

신생 백서 척수후근절의 슈반세포 배양을 위한 Ara-C 분열억제제의 최적 효과에 대한 연구

김성민^{1,2} · 이종호¹ · 안강민¹ · 김남열¹ · 성미애¹ · 황순정¹ · 김지혁² · 장정원³

¹서울대학교 치과대학 구강악안면외과, ²강릉대학교 치과대학 구강악안면외과,

³연세대학교 의과대학 약리학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2004;30:100-107)

THE MOST APPROPRIATE ANTIMITOTIC TREATMENT OF ARA-C IN SCHWANN CELL-ENRICHED CULTURE FROM DORSAL ROOT GANGLIA OF NEW BORN RAT

Soung-Min Kim^{1,2}, Jong-Ho Lee¹, Kang-Min Ahn¹, Nam-Yeol Kim¹, Mi-Ae Sung¹,

Soon-Jeong Hwang¹, Ji-Hyuck Kim², Jeong-Won Jahng³

Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Seoul National University¹,

Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Kangnung National University²,

Department of Pharmacology, Yonsei Medical School³

Schwann cell, one of important components of peripheral nervous system, interact with neurons to mutually support the growth and replication of embryonal nerves and to maintain the different functions of adult nerves. The Ara-C, known as an antimitotic agent, have been used to have high effectiveness in eliminating fibroblasts during Schwann cell culture period. This enrichment effect is also known to be cumulative with each successive pulse of Ara-C applied and is due to a progressive loss of fibroblasts. But the cytotoxicity by Ara-C is also cumulative and noticeable over the period.

To determine the most effective application time and interval of Ara-C in the Schwann cell culture, we observed the Schwann cell purity and density with the Ara-C treatment in plain and three-dimensional culture from dorsal root ganglion of new born rat. By culturing dispersed dorsal root ganglia, we can repeatedly generate homogenous Schwann cells, and cellular morphology and cell count with mean percentages were evaluated in the plain culture dishes and in the immunostainings of S-100 and GFAP in the three-dimensional culture.

The Ara-C treated cultures showed a higher Schwann cell percentage ($31.0\% \pm 8.09\%$ in P4 group to $65.5\% \pm 24.08\%$ in P2 group), compared with that obtained in the absence of Ara-C ($17.6\% \pm 6.03\%$) in the plain culture after 2 weeks. And in the three-dimensional culture, S-100 positive cells increased to $56.22\% \pm 0.67\%$ and GFAP positive cells to $66.46\% \pm 1.83\%$ in G2 group ($p < 0.05$), higher yield than other groups with Ara-C application.

Therefore, we concluded that the Ara-C treatment is effective for the proliferation of Schwann cells contrast to the fibroblasts *in vitro* culture, and the first application after 24 hours from cell harvesting and subsequent 2 pulse treatment (P2 group in plain culture and G2 group in three-dimensional culture) was more effective than other application protocols.

Key words : Schwann cells, dorsal root ganglia, S-100, GFAP, Ara-C

I. 서 론

이종호

110-768, 서울특별시 종로구 연건동 28

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Jong-Ho Lee

Department of OMFS, College of Dentistry, Seoul National University

#28, Yeongun-dong, Jongro-gu, Seoul, 110-768, South Korea

Tel : 82-2-760-2630 Fax : 82-2-766-4948

E-mail : leejongh@plaza.snu.ac.kr

슈반 세포는 말초신경 재생을 위한 주된 지지 성분 (supporting factor)으로, 이미 성장이 완료된 개체의 말초 신경에서 배양된 슈반 세포를 분화 (differentiation), 증식 (proliferation)하는 것은 매우 어려운 배양 과정으로 알려져 있다. 체외 배양(*In vitro*)에서 생활력 있는(viable) 슈반 세포를 많이 배양하기 위해서는 여러 가지

※ This study was supported by a grant of the Korea Health 21 R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea. (02-PJ1-PG1-CH07-0001)

요소들에 의존하며 다양한 효소 처리(enzymatic and mechanical dissociation)를 거쳐야 한다^{1,9}.

이 중에서 주된 배양 기법중 하나는 heregulin이나 adenylyl cyclase activators⁹, pituitary extract^{6,9}, activated killer lymphocytes가 분비하는 lymphokins⁷ 그리고 axolemmal fragments⁸ 와 같은 분열 촉진제(mitogen)를 사용하는 것으로, 이러한 촉진제는 세포 자체에 여러 효과를 가져오므로 연속하여 사용(successive passages)시 슈반 세포에 대해 지속적인 평가가 필요하다. 또한, 슈반 세포의 증식에 불필요한 다른 세포들의 배양을 줄이는 방법이 역으로 많은 수의 슈반 세포를 얻기 위한 배양 기법의 하나라 할 수 있겠는데, 주로 적은 농도로 섬유모세포(fibroblast)의 증식을 억제하기 위한 제제로는 cholera toxin, forskolin, isobutyl-methyloxanthine 그리고 8-bromo-cAMP와 같은 adenylyl cyclase 등을 생각할 수 있다⁹. 이중 Ara-C와 5-fluorouracil과 같은 분열억제제(antimitotics)는 특히 섬유모세포를 제거하는데 효과적이는데, Ara-C의 경우 연속적인 펄스(successive pulse)에 의한 축적 효과(cumulative effect)를 기대할 수 있으나 또한 지나친 축적 효과에 따른 세포 독성(cytotoxicity) 가능성도 고려하여야 한다.

본 연구에서는 신생 백서의 척수후근절로부터 슈반 세포를 보다 많이 배양하기 위해서 분열억제제인 Ara-C의 가장 적당한 처리 방법을 찾기 위한 것으로^{3,10-12}, 평면 배양(plain culture) 및 삼차원 체외 배양(three-dimensional cultures *in vitro*)에서 효소분해 배양법을 통해 서로 다른 조건의 Ara-C 처리 후, 가장 많은 수의 슈반 세포를 얻을 수 있는 조건을 찾고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 신생 백서의 척수 후근절로부터 일차세포 배양

(Primary cell culture from dorsal root ganglia [DRG] of new born rat)

해부현미경 (Fig. 1, 2. Olympus SZ-40)을 이용하여 신생 Sprague Dawley (Sam:TacN [SD] BR) 백서의 척수후근절을 일차배양하였

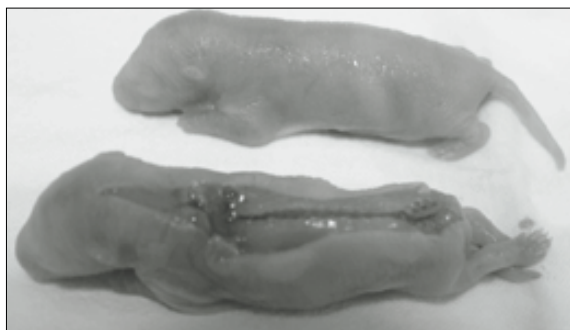


Fig. 1. Sprague Dawley 1 day rat

는데, 주 배양액 (main culture medium)은 MEM (Eagle's Minimum Essential Medium) 93 ml, 마혈청 (horse serum) 5 ml, 50% 포도당과 2 mg/ml 겐타마이신 1 ml 등으로 만들었다.

배양된 척수후근절은 해부 현미경 하에 잘게 잘라서 phosphate-buffered solution (PBS, pH 7.4, Gibco, USA)에서 0.25% 콜라제나아제 (Worthington collagenase type I, USA) 1 ml 와 0.2% DNase (Gibco, USA) 0.1 ml 를 이용하여 효소 처리하여 70분간 37°C에서 배양하였다. 800 rpm에서 5분간 원심 분리후, 0.125% trypsin-EDTA (Gibco, USA) 2 ml 를 추가하여 10분간 37°C에서 배양한 후, 주 배양액 5 ml 를 사용하여 부드럽게 피펫팅하여 넓게 퍼뜨렸다. 넓게 퍼진 세포들은 다시 5분간 1000 rpm에서 원심 분리한 후 주 배양액으로 3회 씻어낸 후, 배양 용기 (polyethylene coated dish, Sigma & Corning, USA)에서 배양시켰다.

섬유모세포를 제거하고 순수한 슈반세포들을 모으기 위해 분열억제제 (antimitotic agent)로서 Ara-C (Cytosine -D-Arabinofuranoside, Sigma, USA)를 사용하는 과정에서 아래 3항과 같이 서로 실험 계획을 만들었으며, 그 밖에 자세한 배양 기법은 이미 발표된 문헌 (Lee's culture technique)을 참조하였다^{11,12}.

2. Matrigel® 위의 3차원 슈반 세포 배양

(Three-dimensional cell culture on Matrigel®)

13 mm 직경의 소독된 커버글라스에 20-30 ul의 세포외기질 겔 (GFR Matrigel®, BD Biosciences, USA)을 얇게 깔아준 후, 미리 얼려 둔 피펫 (precooled pipett)을 이용하여 얇은 막을 형성하도록 한 후, 척수후근절로부터 채취된 조직을 바로 조심스럽게 배양 (plated)하였다 (Fig. 3-a, b). 배양 용기내의 커버글라스 (coverslip in 35-mm Petri dishes)를 37°C, 95% air / 5% CO₂ 배양기에서 15분간 두어 매트리지엘®이 고체화되도록 한 후, 주배양액 2 ml를 이용하여 부유 배양 (cultured in rafting fashion)하고, 이 후 2주간 상기의 일차 세포 배양과 같은 방법으로 배양하였다¹¹⁻¹⁴.

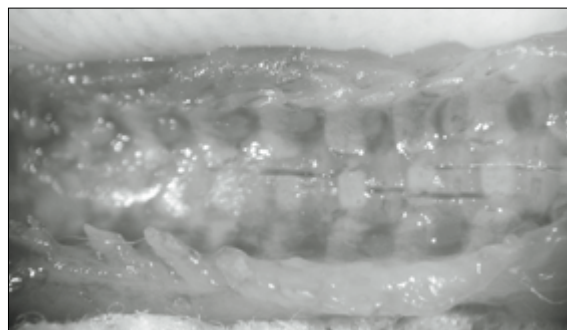


Fig. 2. Dissected spine for dorsal root ganglia harvesting under a dissecting microscope

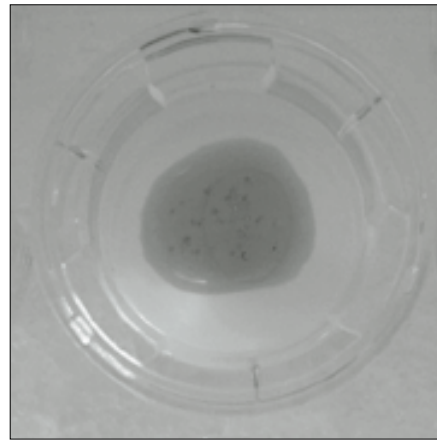
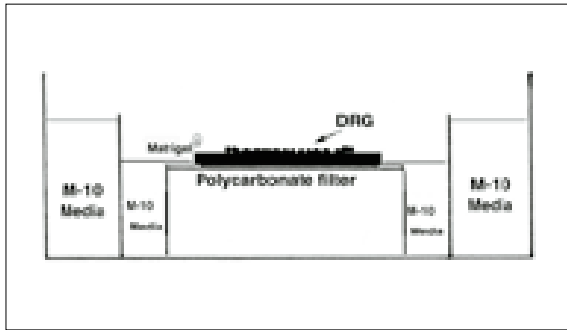


Fig. 3. Dorsal root ganglia cells plated on Matrigel®

Fig. 4. Schem of experimental conditions applied to individual groups.

| Exp. Group | Each pulses (Ara-C 1µl/ml) | | | | | | | Eval. |
|------------|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| | 1st | 2nd | 3rd | 1st | 2nd | 3rd | 3rd | |
| P 1 (G 1) | | | | | | | | |
| P 2 (G 2) | | | | | | | | |
| P 3 (G 3) | | | | | | | | |
| P 4 (G 4) | | | | | | | | |
| Days | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| | (2 weeks) | | | | | | | |

0 : Initial culture day, Eval. : Evaluation

P 1-4 : Plate group 1-4, G 1-4 : Three-dimensional culture group 1-4

3. 다른 실험 조건의 부여 (Experimental design)

평면 배양 및 3차원 배양군은 배양 과정에서 각각 4군으로 나누어서 Cytosine arabinoside (Ara-C, 1 µl/ml, 5mM)을 평면 배양군에서 배양한 첫날 (P1), 24시간 뒤 (P2), 48시간 뒤 (P3) 및 72시간 뒤 (P4) 에 각각 처음 처리하였는데, 각 군은 5mM Ara-C를 포함하는 새 배양액으로 처음부터 모두 3회가 되도록 2일 간격으로 처리했다. 또한, 3차원 배양군도 각각 G1, G2, G3, G4 군으로 분류하여 같은 방법 및 같은 간격으로 Ara-C를 처리하였다. 이때 체외 배양이 잘 되도록 성장인자로서 GDNF (0.2 µg/ml)를 2회씩 같이 처리하였다.

또한, Ara-C를 전혀 처리하지 않은 군(P-C, G-C)을 조절군으로 하였다 (Fig. 4).

4. 3차원 배양군의 면역조직화학 염색 평가 (Immunostaining of three-dimensional culture groups)

3차원 배양군(G1-G4)의 각 군별 슈반 세포의 순도 및 밀도를 평가하기 위해 2주뒤, 3차원 배양한 매트리지엘®로 3µm 크기의 조

직 절편을 만들어서 각각 H&E 염색과 S-100 항체 (rabbit, 1:100, Dako, Denmark) 및 GFAP (glial fibril acidic protein) 항체 (rabbit, 1:100, Pharmingen, USA)를 이용한 면역조직화학적 염색을 시행하였다.

면역세포화학적 염색은 PAP 간접법을 시행했는데, 간략히 살펴보면, pH 7.4의 PBS에서 재수화 시킨 후, 30분간 0.6% 과산화수소로 배양하여 내산화 성분을 비활성화시키고, 1:50의 정상 돼지 혈청으로 비특이 환경을 없애준 다음 각각 1시간 동안 rabbit polyclonal S-100 항체와 rabbit polyclonal GFAP 항체와 같은 일차 항체를 반응시켰다. 이차 항체 (horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody)를 1시간 동안 반응시키고, 마지막으로 염화벤질 염화수소 발색제 (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride chromogen, DAB, Dako, Denmark)로 10분간 배양시킨 후, 10배 희석된 헤마톡시린으로 8분간 역염색(counterstain)하였다⁹⁾.

5. 세포수 산정 (Cell count)

배양 용기 내의 세포 수는 역광현미경 (inverted microscope, Leica Cambridge Ltd., UK)과 혈구계산판 (hemocytometer)을 이용

III. 결 과

1. 평면 배양한 세포 수에 대한 평가 (Evaluation of cells in plain cultured dishes)

2주간 평면 배양 후에 세포들의 분화 및 증식 상은 두 가지 형태로 관찰되었는데 (Fig. 5), 슈반세포는 긴 양극성 (long bipolar) 또는 삼극성 (tripolar)의 돌기를 지니고 타원형의 핵 (oval nucleus)을 지닌 방추형 (spindle-shaped)의 세포 모양을 가졌으며, 상대적으로 섬유모세포는 크고 둥근 모양의 핵과 뭉툭한 세포돌기를 지닌 편평한 다원형 (flattened polygonal shape)의 모양을 가진 것으로 형태적으로 나누었다. 이처럼 세포 형태로 구분하여 한 결과 슈반세포의 순도를 평가하였는데 전체 세포수에 대한 슈반세포의 비율을 계산하였다 (Table 1, Fig. 9).

2. 매트리지엘® 상에 3차원 배양한 세포 수의 평가 (Evaluation of three-dimensionally cultured cells on Matrigel®)

3차원 배양한 젤상을 연속 절편 (serial sections)으로 만들어서

하였으며, 세포체와 세포핵의 형태를 기준하여 여섯개의 임의의 시야 (배율 100, 1mm²) 내의 전체 세포 수와 슈반세포 수를 계산하였는데, 오차를 줄이기 위해 고르지 못한 세포나 덩어리로 되어 있는 세포는 제외시켰다. 경계선상의 세포는 한번씩만 계산하였고 동일한 연구자가 3회 산정하여 평균치를 산정하였으며, 계산된 세포수에 10,000배를 해서 1 ml 안의 세포수를 구하였다^{12,15,16}.

컴퓨터 분석영상 장치 (ImageTool® computer analysis image system, Version 2.0 Alpha 3 [patch level 1])를 이용해 면역 반응에서 양성을 보인 세포들을 세었는데, 각 실험군에서 최소 3회 이상 세어서 평균값을 산정하였다.

6. 통계 분석 (Statistical Analysis)

평면 배양 및 3차원 배양에서 얻어진 모든 정량적인 결과는 통계 프로그램 (SPSS R10.0.7, SPSS Inc.)의 Student's t-test를 이용하여 유의성을 검증하였으며, 각 군간의 비교정량적 차이 (semiquantitative differences)를 비교하기 위해 Mann-Whitney U-test를 이용했다. 유의 수준은 5%로 p-value는 0.05보다 작은 것 (P<0.05)만을 유의성 있는 것으로 택하였다.

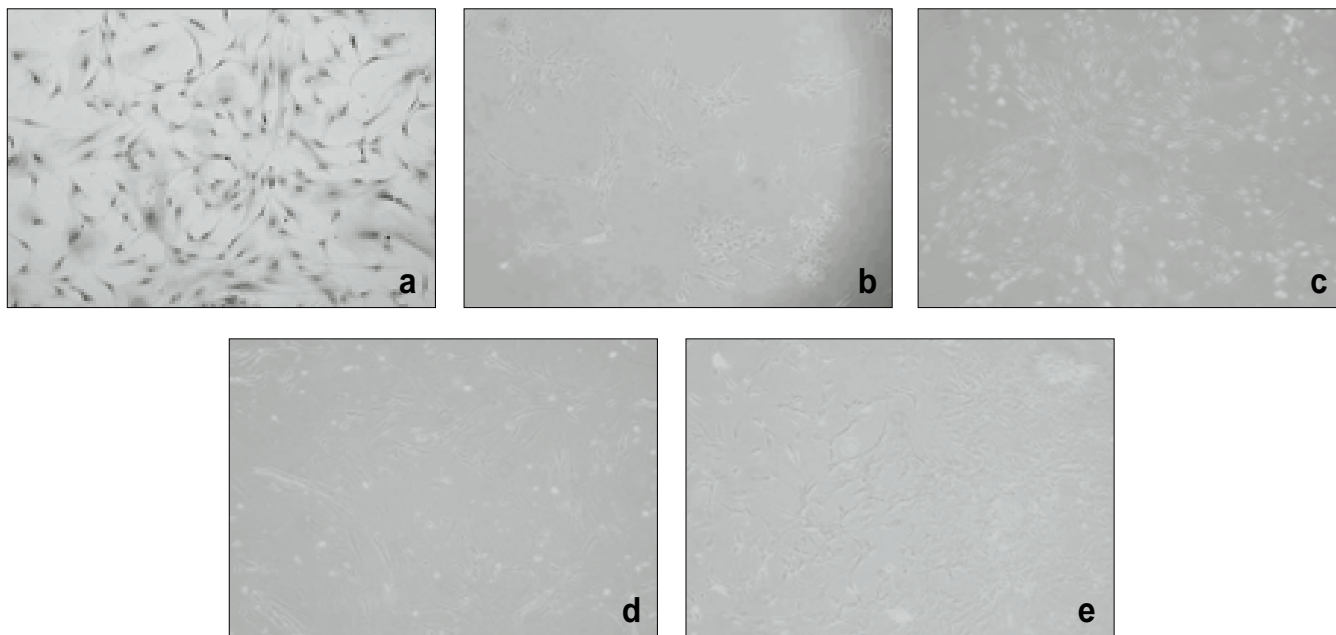


Fig. 5. Photomicrographs of plain cultured cells

- a. Control group showing flattened polygonal shape with a large round nucleus and blunt cytoplasmic processes (H&E stain, ×100)
- b. P1 group after 2 week culture (Phase contrast, ×200)
- c. P2 group showing abundant cells with multi-polar processes and spindle-shaped morphology (Phase contrast, ×100)
- d. P3 group (Phase contrast, ×200)
- e. P4 group showing fibroblast-like cells with polygonal shape and blunt cytoplasmic processes (Phase contrast, ×200)

Table 1. Cell number by cellular morphology & mean percentage

| | Spindle-shaped, bi-polar | Mean (%) |
|-------|-----------------------------|----------------------|
| P-C | $7.30 \pm 1.52 \times 10^4$ | $17.6\% \pm 6.03\%$ |
| P 1 * | $3.02 \pm 0.43 \times 10^5$ | $32.0\% \pm 4.55\%$ |
| P 2 * | $6.80 \pm 2.50 \times 10^5$ | $65.5\% \pm 24.08\%$ |
| P 3 * | $3.56 \pm 1.58 \times 10^5$ | $45.3\% \pm 20.10\%$ |
| P 4 * | $1.80 \pm 0.47 \times 10^5$ | $31.0\% \pm 8.09\%$ |

Each data were counted using a hemocytometer and * means significant data (p<0.05)

Mean value (%) was the ratio of spindle-shaped cells to total counted cells

P-C : cytosine arabinoside was not applied during two weeks

P1 group : cytosine arabinoside (Ara-C, 1 μ l/ml, 5mM) was applied on the harvesting day

P2 group : Ara-C was applied after 24 hour

P3 group : Ara-C was applied after 48 hour

P4 group : Ara-C was applied after 72 hour

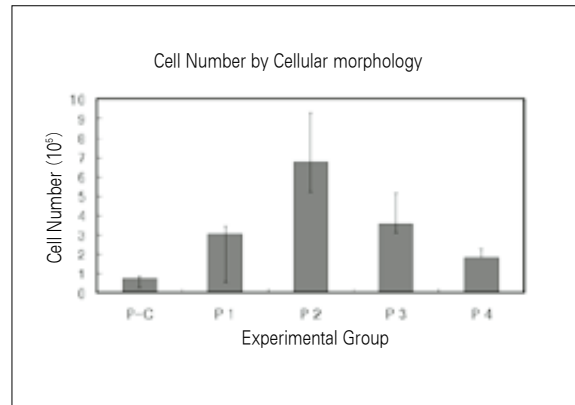


Fig. 6. Cell number comparisons by cellular morphology
 P-C : cytosine arabinoside was not applied during two weeks
 P1 group : cytosine arabinoside(Ara-C, 1 μ l/ml, 5mM) was applied on the harvesting day
 P2 group : Ara-C was applied after 24 hour
 P3 group : Ara-C was applied after 48 hour
 P4 group : Ara-C was applied after 72 hour

Table 2. Cell number and relative percentage (%) respect to the H&E stained cells in three-dimensional culture after 2 weeks

| | H&E | S-100 | GFAP |
|-----|-------------------|--|---|
| G 1 | 297.02 ± 23.4 | 144.80 ± 8.8 (48.75% \pm 1.75%) | 173.21 ± 16.2 (58.31% \pm 0.81%) |
| G 2 | 343.62 ± 12.5 | 193.21 ± 9.4 (56.22% \pm 0.67%) | 228.4 ± 14.7 (66.46% \pm 1.83%) |
| G 3 | 438.72 ± 22.5 | 125.93 ± 8.9 (28.70% \pm 0.53%) | 108.93 ± 10.0 (24.82% \pm 0.96%) |
| G 4 | 452.96 ± 36.7 | 98.83 ± 17.2 (21.81% \pm 1.88%) | 89.32 ± 7.4 (19.72% \pm 0.03%) |

Each data were counted using ImageTool[®] computer analysis image system and all data was significant (p<0.05).

G1 group : cytosine arabinoside (Ara-C, 1 μ l/ml, 5mM) was applied on the harvesting day

G2 group : Ara-C was applied after 24 hour

G3 group : Ara-C was applied after 48 hour

G4 group : Ara-C was applied after 72 hour

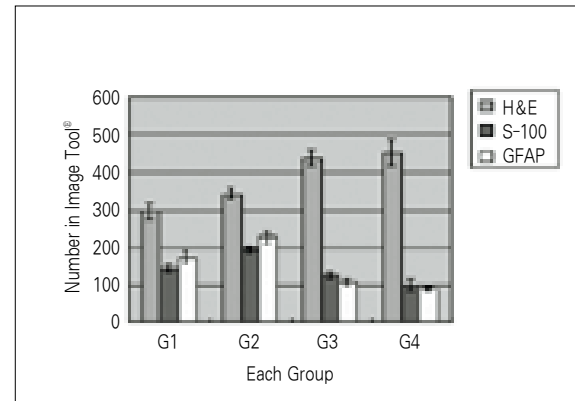


Fig. 7. Cell number comparisons in three-dimensional culture after 2 weeks.
 G1 group : cytosine arabinoside (Ara-C, 1 μ l/ml, 5mM) was applied on the harvesting day
 G2 group : Ara-C was applied after 24 hour
 G3 group : Ara-C was applied after 48 hour
 G4 group : Ara-C was applied after 72 hour

컴퓨터 분석영상 장치 (ImageTool[®] computer analysis image system, Version 2.0 Alpha 3 [patch level 1])를 이용하여 400배상에서 전체 세포수를 계산하였는데, 최소 3회 이상 구한 값을 평균화하였다 (Table 2 and Fig. 7). S-100 면역조직화학 염색에서는 G2군에서 가장 많은 수의 양성 세포들이 많은 세포외 콜라겐 기질 (extracellular collagen matrix)과 같이 관찰되었으며, G1군에서 다음으로 많은 수가 보였다. 전형적인 난원형인 세포체와 명확한

핵질 및 양극성의 돌기를 지니는 성상의 세포들도 역시 G2군에서 많이 관찰되었다. GFAP 면역조직화학 염색에서 반응한 정상 세포 (astrocyte) 및 성상고전구 세포들 (astroglial precursor cells)도 G2군 및 G1군에서 많이 관찰되었다(Fig. 8-c, 9-c).

또한, 각 군별로 면역조직화학 염색에서 양성 반응을 보인 세포들의 H&E에 염색된 전체 세포들에 대한 비율을 Table 2에서 정리하였다.



Fig. 8. Representative photomicrographs of three-dimensional culture in Group 1 (Phase contrast $\times 400$)

- a. H&E stain
- b. S-100 immunocytostain showing the typical oval shaped cell body with a prominent nucleus and bipolar extensions, overall spindle shape, most likely Schwann cells
- c. GFAP immunocytostain, showing abundant astrocyte proliferation



Fig. 9. Representative photomicrographs of three-dimensional culture in Group 2

- a. H&E stain (Phase contrast $\times 200$), showing multiple neurite projections
- b. S-100 immunocytostain (Phase contrast $\times 400$), showing bipolar or some tripolar cells were found
- c. GFAP immunocytostain (Phase contrast $\times 200$), with abundant astrocyte and astroglial precursor cells



Fig. 10. Representative photomicrographs of three-dimensional culture in Group 3 (Phase contrast $\times 400$)

- a. H&E stain
- b. S-100 immunocytostain
- c. GFAP immunocytostain



Fig. 11. Representative photomicrographs of three-dimensional culture in Group 4 (Phase contrast $\times 400$)

- a. H&E stain
- b. S-100 immunocytostain
- c. GFAP immunocytostain

IV. 고 찰

슈반 세포는 말초신경 손상이나 수초화변성 (demyelination) 및 종양화 (tumorigenesis)와 같은 병적인 상태에서 분화하여, 축삭의 재생 (axonal regeneration)을 촉진하는 것으로 알려져 있는 세포부착물질 (cell adhesion molecules)이나 기저막 성분들 (basement membrane components)과 같은 다양한 신경영양 인자들 (neurotrophic factors)을 분비한다¹⁻³. 백서 좌골신경 (Rat sciatic nerve)에서의 슈반 세포 연구는 여러 세포분화 촉진 요소들 (mitogenic factors)을 중요시할 수 있는데, 백서의 슈반 세포 분화를 촉진시키는 분화촉진제들은 인체내의 슈반 세포 증식에도 효과적인 것으로 알려져 있다. Ara-C는 독성이 강하지 않으면서 인체내 말초신경 세포 배양에 응용할 수 있는데^{7,10}, 본 연구에서는 백서의 척수후근절에서 분화시킨 슈반 세포의 증식-자극 활성도 (proliferation-stimulatory activity)를 고려하였다. 슈반 세포의 수를 많게 하기 위한 전략으로는 슈반 세포 자체의 분화를 촉진시키거나 다른 섬유모세포와 같은 비신경 세포들의 수를 줄여야 하는데, Ara-C는 슈반 세포의 수를 증가시켜서 분화를 촉진시키는 것으로 알려져 있다⁴⁰.

이처럼 체외배양에서의 슈반 세포의 수를 증가시키고 다른 세포들을 감소시킬 수 있는 대표적인 제제로서 cholera toxin, forskolin, isobutyl-methylxanthine 그리고 8-bromo-cAMP와 같은 adenylate cyclase를 생각할 수 있는데, 낮은 농도에서 섬유모세포의 분화를 억제하는데 효과적인 것으로 알려져 있다⁹. 또한, 5-fluorouracil과 더불어 대표적인 분열억제제로 알려져 있는 Ara-C는 큰 부작용 없이 인체내 말초신경 세포의 배양에 유용한 것으로 보고되고 있다^{7,10}. 슈반 세포수의 증가를 위해서는 Ara-C의 축적 (cumulative) 효과를 이용하여 섬유모세포 수를 연속적으로 줄여주도록 하는 지속적인 처치 (successive pulse)가 필요하나, 많은 양이 축적될 경우 생길 수 있는 세포독성 (cytotoxicity)에 대한 고려가 반드시 필요하다.

Ara-C 처치가 없을 경우, 배양후 1-2 주까지 슈반 세포의 수는 변화없이 유지되려 하나 섬유모세포는 보다 빠른 속도로 분화하게 되어 결과적으로 섬유모세포의 접촉 저해 (contact inhibition) 현상으로 슈반 세포의 성장 및 분화는 억제되게 된다¹⁷. Casella 등¹⁸ 및 Ansselin 등¹⁹ 도 사람의 1 cm 길이의 9.9±0.6 mg의 dry fascicles에서 heregulin과 forskolin 처치를 통해 대략 10⁶ 개의 슈반 세포를 얻을 수 있다는 보고에서 2주 체외 배양 기간내의 Wallerian변성 과정을 겪으면서 많은 수의 슈반 세포를 얻을 수 있다고 하였다^{7,19}. 따라서, 본 연구에서도 초기 배양 후 2주의 관찰 기간을 가졌으며, 백서의 척수후근절로부터 기존의 배양방법을 응용한 효소 처리법 (Lee's culture technique)^{11,12}을 이용해서 다른 분열억제제의 추가 없이 Ara-C의 단독 효과만을 보고자 했는데, 평면배양 4군에서 31.0%±8.09% 및 평면배양 2군에서 65.5%±24.08%의 슈반 세포 비율을 보여 Ara-C 처치 없이 배양한 대조군의 17.6%±6.03%보다 우수한 결과를 얻을 수 있었다.

섬유모세포는 특히, Wallerian변성이나 축삭돌기 재생과정에서 세포외기질 (extracellular matrix)내에 슈반 세포의 축적을 촉진하

는 주된 기능을 가지는 신경 재생에 있어서는 필수적인 성분이라 할 수 있다. 또한, 섬유모세포는 말초신경에 있어 물리적 (mechanical), 영양공급 (nutritional) 및 보호 (protective) 기능에서도 중요한 역할을 담당하는데, 신경간 조직내의 섬유모세포는 신경간 공간 (nerve gap)을 연결 (bridge)시키는 기능을 하여 장차 축삭돌기나 슈반 세포와 같은 재생에 필요한 여러 세포 성분들이 자라나게끔 하는 유도 (guide) 역할을 하게 된다. 그러나, GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor)를 만드는 과정에서 수초 형성을 억제하기도 하는데, 대식세포 (macrophages)와 슈반 세포 표면의 MAC-2 (galactose-specific lectin)의 과다 발현 (upregulate)을 통해 수초 대식 작용 (myelin phagocytosis) 등의 대식 세포 기능을 활성화시킨다. 또한, 섬유모세포의 과다 증식은 말초 신경의 섬유화 (fibrosis)를 유발하여 신경 절단부의 반흔 형성 (scar formation)을 가져와서 결과적으로는 신경 재생을 방해하게 된다. 따라서, 위에서 나열한 바와 같이 섬유모세포의 기능을 유지할만큼 최소한의 필요한 수가 유지되면서 최대한의 많은 슈반 세포들이 존재해야 신경 재생을 위한 바람직한 조성이라 할 수 있다^{20,21}.

말초 신경 재생을 위해서는 여러 세포의 기질, 신경영양 인자 및 세포 성분들의 상호 작용이 필요한데, 세포 성분에는 주로 신경 세포와 슈반 세포의 두 종류의 세포가 관여하게 된다. 슈반 세포는 말초 신경 재생에 있어 주된 지지 역할 (supporting factor)을 하는데 손상받은 신경이 재성장하기 위해 필요한 여러 환경적 요소들을 제공 (permissive climate)하며, 특히 초기 신경 재생시에 축삭돌기가 절단 (axotomy)된 후 신경 간격 (nerve gaps) 및 신경 손상에 반응하여 세포 분열이 촉진 (mitosis)되게 된다¹⁻³. 또한, 슈반 세포는 Wallerian 변성시에 NGF (nerve growth factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor), CNTF (ciliary neurotrophic factor), L1/Ng-CAM과 같은 cell adhesion molecules, N-cadherin 및 integrins 와 같은 여러 신경영양성 인자들 (neurotrophic factors)을 분비하며 라미닌 (laminin)과 같은 세포의 기질 성분도 분비하는데, 이러한 신경영양 인자들이 축삭돌기의 성장 및 신경 재생을 촉진시키는데 관여하게 되고, 슈반 세포막도 축삭돌기의 외부 성장 (axonal outgrowth)을 위한 매개체 (substrate)의 역할을 맡게 된다^{4,20}. 본 연구의 3차원 배양에서는 Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) mouse 육종에서 채취할 수 있는 용해성 기저막 기질 (solubilized basement membrane matrix)인 마트리젤[®]을 사용했는데, 성장 인자 성분이 최소화된 마트리젤[®] (growth factor reduced [GFR] Matrigel[®])의 주요 성분으로는 라미닌 (laminin, 61%), 4형 콜라겐 (collagen IV, 30%), 엔탁틴 (entactin, 7%), 황헤파린 당단백 (heparin sulfate proteoglycan, HSPG) 등이며, 또한 TGF-β, FGF (fibroblast growth factor), TPA (tissue plasminogen activator) 및 여러 성장 인자들을 포함하고, 부착 의존성 특징을 지닌다^{13,22,23}. 따라서, 마트리젤[®]의 성분들이 짧은 기간내에 슈반 세포의 체외 배양을 위한 좋은 환경을 제공하리라 예측할 수 있으며, 특히, 부착 의존성의 특성으로 신경체 및 다른 의존성 세포들 (anchorage dependent cells)의 3차원적인 배양에 장점을 가질 수 있다. 이 기질 내의 단백질이나 당단백 분자들 (proteoglycan macromole-

cules)은 신경 세포들의 이주와 축삭 돌기가 성장하는 것을 유도하는 것을 조절하는 3차원적인 경로 (three-dimensional pathways)를 제공하게 된다^{20,22,23}).

GFAP 및 S-100 면역조직화학 염색법을 통해 3차원 배양된 슈반 세포의 반응 정도 (antigenic profile)를 알아본 결과 2군에서 S-100 양성 반응을 보인 세포는 전체 세포수에 대해 $56.22\pm 0.67\%$, 초기 교세포 인지자 (early glial marker)인 GFAP 양성 반응은 $66.46\pm 1.83\%$ 를 보였는데, 다른 군보다 가장 높은 반응을 보였다 ($p<0.05$). GFAP 항체에 대한 면역 반응이 대개의 성인 슈반 세포에서는 약한 것을 고려하면 슈반 세포는 점차 성숙기로 접어들면서 GFAP 항체와의 반응 (GFAP expression)이 적어진다는 것을 확인할 수 있다^{18,24,25}).

이상과 같이 평면 배양 및 3차원 배양 모두에서 결론적으로 체외배양시 Ara-C 처리는 슈반 세포의 분화를 촉진시키고 섬유모세포의 분화를 억제하는데 효과적인 방법이며, 특히 처음 배양 후 24시간 후에 처음 처리 후 48시간 간격으로 2회 연속적으로 처리하는 것이 그 중에서도 가장 효율적인 배양 방법임을 알 수 있다.

V. 결 론

슈반 세포 배양에서 Ara-C의 가장 효과적인 처치 시기와 간격을 알아보기 위해 신생 백서의 척수 후근절을 이용하여 평면 배양 및 삼차원 배양에서의 슈반 세포 순도와 배양 정도를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 2주후 평면 배양에서는 Ara-C를 처치하지 않은 군 ($17.6\pm 6.03\%$)보다 Ara-C를 처치한 군 (P4군의 $31.0\pm 8.09\%$ 에서 P2군의 $65.5\pm 24.08\%$ 까지)에서 보다 높은 슈반 세포가 관찰되었다.
2. 3차원 배양에서는 G2군에서 S-100 양성 반응을 보인 세포가 $56.22\pm 0.67\%$, GFAP 양성 세포가 $66.46\pm 1.83\%$ 으로 다른 군에서보다 우수한 결과를 보였다.
3. Ara-C는 생체의 배양에서 섬유모세포보다 슈반세포의 분화를 위해서 효과적이며, 세포 배양 하루 뒤에 투여하여 연속적으로 2일 간격으로 2회 투여하여 (평면 배양에서 P2군과 삼차원 배양에서 G2군) 총 3회 투여하는 것이 다른 처치 방법보다 효과적이다.

참고문헌

1. Mirsky R, Jessen KR, Brennan A, Parkinson D, Dong Z, Meier C, Parmentier E, Lawson D. Schwann cells as regulators of nerve development. *J Physiology-Paris* 96:17-24, 2002.
2. Kioussi C, Gruss P. Making of a Schwann. *Trends Genet* 12:84-86, 1996.
3. Bryan DJ, Wang KK, Chakalis-Haley DP. Effect of Schwann cells in the enhancement of peripheral-nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg* 12:439-446, 1996.
4. Levi ADO, Bung RP, Lofgren JA, Meima L, Hefti F, Nikolics K, Silwkowski MX. The influence of heregulins on human Schwann cell

- proliferation. *J Neurosci* 15:1329-1340, 1995.
5. Brockers JP, Fields KI, Raff MC. Studies on culture rat Schwann cells. I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve. *Brain Res* 165:105-118, 1979.
6. Rutkowski JL, Kirk CJ, Lerner MA, Tennekoon GI. Purification and expansion of human Schwann cells in vitro. *Nat Med* 1:80-83, 1995.
7. Van den Berg LH, Baer PR, Sodaar P, Mollee I, Wokke JJ, Logtenberg T. Selective expansion and long-term culture of human Schwann cell from sural nerve biopsies. *Ann Neurol* 38:674-678, 1995.
8. Sobue G, Brown MJ, Kim SU, Pleasure D. Axolemma is a mitogen for human Schwann cells. *Ann Neurol* 15:449-452, 1984.
9. Calderon-Martinez D, Garavito Z, Spinel C, Hurtado H. Schwann cell-enriched cultures from adult human peripheral nerve: a technique combining short enzymatic dissociation and treatment with cytosine arabinoside (Ara-C). *J Neurosci Methods* 114:1-8, 2002.
10. Bolin LM, Iismaa TP, Shooter EM. Isolation of activated adult Schwann cells and a spontaneously immortal Schwann cell clone. *J Neurosci Res* 33:231-238, 1992.
11. Kim SM, Lee JH, Kim NY, Ahn KM, Choi WJ, Choi SH, Cha MJ, Lee JY, Hwang SJ, Jahng JW, Myoung H, Choi JY, Seo BM, Choung PH, Kim MJ. Improved protocol for schwann cell isolation and proliferation from rat dorsal root ganglia in vitro. *J Korean Academy Maxillofac Reconstr Surg* 25:265-272, 2003.
12. Freshney RI. Culture of animal cells; a manual of basic technique. 2000. 4th ed. Wiley-Liss Inc 9-18, 89-104.
13. Bellamkonda RV, Valentini RF. Fabrication and implantation of gel-filled nerve guidance channels. *Methods in Molecular Medicine*, 18, in Morgan JR, Yarmush ML. Tissue engineering methods and protocols. 1999. Humana Press Inc 101-119.
14. Terris DJ, Cheng ET, Uitley DS, Tarn DM, Ho PR, Verity AN. Functional recovery following nerve injury and repair by silicon tubulization: comparison of laminin-fibronectin, dialyzed plasma, collagen gel, and phosphate buffered solution. *Auris Nasus Larynx* 1999;26:117-122.
15. Benes FM, Lange N. Two-dimensional versus three-dimensional cell counting: a practical perspective. *Trends Neurosci* 2001;24:11-17.
16. Williams RW, Rakic P. Three-dimensional counting: an accurate and direct method to estimate numbers of cells in sectioned material. *J Comp Neurol* 1988;278:344-352.
17. Casella GTB, Wieser R, Bunge RP, Margitich IS, Katz J, Olson L, Wood PM. Density dependent regulation of human Schwann cell proliferation. *Glia* 30:165-177, 2000.
18. Casella GTB, Bunge RP, Wood PM. Improved method for harvesting human Schwann cells from mature peripheral nerve and expansion in vitro. *Glia* 17:327-338, 1996.
19. Anselin AD, Corbeil SD, Davey DF. Successfully culturing Schwann cells from adult peripheral nerve. *Acta Chir Austriaca* 30:15-19, 1998.
20. Levi ADO. Characterization of the technique involved in isolating Schwann cells from adult human peripheral nerve. *J Neurosci Methods* 68:21-26, 1996.
21. Shen ZL, Lassner F, Becker M, Walter GF, Bader A, Berger A. Viability of cultured nerve grafts: an assessment of proliferation of Schwann cells and fibroblasts. *Microsurg* 19:356-363, 1999.
22. Labrador RO, Buti M, Navarro X. Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair. *Experim neurology* 149:243-252, 1998.
23. Shen ZL, Berger A, Hierner R, Allmeling C, Ungewickell E, Walter GF. A Schwann cell-seeded intrinsic framework and its satisfactory biocompatibility for a bioartificial nerve graft. *Microsurg* 21:6-11, 2001.
24. Lopez TJ, De Vries GH. Isolation and serum-free culture of primary Schwann cells from human fetal peripheral nerve. *Experimental Neurology* 158:1-8, 1999.
25. Keilhoff G, Fansa H, Schneider W, Wolf G. In vivo predegeneration of peripheral nerves: an effective technique to obtain activated Schwann cells for nerve conduits. *J Neuroscience Methods* 89:17-24, 1999.