

## 조롱박신경세포의 변성에 따른 버그만아교세포의 면역조직학적 연구

윤철중\*, 조사선<sup>1</sup>, 이하규, 박민철  
가톨릭대학교 생명과학과  
<sup>1</sup>서울대학교 의과대학 해부학교실

### Studies on Molecular Plasticity of Bergmann Glia following Purkinje Cell Degeneration

Chul Jong Yoon\*, Sa Sun Cho<sup>1</sup>, Ha Kyu Lee and Min Chul Park

Department of Life Sciences, Catholic University of Korea

<sup>1</sup>Department of Anatomy, College of Medicine, Seoul National University

(Received September 5, 2005; Accepted September 20, 2005)

#### ABSTRACT

Studies on molecular plasticity of Bergmann glia (BG) after harmaline induced Purkinje cell (PC) degeneration in the rat cerebellum. The intimate structural relationship between BG and PC, evidenced by the sheathing of the PC dendrites by veil like process from the BG has been suggestive of the close functional relationship between these two cell types. However, little is known about metabolic couplings between these cells. This study designed to investigate molecular plasticity of BG in the rat cerebellum in which PCs were chemically ablated by harmaline treatment. Immunohistochemical examination reveals that harmaline induced PC degeneration causes a marked glial reaction in the cerebellum with activated BG and microglia aligned in parasagittal stripes within the vermis. In these strips, activated BG were associated with upregulation of metallothionein, while GLAST and was down regulated, as compared with nearby intact area where both BG are in contact with PCs. The data from this study demonstrate that BG can change their phenotypic expression when BG loose their contact with PCs. It is conceivable that activated BG may upregulate structural proteins, metallothionein expression to use for their proliferation and hypertrophy; metallothionein expression to cope with oxidative stress induced by PC degeneration and microglial activation. On the contrary, BG may down regulated expression of GLAST because sustained loss of contact with PCs would eliminate the necessity for the cellular machinery involved glutamate metabolism. In conclusion, BG might respond man to death of PCs by undergoing a change in metabolic state. It seems possible that signaling molecules released from PCs regulates the phenotype expression of BG. Also ultrastructures in the organelles of normal PC and BG are distinguished by mitochondrial appearance, and distributed vesicles at the synaptic area in the cytoplasm.

**Key words :** Bergman glia(BG), Harmaline, Immunocytochemistry, Purkinje cell(PC), Ultrastructure

\*Correspondences should be addressed to Chul Jong Yoon, Department of Life Sciences, Catholic University of Korea, 43-1 Yeokgok-Dong, Wonmi-Gu, Bucheon-Si, Gyeonggi-Do, 420-100, Korea. Ph.: (02) 2164-4350, FAX: (02) 2164-4765, E-mail: cj-yoon@hanmail.net

## 서 론

중추신경계는 신경세포와 신경아교세포로 구성되며 뇌의 다양한 기능을 수행하는데 이들의 긴밀한 상호관계가 필수적이다. 그러나 신경세포에 대한 집중적인 연구가 수행된 것에 비하면 신경아교세포는 지금까지 신경세포를 구조적으로 지지해 주는 정도의 지지세포로 알려져 있고 이에 대한 연구도 미진하였다. 그러나 최근 분자생물학의 발전에 따라 아교세포에서 발견되는 다양한 종류의 신경조절 물질들이 밝혀짐에 따라 아교세포의 기능에 대한 관심이 많아지고 있다(Cui et al., 2001). 특히 소뇌의 조롱박신경세포와 이를 둘러싸고 있는 버그만 신경아교세포는 현미경에서 구별이 용이한 구조적 특성 때문에 신경세포-아교세포의 상호관계를 밝히는 연구모형으로 자주 이용되었다. 한편, 소뇌는 양쪽 소뇌반구와 중앙에 소뇌벌레(vermis)로 구성되며 가로로 달리는 소뇌 틈새에 의해 여러 개의엽 혹은 소엽으로 나누어진다. 그리고 단면에서 소뇌겉질은 세층으로 구분되며 가장 속층은 과립층으로 많은 작은 세포 즉, 과립세포들이 있으며 가운데 층은 조롱박신경세포가 일렬로 된 배열층 즉, 조롱박신경세포층이며 가장 바깥층인 분자층은 소수의 신경세포로 구성되어 있다. 소뇌에서는 신경세포와 신경아교세포의 세포체가 서로 연결을 이루고 있는 구조가 있는데 버그만아교세포라는 신경아교세포의 한 종류로 특수하게 변형된 별아교세포로서 분자층 방향으로 세포체를 내고 있으며 이 신경아교세포의 세포체는 조롱박신경세포의 세포체 주위를 둘러싸고 있다. 이것은 일반적으로 방사상으로 뻗어있는 다른 별아교세포의 세포돌기와는 달리 표층 쪽으로만 세포돌기가 뻗어 있으며 기능적으로 글루타메이트 흡수, 인지질 합성, 철이온 항상성 등에 관여하는 것으로 보고 되어 있다(Sotelo et al., 1997). 소뇌의 버그만아교세포는 조롱박신경세포와의 상호작용에 중요한 부위의 신경아교세포이다. 버그만아교세포는 Bergmann (1857)에 의하여 그 존재가 처음 알려진 이후 Golgi (1885), Cajal (1911) 등에 의하여 형태의 전모가 밝혀졌고 조롱박신경세포와의 밀접한 해부학적 연관성도 밝혀지기 시작

하였다(Rakic, 1971; Chan-Palay & Palay, 1972). 그 후 전자현미경과 면역조직화학염색 등의 관찰에 의하여 조롱박신경세포체 하나에 8개 정도의 버그만아교세포가 둘러싸며 각 세포체로부터 가늘고 긴 돌기가 소뇌피질의 분자층 속으로 수직방향으로 뻗어나가고 여기서 나온 2차 가지들이 조롱박신경세포의 수직상 돌기를 둘러싸고 있음이 밝혀졌다(Altmann et al., 1972; Reichenbach et al., 1995). 버그만아교세포의 세포학적 특성은 별아교세포의 세포골격을 구성하는 단백질인 GFAP (glial fibrillary acidic protein)가 들어있어(Ribotta et al., 2004) 별아교세포의 일종으로 생각되었으며(Bignami & Dahl, 1973) 기능적 측면에서도 별아교세포와 많은 공통점이 있음이 밝혀졌다(Cameron & Rakic, 1991). 버그만아교세포에서 합성되는 물질은 신경전달물질인 수송단백질로 GLAST (glutamate aspartate transporter)등이 밝혀져 있다(Chaudhry et al., 1995; Watase et al., 1998). 또한 GLAST는 조롱박신경세포에서 방출되는 글루타민을 흡수하고 저장하며 다시 조롱박신경세포에 공급하는 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. 따라서 버그만아교세포는 조롱박신경세포를 둘러싸는 물리적 지지역할 뿐만 아니라 조롱박신경세포의 생존과 정상적인 기능에 필요한 각종 대사에 관여하는 것으로 보인다. 실제로 버그만아교세포의 발육을 억제하거나 약물에 의하여 버그만아교세포를 파괴하면 조롱박신경세포의 소뇌발달이 지연되고 구조 및 기능적 이상과 함께 운동장애를 일으킨다고 보고 되어 있다(Cui et al., 2001). 이러한 결과는 버그만아교세포와 조롱박신경세포가 서로 긴밀한 연결관계 (metabolic coupling)를 유지하며 물질대사에 긴밀하게 관여함을 의미한다. 본 연구에서는 버그만아교세포와 조롱박신경세포의 상관관계를 증명하기 위한 연구로 정상 실험군의 전자현미경적 미세구조와 신경독성 물질로 알려진 하르말린(Harmaline) 투여로 인한 조롱박신경세포만을 특이적으로 파괴시키는 동물모델(Oheam & Molliver, 1993)을 이용하여 최근 버그만아교세포에서 발견되는 것으로 알려진 3종류의 대사성 단백질들의 동향을 면역화학학적 방법을 통해 관찰하고자 계획하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료 및 처치

실험동물은 체중 250~300 g의 성숙한 수컷 흰쥐 (Sprague-Dawley)를 구입하여 12시간 주기의 인공조명과 먹이 및 물을 자유롭게 공급한 후 본 실험에 사용하였다. 약물의 투여는 O'Hearn과 Molliver (1993) 방법에 따라 하르말린 (Sigma제품) 25 mg/kg을 3일간 매일 같은 시간에 복강 내로 주입하였다. 이때, 약물 투여에 따른 운동성의 변화는 하르말린 주입 후 5분 이내에 몸통, 머리, 팔다리 등에 경련을 일으켰으나 24시간 이후에는 거의 소실되어 동량의 sterile saline을 복강 내로 주입한 대조군과 구분할 수 없었다. 이와 같은 증상은 하르말린 특성의 특징적 증상으로 복강을 통하여 투여된 약물이 신경계에 약효를 미치고 있음을 알 수 있었다. 위와 같이 처리된 동물은 약물투입을 시작한 후 4일, 6일, 8일, 11일, 15일, 31일에 각각 희생시켰다.

### 2 연구 방법

#### 1) 전자현미경적 표본제작

실험동물을 pentobarbital sodium으로 마취한 후 흉벽을 절개하여 심장을 노출 시킨 후 대동맥을 통하여 4% 파라포름알데하이드를 관류법으로 전신을 고정하였다. 고정이 끝난 조직은 신속히 뇌를 적출한 후 동일한 4% 파라포름알데하이드 고정액에 5시간 정도 4°C에서 다시 고정한 다음 0.1 M 인산완충액 (phosphate buffered saline, pH 7.4)으로 3회 씻어내고 2차 고정으로 OsO<sub>4</sub>로 1시간 동안 고정하고 탈수 및 침투과정을 통해 블록을 만든 후 Toluidine blue염색을 통하여 필요한 부위에서 초박절편을 만들었다. 표본은 일반적인 전자염색을 실시한 후 투과전자현미경 (H-600, Hitachi)으로 관찰하였다.

#### 2) 면역조직화학염색

앞서 시행한 동일한 실험방법으로 고정한 후에 동물의 뇌를 신속히 적출하고 같은 4% 파라포름알데하이드 고정액에 5시간 정도 4°C에서 다시 고정한 다음

0.1 M 인산완충액 (phosphate buffered saline, pH 7.4)으로 3회 씻어내고 10, 20, 30% sucrose 용액 (Junsei, Japan)을 차례로 침투시켰다. 또한 뇌 조직을 OCT compound (Miles, USA)에 포매하고 액화질소로 미리 냉각시킨 isopentane (2, 3-methyl butane)에 넣은 후 급속 동결시켰다. 이후 동결박절기 (Reichert Cryocut model 2000, Austria)로 40 μm 두께의 연속절편을 제작하여 조직저장액 (storing solution)이 들어있는 24-well plate에 넣어 면역조직화학염색을 시행하기 전까지 4°C에서 보관하였다. 일차항체를 사용하여 다음과 같은 방법으로 면역조직화학염색을 시행하였다. 면역조직화학염색은 free-floating 방법으로 시행하였고 각 단계는 다음과 같이 진행하였다. 자른 조직을 순서대로 한장씩 취하여 0.05 M 인산완충액 (phosphate buffered saline, PBS)으로 10분간 3회 세척한 후 비특이적인 반응을 제거하기 위해 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (in PBS) 용액으로 15분간 처리하였다. 다시 동일한 완충액으로 10분간 3회 세척하였다. 일차항체는 rabbit anti-GLAST (Chemicon)를 1 : 1000, rabbit anti-calbindin D-28K (Sigma)를 1 : 2000, mouse anti-metallothionein을 1 : 200 (Zimed)으로 각각 희석하여 4°C에서 48시간 진탕시키며 반응시켰다. 인산완충액으로 10분간 3회 세척한 후 이차항체를 실온에서 1시간 반응시켰다. 다시 같은 인산완충액으로 10분간 3회 세척 후 ABC (avidin-biotin-peroxidase complex)용액과 1시간을 반응시켰다. 동일한 인산완충액으로 10분씩 3회 세척 후 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, 20 mg/40 mL PBS)를 기질로 하여 발색시키고 조직은 인산완충액에 세척한 후 젤라틴 슬라이드에 올려 2시간 동안 실온에서 건조시켰다. 이 후 통상적인 방법으로 알콜 탈수 및 크실렌으로 투명화 후 봉입제로 봉입한 뒤 현미경으로 관찰하였다.

#### 3) 이중형광염색

조롱박신경세포와 버그만아교세포를 보다 명확히 동정하기 위하여 면역조직화학염색 결과를 기초로 하여 각각의 일차항체를 이용한 이중형광염색을 시행하였다. 이 때 사용된 조직은 각각 신경아교세포의 표현형을 가장 잘 관찰 할 수 있는 시기의 실험군으로 소뇌의 소뇌벌레 부위를 중심으로 관찰하였다. 각 조직

은 면역조직화학염색과 동일한 방법으로 처리한 후 Guinea pig anti-GLAST/rabbit anti-calbindin D-28K, mouse anti-metallothionein/rabbit anti-calbindin D-28K를 동량 혼합한 혼합항체를 4°C에서 48시간 반응시킨 후 동량 희석한 Cyst3 labelled streptavidin (1 : 800, Amersham)/Cy<sup>TM</sup>2 labelled goat anti-rabbit IgG (1 : 100, Amersham), Cy<sup>TM</sup>3 labelled goat anti-mouse IgG (1 : 500)/Cy<sup>TM</sup>2 labelled goat anti-rabbit IgG (1 : 100), Cy<sup>TM</sup>3 labelled goat anti-mouse IgG (1 : 500)/Cy<sup>TM</sup>2 labelled goat anti-rabbit IgG (1 : 100)에서 각각 1시간 반응시켰다. 이상 각 단계의 반응 후에는 인산완충액 (pH 7.4)으로 10분간 3차례 세척하였다. 항원항체반응이 끝난 조직은 통상의 과정을 거쳐 탈수, 투명한 후 겔 봉입제 (GEL mount, Biomed)로 봉입하였다.

#### 4) 현미경관찰 및 촬영

면역조직화학염색이 끝난 조직은 현미경에 연결된 디지털 카메라 (ProgRes C14, Olympus)를 이용하여 200배율로 사진 촬영하였다. 이중면역형광염색이 끝난 조직은 공초점현미경 (ConfoCor2, Carl Zeiss)을 이용하여 400배율에서 이중이미지 (dual image)로 관찰하였다.

#### 5) 면역조직화학염색의 관독법

면역조직화학염색 관독은 조롱박신경세포의 소실이 가장 잘 관찰되는 소뇌벌레 부위를 기준으로 음성반응 (-), 경미한 염색성을 보인 경우 미약한 양성반응 (±), 약한 염색성을 보인 경우 정도의 양성반응 (+),

중등도의 염색성을 보인 경우 중등도의 양성반응 (++) , 강한 염색성을 보인 경우 강한 양성반응 (+++)으로 등급을 정하여 서로 비교하며 Table I과 Table II에 정리하였다. 이러한 면역염색성의 관독에는 각 시기별로 3마리씩의 흰쥐에서 얻은 조직표본 3장씩을 서로 비교하였다.

## 결 과

### 1. 전자현미경적 미세구조

분자층 반대편의 조롱박신경세포에는 과립세포 (granule cells)가 관찰되는데 (Fig. 1a) 이는 작은 세포들로 핵의 염색질은 전자밀도가 높은 것으로 관찰되었으며 미토콘드리아는 치밀한 크리스테 (cristae)가 있는데 이는 버그만야교세포의 미토콘드리아와 같은 양상을 보였다. 그러나 조롱박신경세포의 미토콘드리아는 대부분 크기는 주위 세포들과 비교 할 때 작거나 크리스테의 수가 적고 전자밀도가 낮은 것으로 관찰되었다 (Fig. 1b). 또한 큰 세포체와 전자밀도가 낮은 큰 핵을 갖고 있는 것으로 염색질이 잘 발달되지 않았으며 선명한 2중막구조의 핵막이 보이고 활성화된 핵인이 관찰되었다 (Fig. 1c). 또한 조롱박신경세포와 버그만야교세포사이의 연결에는 수 많은 신경전달물질로 생각되는 분비성 과립이 관찰되었다 (Fig. 4d).

### 2. 면역염색반응

#### 1) GLAST

정상 대조군의 소뇌 분자층에서 GLAST의 면역 염색성을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 2a). 하르말린 투여 후 5일이 경과한 소뇌 분자층에서도 정상과 유사한 면역 반응을 보였으나 (Fig. 2b), 시간이 경과함에 따라 GLAST가 염색되지 않아 띠 모양의 빈 공간이 점차 뚜렷해지는 양상이 관찰되었다. 이와 같은 현상을 7일 경과군에서부터 (Fig. 2c) 10일군과 14일군에서 뚜렷하게 관찰되었고 (Fig. 2d, 2e), 31일이 지난 후에는 관찰되지 않았다 (Fig. 2f).

#### 2) Calbindin D-28K

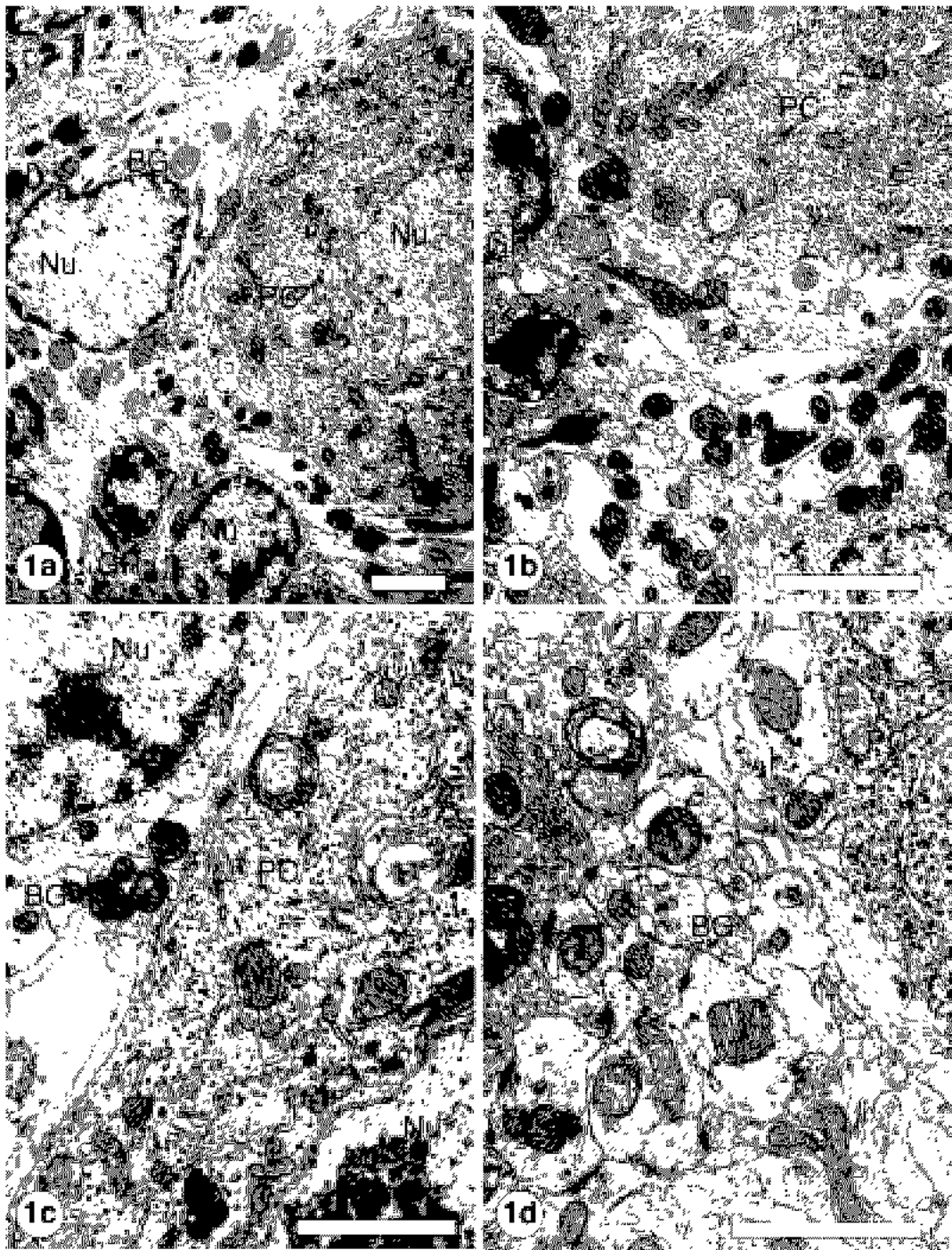
소뇌 조롱박신경세포의 표지물인 calbindin D-28K

**Table I.** Immunoreactivities of calbindin D-28K during Purkinje cell degeneration induced by harmaline treatment.

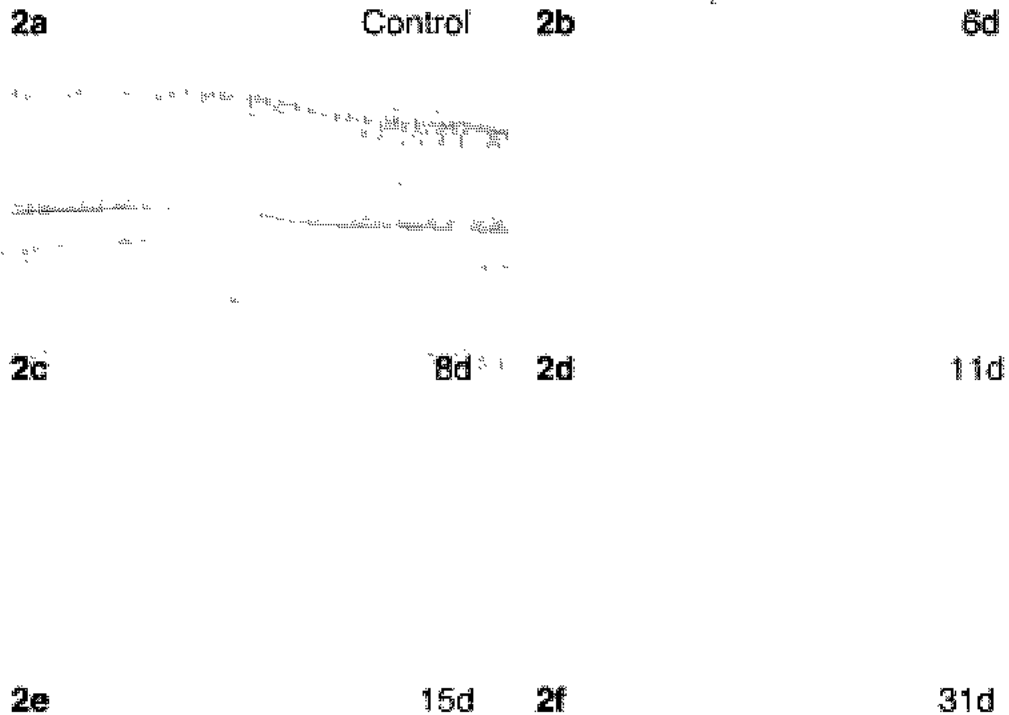
Marker	Days after harmaline treatment					
	Control	4D	6D	8D	11D	15D 31D
Calbindin D-28K	+++	-	-	-	-	-

**Table II.** Phenotypes of Bergmann glia during Purkinje cell degeneration induced by harmaline treatment.

Bergman cell marker	Days after harmaline treatment						
	Control	3D	5D	7D	10D	14D	31D
GLAST	+++	++	++	++	+	+	+
Metallothionein	+	+++	+++	+	+/-	-	-



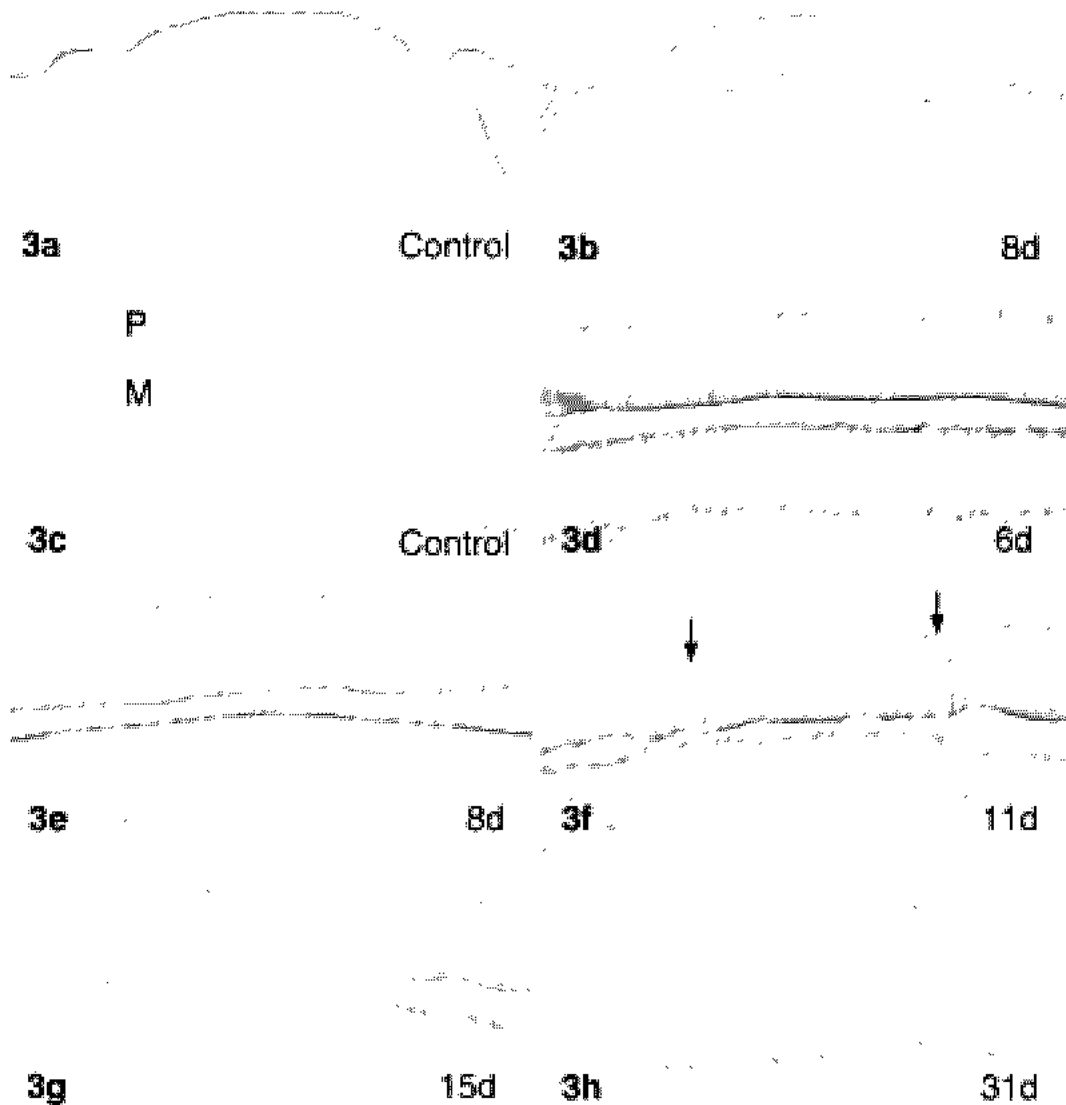
**Fig. 1.** Electron micrographs of a Purkinje cell (PC) surrounding granule cells (Fig. 1a) and Bergmann cell (BG) (Fig. 1b). Mitochondria in BG and granule cell are the higher electron density and cristae than them of PC (Fig. 1a-d). Also many synaptic vesicles (asterisk) are shown at inside area of BG between junctions of BG and PC (Fig. 1d). Scale bars are 3  $\mu$ m.



**Fig. 2.** GLAST immunoreactivity in the cerebellum of control (Fig. 2a) and harmaline treated rats (Fig. 2b: 5 days, Fig. 2c: 7 days, Fig. 2d: 10 days, Fig. 2e: 14 days, and Fig. 2f: 31 days).

에 대한 면역염색 결과 세포체와 가지돌기들을 관찰할 수 있었다. 정상 대조군의 소뇌에서는 분자층과 과립세포층의 경계에서 조롱박신경세포들이 한 층을 이루고 있었으며 수 많은 가지돌기들은 분자층으로 뻗어 나가는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3a, 3c). 반면 하르탈린을 투여한 실험 군에서는 소뇌벌레에서 일부의 조롱박신경세포가 소실됨을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3b). 이와 같은 현상은 하르탈린 투여 4일부터 나타났으며 6일 후에는 더욱 뚜렷하였다. 세포가 사멸

된 부위는 calbindin D-28K에 염색된 조롱박신경세포들 사이에서 빈 공간으로 나타나 분자층과 조롱박신경세포층 사이에 긴 세로 띠 (bands)를 관찰할 수 있었다 (Fig. 3d). 조롱박신경세포들이 소실로 calbindin D-28K에 염색이 되지 않아 띠 모양의 빈 공간은 하르탈린 투여 후 15일 경과 군까지 유사한 양상을 보였고 (Fig. 3e, 3g) 이후 31일 경과 군에서는 이와 같은 양상이 다소 감소 되었다 (Fig. 3h).

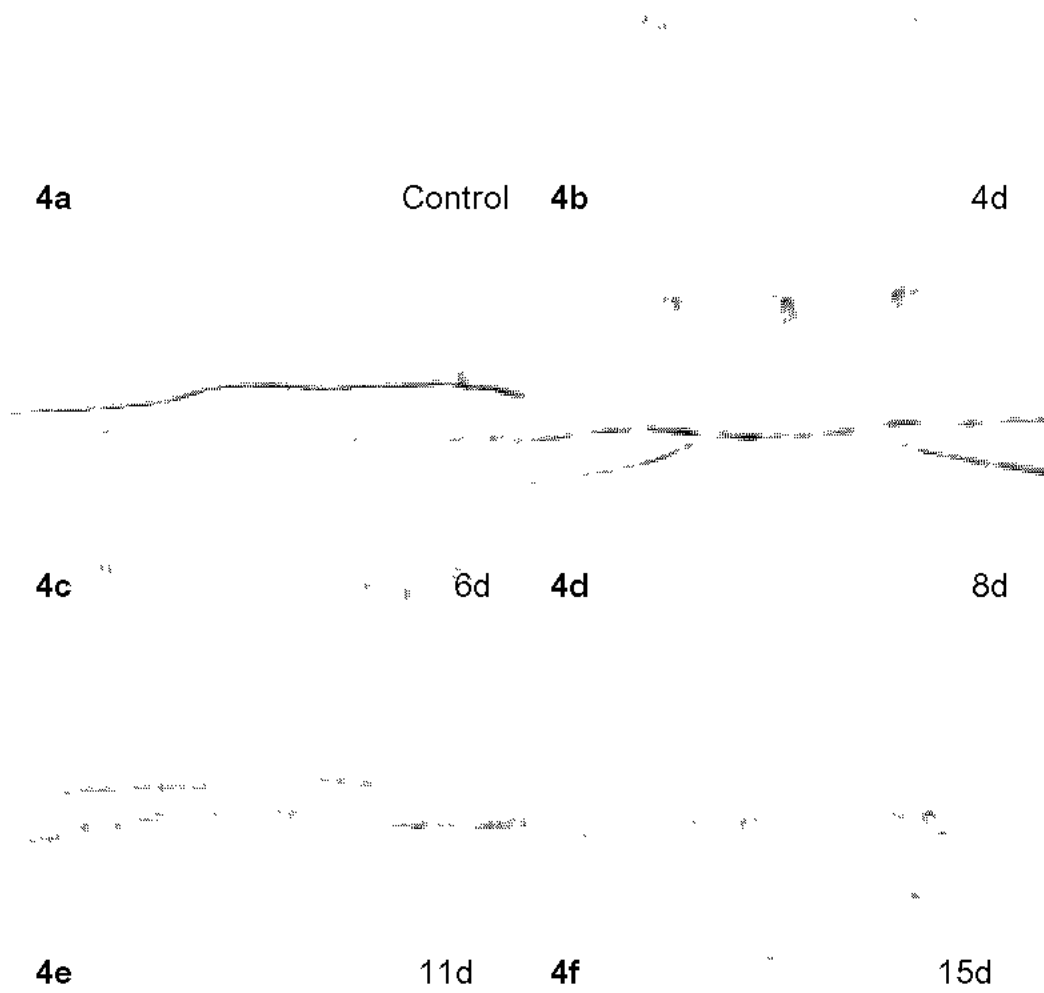


**Fig. 3.** Calbindin D-28K immunoreactivity in the cerebellum of control (Fig. 3a and Fig. 3c) and harmaline-treated rats survived for 6 days (Fig. 3d), 8 days (Fig. 3b, Fig. 3e): 10 days (Fig. 3f), 15 days (Fig. 3g) and 31 days (Fig. 3h) after treatment. Neuronal cell bodies and dendrites are uniformly stained in control (Fig. 3a, Fig. 3c). After harmaline treatment, several thin unstained radial bands (arrows) can be seen in the molecular layer (M) and Purkinje cell (P) layer (Fig. 3b). As shown at higher magnification (Fig. 3d-g), the pale bands result from loss of calbindin D-28K in small clusters of Purkinje cell bodies and their ascending dendrites. These bands appeared to be infrequent by one month after treatment (Fig. 3h).

**3) Metallothionein**

정상 대조군에서는 MT의 면역염색성을 관찰 할 수 없었다 (Fig. 4a). 반면 하르말린 투여군에서는 현저한

MT 면역염색성이 관찰되었다. MT염색 반응의 특징은 하르말린 투여 후 4일군에서 주로 조롱박신경세포층에 위치한 버그만신경세포에서 염색반응이 일어났



**Fig. 4.** Metallothionein immunoreactivity in the cerebellum of control (Fig. 4a) and harmaline treated rats (Fig. 4b: 3 days, Fig. 4c: 5 days, Fig. 4d: 7 days, Fig. 4e: 10 days, Fig. 4f: 14 days).

고 (Fig. 4b), 5일군에서는 점차 세포돌기로 퍼져나갔으며 (Fig. 4c) 8일군에서는 세포체와 돌기를 포함한 세포 전체에서 강한 염색반응이 관찰되었다 (Fig. 4d). 10일군에서는 다시 MT 면역염색성이 감소하여 세포돌기에서 매우 약하게 관찰되었으며 이후에는 면역 염색

성이 관찰되지 않았다 (Fig. 4e, 4f).

**2. 이중면역형광염색**

하르말린 투여 10일 경과군에서 GLAST와 calbindin D-28K의 이중면역반응 시행한 결과 GLAST



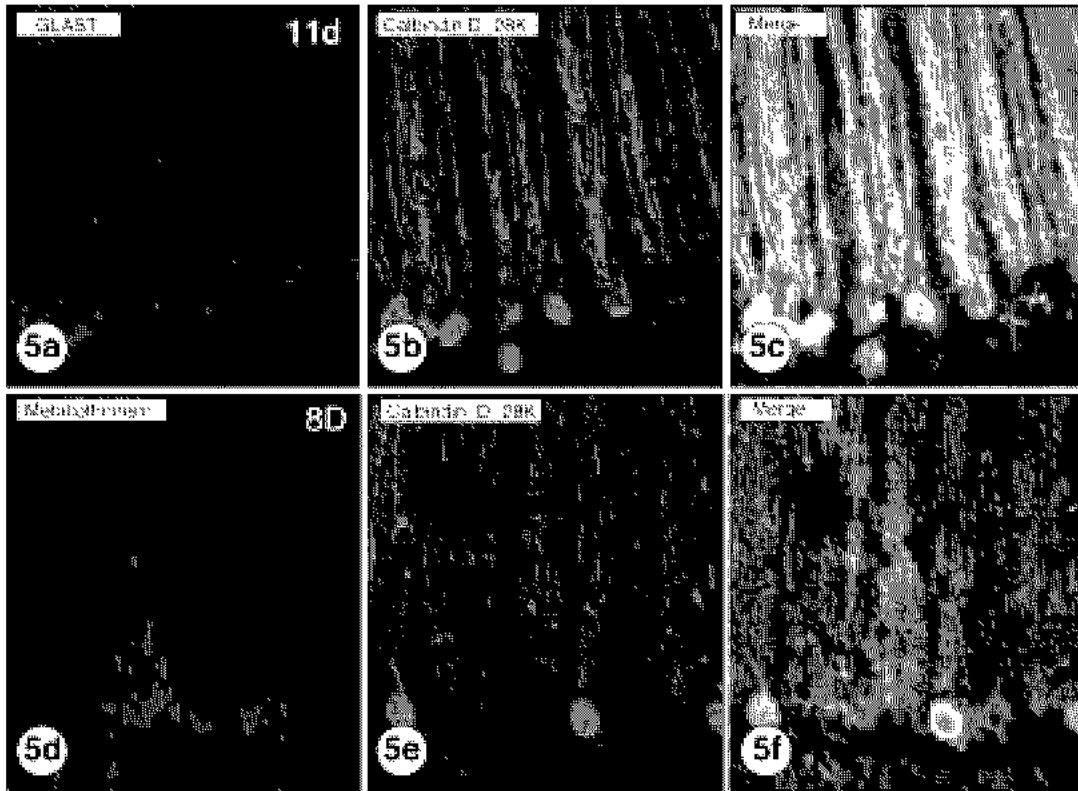


Fig. 5. Double immunofluorescence staining with GLAST/calbindin D-28K (Fig. 5a-c) and metallothionein/calbindin D-28K (Fig. 5d-f) harmaline-treated.

염색 부위와 calbindin D-28K 염색부위는 서로 일치하지 않았을 뿐만 아니라 염색된 세포의 모양으로 보아 GLAST 염색은 버그만아교세포에 그리고 calbindin D-28K 염색은 조롱박신경세포에서 각각 일어남을 확인할 수 있었다(Fig. 5a-c). 뿐만 아니라 조롱박신경세포층 중에서 calbindin D-28K 염색이 일어나지 않은 부위는 하르말린 투여에 의하여 조롱박신경세포가 소실된 부위임을 확실히 알 수 있었다. 또한 하르말린 투여 후 7일 경과군에서는 MT와 calbindin D-28K의 이중염색을 통하여 조롱박신경세포의 소실과 버그만아교세포에서 발현되는 산화성 반응물질과의 관계를 관찰하였다. MT의 발현은 조롱박신경세포가 소실된 부위의 버그만아교세포의 세포체에 염색이 되었으며 calbindin D-28K 염색은 인접부위의 조롱박신경세포에서 관찰 할 수 있었다(Fig. 5d-f).

### 고 찰

전자현미경적 미세구조에서는 조롱박신경세포와 버그만아교세포의 연관관계는 연결을 통하여 교류를 하며 많은 신경전달물질이 버그만아교세포의 연결쪽에서 많이 발견되는 것은 아마도 조롱박신경세포에게 많은 정보를 전달하는 물질을 보내는 것으로 생각되며 각각의 세포내의 미세구조물을 이루는 종류도 다르고 같은 미세구조물이라도 모양과 전자밀도의 차이를 보이는 것은 이들의 기능적 차이와 형태학적 차이가 있음을 짐작 할 수 있었다(Rakic, 1971; Peters et al., 1991). 특히 미토콘드리아는 전자밀도가 높고 크리스테가 많은 것을 보아 이들의 기능이 좀더 활성화되어 있음을 추측하게 한다. 한편 조롱박신경세포를 손

상시키는 실험법으로 버그만아교세포의 변화를 보기 위한 하르말린은 5개의 고리로 구성된 인돌 알칼로이드로서 생체에 투여하면 펄립과 운동조화불능 등을 포함한 운동장애를 초래하는 것으로 알려져 있다 (Llinas & Volkind, 1973). 이러한 현상은 하르말린이 소뇌의 아래 올리브핵의 신경세포들을 흥분성을 증가 시키는데 이 흥분성이 올리브-소뇌로(olivo-cerebellar tract)로 전달되는 과정에서 특히 오름섬유종말이 조롱박신경세포와 이루는 연결에서 글루타메이트의 과도한 분비를 유도한다. 하나의 오름섬유는 하나의 조롱박신경세포와 수백개의 연결을 이룬다. Llinas et al. (1973)는 이온 신경세포들의 흥분성이 조롱박신경세포에 전달되는 과정에서 얼마나 크게 증폭되는지를 암시해 주는데 이러한 증폭으로 과도한 글루타민의 분비가 반복되어 조롱박신경세포에 비가역적인 흥분성 손상을 입게 되어 세포사를 초래하는 것으로 알려져 있다 (de Montigny & Lamarre, 1973; Choi, 1988; Barbour et al., 1994). 또한 이 동물모델에서 소뇌의 다른 부위보다 벌레 부위에서 세포사멸이 더 많이 일어난 것은 이온 중에서 하르말린에 더 민감한 흥분성을 보이는 안쪽 및 등쪽 덩굴리브 신경핵들이 소뇌 벌레와 집중적으로 연결되기 때문이라고 한다 (Llinas & Volkind, 1973). 조롱박신경세포의 사멸이 소뇌벌레 부위에서도 간헐적으로 일어난 것도 올리브핵의 신경세포와의 연결 빈도에 의한 결과로 생각된다. 글루타메이트가 과분비되면 조롱박 신경원의 AMPA 수용체를 활성화시켜 이를 통하여 먼저  $\text{Na}^+$  이 세포내로 유입되어 세포막의 탈분극을 초래하고 이것이 전압 의존성 칼슘 채널을 통하여  $\text{Ca}^{++}$  을 세포내로 유입시킨다. 이때 세포내의 내형질세망 (ER)에 저장되었던  $\text{Ca}^{++}$  도 동시에 방출되어 세포내  $\text{Ca}^{++}$  농도의 증가에 가세한다. 이처럼 조롱박신경세포내  $\text{Ca}^{++}$  급격히 높아지면 리파제와 프로테아제 등과 같은 단백분해효소들이 활성화되어 결국 이 세포들의 퇴행을 일으키는 것으로 알려져 있다. 본 연구 결과 조롱박신경세포가 사멸된 부위에서 일어나는 아교세포증은 선행 연구 (O'Hearn & Moliver, 1997)에서 이미 보고된 것으로 신경조직손상에서 일어나는 일반적인 반응이다. GLAST는 글루타메이트 수송체로서 버그만아교세포의 세포막에 풍부하게 발현되며 (Chaudry et al., 1995;

Watase et al., 1998) 특히 GLAST의 경우 태생기 동안에는 별아교세포와 버그만아교세포에서 모두 발현되거나 세포가 성숙됨에 따라 별아교세포에서는 발현이 감소되는 반면 버그만아교세포에서는 더욱 증가되며 이와 같은 현상은 조롱박신경세포의 성숙에 따라 일어나는 것으로 알려져 있다. 버그만아교세포의 세포막에 존재하는 GLAST는 조롱박신경세포에서 분비되는 글루타메이트를 버그만아교세포내로 흡수하여 저장하므로 신경연접에서의 글루타민과 분비에 의한 신경독성을 방지하는 한편 글루타메이트로부터 글루타민으로 전환시켜 다시 조롱박신경세포에서 공급하는 중요한 역할을 한다 (Reichenbach et al., 1995; Chaudry et al., 1995). 본 연구 결과 GLAST가 하르말린 투여 후 감소된 소견을 보였는데 이는 조롱박신경세포의 소멸로 인하여 유리글루타메이트의 양이 감소한데서 오는 결과로 생각된다. 조롱박신경세포의 정상 발육이 일어나지 않아 소뇌 장애를 갖게 되는 동물의 경우 소뇌의 GLAST 발현이 정상동물보다 현저히 감소된다는 연구보고는 본 연구결과와 일치하는 소견으로 위와 같은 가설의 가능성을 높여준다. 본 연구 결과 미세아교세포의 출현이 소뇌의 분자층과 조롱박신경세포층 사이에서 좁은 띠 모양으로 나타난 것은 calbindin-28k 면역염색성을 잃은 부위와 일치하므로 조롱박신경세포가 손상된 사실과 그 자리에 미세아교세포의 활성이 일어났음을 동시에 입증하는 것으로 생각된다. 한편 MT는 cysteine을 많이 포함한 단백질로 아연, 구리 등과 높은 결합력과 항산화 기능이 있는 것으로 알려져 있다 (Hussain et al., 1996; Penkowa et al., 2000, 2001). MT는 4종류 (MT1~MT4)의 아종 (subfamily)이 있으며 이중 MT1~MT3만이 뇌에 존재하는데 MT1~MT2는 주로 별아교세포 및 활성화된 미세아교세포에서 그리고 MT3는 신경세포에서 발현된다 (Giral et al., 2001; West et al., 2004). MT의 발현은 중금속 및 호르몬 (glucocorticoids) 등에 의하여 증가되면 신경세포 손상시에 미세아교세포에서 분비되는 인터루킨, 인터페론 등과 같은 염증인자들의 자극에 의하여 발현된다 (Nakajima & Suzuki 1995; Beltramini et al., 2004). 본 연구 결과에서 버그만아교세포의 MT발현이 증가한 원인은 확실하지 않으나 위와 같은 MT에 대한 특성으로 보아 조롱박신경세포의

손상으로 버그만아교세포가 활성화되면서 MT의 발현이 증가된 것으로 보인다. 버그만아교세포에서 발현된 MT는 조롱박신경세포에 가해지는 산화성 손상을 방지하고 이 세포가 사멸되면서 방출되는 중금속의 처리와 버그만아교세포 자신의 생존에도 관여할 것으로 생각된다. 따라서 버그만아교세포에서 MT의 발현은 조롱박신경세포와의 접촉이 단절되어 나타나는 현상보다는 조롱박신경세포의 손상과정이 원인일 가능성이 더 높다. GLAST은 조롱박신경세포의 신경연접으로 유리된 신경전달물질 글루타메이트를 흡수, 제거하여 글루타메이트의 흥분성 세포독성으로부터 조롱박신경세포를 보호하는 기능이 알려져 있다. 이와 같은 사실을 감안해 볼 때 본 연구에서 이들 발현의 감소는 조롱박신경세포 파괴로 글루타메이트의 유리가 가속되었거나 없어졌기 때문에 이를 흡수하고 재처리를 담당하는 GLAST의 발현이 감소된 것으로 생각된다. 손상된 부위의 버그만아교세포에서는 MT 등의 발현을 관찰한 결과 정상부위의 버그만아교세포에서보다 현저히 증가된 반면 GLAST 등은 현저히 감소되었다. 이는 스트레스 단백질인 MT는 조롱박신경세포의 손상에 따른 단순한 버그만아교세포종의 일관일 가능성이 높다. 따라서 본 연구는 버그만아교세포와 조롱박신경세포사이에 상호 긴밀한 의존적 관계를 정상 신경세포의 전자현미경적 미세구조와 면역화학적 연구 결과를 제시하였으며 신경세포-아교세포 상호관계를 증명하기 위한 연구에 기초가 될 것이며 앞으로 면역 전자현미경적 연구를 동시에 시행한다면 더욱 좋은 연구가 될 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Altman J: Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. II. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer. *J Comp Neurol* 145 : 399-463, 1972.
- Barbour B, Keller BU, Llano I, Marty A: Prolonged presence of glutamate during excitatory synaptic transmission to cerebellar purkinje cells. *Neuron* 12 : 1331-1343, 1994.
- Beltramini M, Zambenedetti P, Wittkowski W, Zatta P: Effects of steroid hormones on the Zn, Cu and MTI/II levels in the mouse brain. *Brain Res* 1013 : 134-141, 2004.
- Bergmann C: Notiz über einige Strukturverhältnisse des Cerebellum und Rückenmarks. *Z Rationelle Med* 8 : 360-363, 1857.
- Bignami A, Dahl D: Differentiation of astrocytes in the cerebellar cortex and the pyramidal tracts of the newborn rat. An immunofluorescent study with antibodies to a protein specific to astrocytes. *Brain Res* 49 : 393-402, 1973.
- Cameron RS, Rakic P: Glia cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis. *Glia* 4 : 124-137, 1991.
- Chan Palay V, Palay SL: (1972) High voltage electron microscopy of rapid Golgi preparations. Neurons and their processes in the cerebellar cortex of monkey and rat. *Zeitschrift für Anat Entwicklungsgesch.* 137 : 125-153, 1972.
- Chaudhry FA, Lehre KP, van Lookeren Campagne M, Ottersen OP, Danbolt NC, Storm Mathisen J: Glutamate transporters in glial plasma membranes: Highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron* 15 : 711-720, 1995.
- Cui W, Allen ND, Skynner M, Gusterson B, Clark AJ: Inducible ablation of astrocytes shows that these cells are required for neuronal survival in the adult brain. *Glia*. 34 : 272-282, 2001.
- Giral M, Carrasco J, Penkowa M, Morcillo MA, Santamaria J, Campbell IL, Hidalgo J: Astrocyte targeted expression of interleukin 3 and interferon  $\alpha$  causes specific changes in metallothionein expression in the brain. *Exp. Neurol* 168 : 334-346, 2001.
- Hussain SW, Slikker Jr, Ali SF: Role of metallothionein and other antioxidants in scavenging superoxide radicals and their possible role in neuroprotection. *Neurochem Int* 29 : 145-152, 1996.
- Llinas R, Volkind RA: The olivo-cerebellar system: Functional properties as revealed by harmaline induced tremor. *Exp Brain Res* 18 : 69-87, 1973.
- Nakajima K, Suzuki K: Immunochemical detection of metallothionein in brain. *Neurochem Int* 27 : 73-87, 1995.
- O'Hearn E, Molliver ME: Degeneration of Purkinje cells in parasagittal zones of the cerebella vermis after treatment with ibogaine or harmaline. *Neuroscience* 55 : 303-310, 1993.
- O'Hearn E, Molliver ME: The olivocerebellar projection mediates ibogaine induced degeneration of Purkinje cells: A model of indirect, trans-synaptic excitotoxicity. *J Neurosci* 22 : 8828-8841, 1997.

- Penkowa M, Quintana A, Carrasco J, Giralt M, Molinero A, Hidalgo J: Metallothionein prevents neurodegeneration and central nervous system cell death after treatment with gliotoxin 6 aminonicotinamide. *J Neurosci Res* 77 : 35-53, 2004.
- Peters A, Palay SL, Webster HD: The fine structure of the nervous system. Oxford University Press, Auckland, pp. 273-294, 1991.
- Rakic P: Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electron microscopic study in *Macacus rhesus*. *J Comp Neurol* 141 : 293-312, 1971.
- Reichenbach A, Siegel A, Rickmann M, Wolff Jr, Noone D, Robinson SR: Distribution of Bergman cell somata and processes: implications for function. *J Hirnforsch* 36 : 509-517, 1995.
- Sotelo C, Alvarado Mallart RM, Frain M, Vernet M: Molecular plasticity of adult Bergmann fibers is associated with radial migration of grafted Purkinje cells. *J Neurosci* 14 : 124-133, 1997.
- West AK, Chuah MI, Vickers JC, Chung RS: Protective role of metallothioneins in the injured mammalian brain. *Rev Neurosci* 15 : 157-166, 2004.

#### <국문초록>

소뇌의 버그만아교세포는 인접한 조롱박신경세포를 돌

러싸는 특이한 해부학적 분포를 하고 있어 종래로부터 조롱박신경세포에 대한 물리적 지지 역할과 함께 이 신경세포의 생존과 기능에 필요한 대사물질을 공급해 주는 것으로 추정되어 왔으나 이에 대한 구체적인 연구는 많지 않다. 본 연구에서는 버그만아교세포와 조롱박신경세포의 상관관계를 증명하기 위한 연구로 전자현미경적 정상적인 미세구조와 신경독물인 하르탈린을 흰쥐에 투여하여 조롱박신경세포만을 특이적으로 파괴시킨 소뇌조직을 대상으로 최근 버그만아교세포에서 발견되는 것으로 알려진 수종의 대사성 단백질의 동향을 면역조직화학방법으로 관찰하여 GLAST의 면역염색성은 정상부위보다 신경세포 손상부위의 버그만아교세포에서 현저히 감소되었다. 하르탈린 투여군의 흰쥐에서 조롱박신경세포의 사멸은 소뇌벌레에서 집중적으로 일어났으며 사멸된 부위는 calbindin D 28K에 염색된 정상 조롱박신경세포들 사이에서 산발적으로 끼어 있는 빈 공간으로 나타났는데 빈공간은 분자층과 조롱박신경세포층이 서로로 달리는 좁고 긴 띠(bands) 모양의 특이한 양상을 보였다. MT 면역염색성은 신경세포 손상부위의 버그만아교세포에서 현저히 증가하였다. 이상의 관찰 결과로 볼 때 조롱박신경세포의 손상에 의하여 버그만아교세포는 강한 아교세포반응을 보이며 MT의 발현을 통하여 인접 신경세포 손상과 미세아교세포 활성화에 의하여 유발된 산화성 스트레스를 보호하고 생존한다. 그러나 GLAST의 발현의 감소는 조롱박신경세포의 사멸로 인하여 이들 세포들로부터 유리되어 나오는 글루타메이트의 감소 또는 중단되므로 버그만아교세포에서 이들 글루타메이트 수송체 역할이 감소되었음을 반영하는 것으로 사료된다.