다 매우 덜 분화되어 있었다.

저자들은 무지개송어에서도 포유동물에서와 같이 소교세포만을 배양할 수 있고 기능이 있어서도 유사한 점이 발견되는지를 관찰하기 위해 Fig. 2에서와 같이 배양



Fig. 1. Cells of rainbow trout brain. A. Small microglia (SM) and large microglia (LM). $\times 1,500$. B. Small microglia and astrocyte. $\times 12,000$. C. Large microglia. $\times 12,000$. D. Oligodendrocyte. $\times 12,000$. MA : Myelinated axon.

된 세포에서 세포학적 미세구조를 관찰하였다. 뇌조직에서도 관찰한 바와 같이 배양된 뇌세포에서는 같은 특징을 관찰할 수 있었으나, 세포 배양 조건은 확립할 수 없었다(Fig. 2, A). 세포 배양 용기에 부착된 세포에서 소교세포를 관찰한 바 뇌조직에서 나타나는 SM형과 LM형이 동시에 출현되는 것을 알 수 있었다. 또한 몇몇 세포에서는 포유동물의 뇌세포에서 볼 수 있는 활성세포를 관찰할 수 있었는데 이 소교세포는 아메바형 세포로 동정할 수 있었다(Fig. 2, D). 따라서 틸라피아(*Oreochromis spilurus*)의 CNS에서 관찰된 것과 비슷하였다(Dowling *et al.*, 1991).

신경교성상세포는 소교세포의 크기가 컸으며, 핵의 형

태는 분명하지 않으나 다량의 세포질을 함유하고 있었지만 모세혈관의 분화는 없었다. 희돌기세포는 Fig. 1, D에서 보는 바와 같이 불규칙적인 핵을 가지고 있었고, 주위에 myelinated axon을 가지고 있어서 포유동물에서 나타나는 특징과 유사하였다. 이와같이 무지개송어에서도 최소한 뇌조직에서의 면역반응을 일으킬 수 있는 소교세포와 신경교성상세포가 존재함을 알 수 있어서 그 기능에 대한 역할이 매우 주목된다.

따라서 본 연구에서는 그 기능을 알아보기 위해서 NOS 활성을 뇌조직에서 측정할 때 매우 흥미로운 사실을 발견할 수 있었다. NOS는 흔히 개체내의 세포의 종류에 따라서 특징이 다른데, 우선 뇌조직에서 발견되는

Fig. 2. Cultured cells from rainbow trout brain cells. A. Microglia(M) and astrocyte(A). $\times 1,200$. B. Microglia. $\times 15,000$. C. Small microglia(SM) and large microglia(LM). $\times 10,000$. D. Activated microglia. $\times 10,000$.

칼슘에 의존적인 것과 (Hiki *et al.*, 1991), interferon- γ (IFN- γ)와 lipopolysaccharides(LPS) 혹은 tumor necrosis factor(TNF) 등의 연쇄적 자극에 의해 NOS가 발현되어 NO를 생성한다고 알려졌다(Stuehr and Marletta, 1987). 저자들은 말초 백혈구(peripheral blood leucocytes : PBLs), 간(liver) 및 head kidney leucocytes (HKL)에서 NOS 활성을 조사하였으나 매우 적은 양을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 그러나 뇌조직에서는 1.04 ± 0.12 pg/min/mg으로 현저히 높은 NOS 활성을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 또한 NO가 L-arginine과 칼슘에 의존적인지 알아보기 위해서 L-arginine의 inhibitor인 N^G-monomethyl-L-arginine monohydrate(N^G-MMA)와 칼

슘 inhibitor인 EGTA(ethylene glycol bis(β -aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid)을 첨가하여 NOS 활성을 측정할 때 유의성 있는($P < 0.05$, $P < 0.01$) 결과를 얻었다.

따라서 본 연구의 결과는 Schober 등(1993)이 무지개송어의 뇌조직에서 NADPH-diaphorase의 출현 결과와 유사하여 분명히 무지개송어의 뇌조직세포에서는 NO 생성과 관련된 세포가 있는 것으로 사료되며, 진화적 측면에서 NOS 유전자의 존재와 발현은 하등척추동물에서 이미 존재되어 수렴 진화된 것으로 추정된다.

한편 무지개송어의 시험관 내 탐식세포에서는 NOS 활성도 측정에는 실패하였다. 즉, 저자들은 Graham과

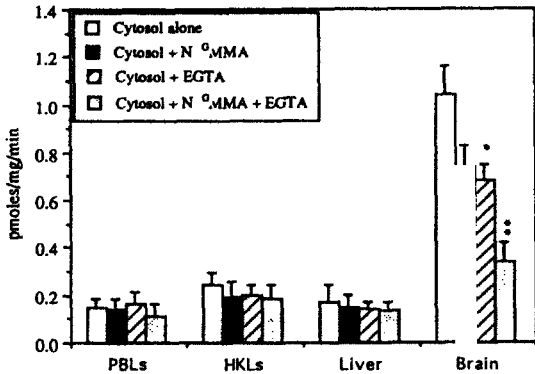


Fig. 3. Calcium dependence of nitric oxide synthase (NOS). Enzyme fractions obtained from peripheral blood leucocytes(PBLs), head kidney leucocytes(HKLS), liver, and brain. The enzyme activity was expressed as pmoles/min/mg protein in each fraction. Data were mean±SE of 3 separate experiments.

Secombes(1988)의 방법에 따라 head kidney leucocytes에 ConA와 PMA를 자극한 다음 48시간 배양 후 macrophage activating factor(MAF)를 취하여 여기에 human recombinant TNF- α 및 LPS, PMA, calcium ionophore 23187등 여러가지 물질로 자극해 NO 생성을 유도하였으나 실패하였다. 따라서 무지개송어의 탐식세포에서의 NO 생성은 좀 더 복잡한 세포 활성 물질이 필요한 것으로 사료되며, 생체내에 어류의 병원체를 감염시켜 NO 생성에 대한 실험적 관찰이 요망된다. 또한 뇌세포에 있어서도 소교세포 및 신경교정상세포 등을 순수 분리해 배양할 수 있는 배양 조건이 선행되어야 신경계내 면역세포의 기능 및 역할에 대해서 좀 더 확실해질 것으로 사료된다.

참고 문헌

Akiyama, H., S. Itagaki and P. L. McGeer : Major histocompatibility complex antigen expression on

rat microglia following epidural kainic acid lesions. *J. Neurosci. Res.* 20 : 147~157. 1988.

Bradford, M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248~254. 1976.

Bredt, D. S. and S. H. Snyder : Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 8 : 3~11. 1992.

Bredt, D. S. and S. H. Snyder : Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87 : 682~685. 1990.

Dowding, A. J., A. Maggs and J. Scholes : Diversity amongst the microglia in growing and regenerating fish CNS : Immunohistochemical characterization using FL 1. anti-macrophage monoclonal antibody. *Glia* 4 : 345~364. 1991.

Fierz, W., B. Endler, K. Reske, H. Wekerle and A. Fontana : Astrocytes as antigen expression on astrocytes by T cells via immune interferon and its effect on antigen presentation. *J. Immunol.* 134 : 3875~3881. 1985.

Fishman, P. S. and J. M. Savitt : Selective localization by neuroglia of immunoglobulin G in normal mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 48 : 212~220. 1989.

Frei, K., S. Bodmer, C. Schwerdel and A. Fontana : Astrocyte-derived interleukin-3 as a growth factor for microglia cells and peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 137 : 3521~3527. 1986.

Graham, S. and C. J. Secombes : The production of a macrophage-activating factor from rainbow trout *Salmo gairdneri* leucocytes. *Immunology* 65 : 293~297. 1988.

Hiki, K., Y. Yui, R. Hattori, H. Eizawa, K. Kosuga and C. Kawai : Three regulation mechanisms of nitric oxide synthase. *European J. Pharmacology-Molecular pharmacology Section.* 206 : 163~164.

- 1991.
- Hope, B. T., G. J. Michael, K. M. Knigge and S. R. Vincent** : Neuronal NADPH-diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88** : 2811~2814, 1991.
- Kaur, C., E. A. Ling and W. C. Wong** : Cytochemical location of 5'-nucleotidase in amoeboid microglial cells in postnatal rats. *J. Anat.* **139** : 1~7, 1984.
- Ling, E. A., C. Kaur and W. C. Wong** : Light and electron microscopic demonstration of non-specific esterase in amoeboid microglial cells in corpus callosum in postnatal rats : A cytochemical link to monocytes. *J. Anat.* **135** : 385~394, 1982.
- MacMicking, J. D., D. Q. Willenborg, M. J. Weidemann, K. A. Rockett and W. B. Cowden** : Elevated secretion of reactive nitrogen and oxygen intermediates by inflammatory leukocytes in hyperacute experimental autoimmune encephalomyelitis. Enhancement by the soluble products of encephalitogenic T cells. *J. Exp. Med.* **176** : 303~307, 1992.
- Maggs, A. and J. Scholes** : Reticular astrocytes in the fish optic nerve : Microglia with epithelial characteristics form an axially repeated lacework pattern, to which nodes of Ranvier are apposed. *J. Neurosci.* **10** : 1600~1614, 1990.
- Moncada, S., R. J. J. Palmer and E. A. Higgs** : Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. pharmacol.* **38** : 1709~1715, 1989.
- Regidor, J. and L. Poch** : Histochemical analysis of the lizard cortex : an acetylcholinesterase cytochrome oxidase and NADPH-diaphorase study. In W. K. Schwedtfeger and W. J. A. J. Smeets (Eds.), *The Forebrain of Reptile*. Karger, Basel, pp. 77~84, 1988.
- Righi, M., L. Mori, G. De Libero, M. Sironi, A. Biondi, A. Mantovani and S. D. Donini** : Monokine production by microglial cell clones. *Eur. J. Immunol.* **19** : 1443~1448, 1989.
- Sato, T.** : Histochemical demonstration of NADPH-diaphorase activity in the pineal organ of the frog (*Rana esculenta*), but not in the pineal organ of the rat. *Arch. Histol. Cytol.* **53** : 141~146, 1990.
- Stuehr, D. J. and M. A.** : Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, or interferon- γ . *J. Immunol.* **139** : 518~525, 1987.

**Cell characterization and Nitric Oxide Synthase in the
Central Nervous System of the Rainbow Trout
(*Oncorhynchus mykiss*)**

Seon Il Jang, Min Sun Choi* and Young Gill Kim*

Department of Biology, college of Natural Science, Chonbuk National University, Chonju 560-756, Korea.

**Department of Fish Pathology, college of Ocean Science and Technology, Kunsan National University, Kunsan
573-400, Korea*

Nitric oxide(NO) has recently been shown to play an important role on central nervous system(CNS) function in mammals. It is synthesized from L-arginine by the enzyme NO synthase. In this study, we examined this enzyme's existence in CNS of rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) and described the forms of microglia, astrocytes, and oligodendrocytes. Two forms of microglia are distributed in CNS, one resembling their mammalian counterpart(large microglia : LM), and the other comprising small microglia(SM) with very little cytoplasm. CNS contained astrocytes of a distinct type which form reticular network, but lack connections to capillaries. The oligodendrocyte was generally a much denser cell than the astrocyte. We have detected NOS(1.04 ± 0.12 pg/min/mg) from rainbow trout CNS. It could be inhibited reversibly or irreversibly by N^mMMA and EGTA. These result suggest that the formation of NO from L-arginine in CNS is calcium-dependent and a pathway of early evolutionary origin.

Key Words : Microglia, astrocytes, oligodendrocytes, CNS, nitric oxide synthase