

Semliki Forest Virus 감염은 뉴우런의 탈수초를 유발한다

김현주¹ · 사영희¹ · 홍성갑^{2*}

Infection of Semliki Forest Virus Induces Demyelination of Neuron

Hyun Joo Kim¹ · Young-Hee Sa¹ · Seong-Karp Hong^{2*}

¹Department of Anesthesiology and Pain Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, South Korea.

²Division of Bio and Health Sciences, Mokwon University, Daejeon, South Korea.

요 약

척수신경절의 신경 세포와 슈반세포의 공동 배양으로 수초화 형성 세포 집단이 제조되었다. 슈반세포와 뉴런 세포가 쥐의 배아의 척수신경절로부터 각각 *in vitro*에서 분리되었다. 배양된 슈반세포와 뉴런 세포는 동일한 평판접시에서 공동배양 되었다. 본 실험과정은 다음과 같은 4 단계로 구성되어 있다: 첫 번째 단계는 배아의 척수 신경절 세포의 현탁 과정, 두 번째 단계는 anti mitotic cocktail의 추가 과정, 세 번째 단계는 척수신경절 세포의 정제 과정, 및 네 번째 단계는 척추 신경절 세포에 슈반 세포의 추가 과정이다. 이들 세포들은 때 수초화가 진행되었다. 이렇게 수초화된 공동 배양은 Semliki forest virus에 의해 감염되었고 그 때 탈수초화 과정을 유발시켰다. 우리는 수초화된 뉴런에 존재하는 peripheral myelin protein 22의 항체를 이용하여 수초화 과정과 탈수초화 과정을 확인하였다.

ABSTRACT

We constructed a population of myelinated cells with co-culture of neuronal cells and Schwann cells from DRG. Schwann cells and neuronal cells were isolated from dorsal root ganglion (DRG) in embryos of rat *in vitro* respectively. The cultured Schwann cells and cultured neuronal cells, respectively were co-cultured in a same plate. This procedure contains following four steps: first step of suspension of the embryonic dorsal root ganglion cells, second step of addition of anti-mitotic cocktail, third step of purification of dorsal root cells, and fourth step of addition of Schwann cells to dorsal root ganglion cells. These cells were performed accomplishment of myelination. This myelinated co-culture system was infected by Semliki forest virus and then induced demyelination processing in this myelinated co-culture. We identified myelination and demyelination processing using antibody of peripheral myelin protein 22 (PMP 22) meaning presence of myelinated neuron.

키워드 : 말초수초단백질22, 수초, 셈리키 포레스트 바이러스, 탈수초

Key word : demyelination, myelination, peripheral myelin protein 22, Semliki forest virus

Received 28 May 2017, Revised 29 May 2017, Accepted 03 June 2017

* Corresponding Author Seong-Karp Hong (E-mail : karp@mokwon.ac.kr, Tel:+82-2-2228-2729)

Division of Bio and Health Sciences, Mokwon University, Daejeon, South Korea.

Open Access <https://doi.org/10.6109/jkiice.2017.21.6.1212>

print ISSN: 2234-4772 online ISSN: 2288-4165

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
Copyright © The Korea Institute of Information and Communication Engineering.

I. 서 론

바이러스 감염과 관련이 없는 인간과 동물의 탈수초성 질병의 예가 있으며, 예를 들어 부신 각화증 또는 비타민 결핍 또는 독소와 관련된 탈수 소화증이 있다. 그러나, 인간과 동물에서 알려진 병인의 자연 발생 중추 신경계 (CNS) 탈수 초성 질병은 바이러스 성 기원이다. 인간 탈수 초성 질병 중에서 가장 두드러진 것은 다발성 경화증 (다발성 경화증)이다. 이것은 선진국의 어른들의 가장 흔한 신경 질환이다. 그러나 병의 원인은 밝혀져야 한다. 일부 탈수 초성 질병의 경우 바이러스가 분명히 병인이며 중추 신경계에 감염되며 JC papovavirus (JCV)가 진행성 다병성 백질 뇌병증 (PML)을 일으키는 사례가 있다. 다른 탈수 초성 질병, 예를 들어 체세포 성 뇌척수포염 (postvaccinal or perivenous encephalomyelitis)으로 알려진 감염 후 뇌척수염 (postinfectious encephalomyelitis)에서 탈수초는 전신성 바이러스 감염에 선행하지만 CNS의 직접적인 바이러스 감염의 증거는 거의 없거나 조금 있는 정도이다. 이것은 광견병, 홍역, 유행성 이하선염, 풍진, 인플루엔자, 우두 니아 및 천연두 바이러스 감염 및 예방 접종 (Johnson, 1998)에서 관찰되었다. 이 탈수 초성은 일반적으로 자가 면역으로 간주된다.

CNS는 인간의 질병 발병 기전에 대한 연구를 배제하고 이 시스템에서의 감염 및 면역 반응에 대한 많은 지식이 실험 동물 모델로부터 유도되었다. 바이러스 성 탈수 초의 기전에 대한 연구를 위해 탁월한 실험 시스템에는 테일러 바이러스, 마우스 간염 바이러스 및 실험실 설치류의 semliki forest virus 감염이 포함된다. 또한 탈수초를 유발하는 동물의 자연 감염에 대한 실험적 연구가 있었으며, 양에서 maedivisna 바이러스, 개에서 개 디스토펜 바이러스를 포함한다. JCV, 홍역 바이러스 및 HTLV-I에 의해 유발된 PML, 아 급성 경화성 뇌막염 (SSPE) 및 인간 T 세포 림프 성 바이러스 유형 I (HTLV-I) - 관련성 골수 병증 (HAM) CNS 탈수 초의 사건과 기전을 이해하는 데 큰 가치가 있음을 입증했지만, 신경 병리학의 그림은 말기 병의 경우가 가장 빈번하다.

인간과 동물 모두에서 바이러스 감염과 관련된 가장 자연적으로 발생한 탈수 초성 질환은 감염의 정도와 관련하여 드물게 발생하는 합병증이다. JC 바이러스는 대

부분의 성인에게 감염되고 지속되지만 PML은 드문 질환이다. 홍역 바이러스 감염은 일반적으로 피부 발진이 특징적인 전신 감염을 일으키지 만, 늙은이의 경우 신경 질환, 홍역 봉입체 뇌염 (MIBE), 소아의 SSPE를 유발한다. 양의 탈수 초성 병인 Visna는 동일한 바이러스 maedi-visna virus에 의해 야기 된 폐 질환 maedi보다 훨씬 덜 일반적이다. 송곳니 디스토펜은 개 개체의 감염 정도에 비해 드문 경우이다. 감염 후 뇌척수염은 감염 및 예방 접종 범위의 범위와 관련하여 드문 질환이다. 바이러스 감염에 따른 탈수 초성 질환의 빈도가 낮은 것에 대한 한 가지 설명은 신경 침습의 효율성이 낮다는 것이다. 확실히 바이러스는 CNS에 들어가는 능력이 다르다. 가장 치명적인 바이러스 중 하나 인 광견병 바이러스는 말초 감염 후 항상 중추 신경계에 침투하고. 이것은 말초 신경을 따라 여행하는 것으로 잘 알려져 있다. CNS에 들어가는 또 다른 주요 경로는 혈액을 통해 이루어지며 여기서도 일부 바이러스는 알파 라키스 포레스트 바이러스, 신드 비스 바이러스 및 베네수엘라 말 뇌염과 같이 매우 효율적일 수 있다. 임상 적 질환의 발병률이 신경 감염의 빈도의 척도라고 추측하지만 이것이 사실 일 가능성은 희박하다. 중추 신경계 감염과 임상 질환 사이의 상관 관계를 결정하는 것은 어렵다. 설치류의 실험적인 외인 접종 후 뇌에서의 바이러스 부하의 검정은 그것이 바이러스 감염이 신경 침습에 매우 효과적 일뿐만 아니라 명백한 임상 질환을 드물게 일으킬 수 있다. 비 접적 인구 집단에서 SSPE 발병률은 1 년에 약 백만 명의 어린이들로 추정된다. 그러나 홍역 바이러스가 이것이 암시하는 것보다 효율적으로 신경 침투가 가능할 수 있다.

연구자들은 체외에서 myelin 연구를 위해 척수신경절 뉴런과 슈반 세포 공동 배양 시스템을 개발하였다[1]. 수초화의 연구는 1 차 슈반 세포에서 슈반 세포와 뉴런 세포의 순수한 개체군을 분리하고 확립 할 수 있는 가능성에 의해 촉진되었다. 포유 동물의 척수신경절 신경 세포는 배양에서 생존하고 재생 될 수 있다[2-4].

Theiler 바이러스, 마우스 간염 바이러스 (MHV), 코로나, 홍역 및 단순 포진 바이러스 -1과 같은 일부 바이러스는 생쥐 또는 쥐의 신경계에서 탈수초성 유도의 원인으로 알려져 있다. 헤르페스 심플렉스 바이러스 -1 감염과 같은 바이러스는 중추 신경계 쥐의 탈수초성 뇌염을 유발한다. 마우스 및 쥐는 체외 및 생체 내에서 수

초 형성 및 탈수 초화 연구에 대한 중요한 모델로 사용된다.

시험 관내 수초 형성은 1 차 슈반 세포 및 1 차 신경 세포의 순수 집단과 함께 공동배양 함으로써 확립되었다. 이러한 1 차 슈반 세포와 1 차 신경 세포의 순수 집단은 쥐의 배아의 척수신경절에서 유도되었다. 이 방법은 다른 기존의 방법보다 빠르게 슈반 세포와 신경 세포의 고도로 정제 된 개체군을 생산하였다.

이 연구에서 우리는 척수신경절의 신경 세포와 슈반 세포의 공동 배양과 함께 수초화된 세포의 인구를 만들었습니다. 이 수초화된 세포가 Semliki forest virus에 감염된 후 탈수초의 처리가 진행되었다. 우리는 수초화된 세포에서 발현되는 PMP22의 항체를 사용하여 수초화 및 탈수초의 과정을 식별하고 구분할 수 있다.

II. 본 론

2.1. 배아의 척수 신경절 의 준비

마우스의 태아는 수술적으로 접근하여 수술가위를 사용하여 태반으로부터 분리하여 미리 준비된 1.5 mL Eppendorf 튜브에 옮겼다. 수직으로 봄 가위의 팁은 척추 기둥의 바로 앞쪽에 있는 주둥이 끝 부분에 삽입하고 주둥이에서 꼬리 방향으로 3-4개의 순차적 절단을 시작한다. 척수의 한쪽 끝에서 시작하여 등쪽 뿌리에서 나온 신경절이 꼬여 있었다. 모든 신경절 (약 37-42개의 신경절 / 척수 / 배아)을 제거하고 모든 척수의 단계를 반복했다. 0.25% 트립신 1.5 mL를 각 접시에 넣고 접시를 37°C 공기 배양기에 15-20분 동안 두었다. 각 튜브에 10 mL의 L-15 / 10% FBS를 첨가하고 5 분 동안 50g에서 신경절을 원심 분리 하였다. 펠릿을 첨가하고 10 mL의 L-15 / 10 % FBS로 재현탁 시켰다. 상기와 같이 5분 동안 원심 분리 한 후, 각 관에 1 mL 척수신경절 배양액을 첨가 하였다. 팁을 불타서 좁은 구멍이 난 유리 파스퇴르 피펫을 사용하여 펠릿을 10-15배 분쇄하고 세포 현탁액에 척수신경절 배양액 1 mL를 추가하였다. 이 해리 된 세포를 코팅되지 않은 35mm 접시에 배양하였다.

2.2. 배아의 척수 신경절 세포의 현탁

18 시간 후, 해리 된 척수신경절의 플레이팅을 배지

를 N2 / NGF 2 mL로 대체 하였다. 혈청이 없는 상태에서 섬유 아세포 성장은 억제되고 축삭 관련 Schwann 세포 전구체는 계속 증식한다. 배지를 변경할 필요가 없다. 6-7일 후 축삭 돌기를 형성하는 Schwann 세포 - 뉴런 네트워크를 배양 배지로 옮겼다.

2.3. 슈반 세포의 정제

슈반 세포 뉴런 네트워크를 수집 한 후, 세포를 200g에서 5 분간 원심 분리하여 펠릿화 하였다.

펠릿을 트립신 - 콜라게나제 용액에 재현탁 시키고 30분 동안 37°C에서 배양 하였다. 슈반 세포 배지를 첨가하여 반응을 정지시키고 세포를 상기와 같이 펠릿화 하였다. 펠릿을 항 Thy 1.2항체 용액 1 ml에 넣고 37°C에서 30분간 배양하였다. 원심 분리 후, 토끼 보체 용액 1ml에 펠릿을 넣고 37 °C에서 30분간 배양 하였다. 세포는 슈반 세포 배지에서 폴리 -L- 라이신으로 코팅 된 100mm 배양 접시에 도말하고 37 °C에서 30분 동안 배양하였다. 다음날 양극성의 스핀들 모양의 Schwann 세포를 N2-Schwann 세포 성장 배지로 대체하였다. Neuregulin과 Forskolin은 슈반세포의 증식을 자극하는 반면, 오염된 섬유 아세포의 성장은 혈청이없는 상태에서 억제된다. 신경 세포는 NGF가 없는 배지에서 2일 이내에 죽는다[5]. 6내지 7일 후, 세포를 1×10^6 세포 / 100 mm 플레이트의 밀도로 새로운 폴리 -L- 라이신 - 코팅 된 플레이트 상에서 재배양 하였다.

2.4. 항 유사 분열 약제의 첨가

배양액을 37 °C, 5 % CO2에서 배양 하였다. 24 시간 후, 150 ml의 NGF 저장 용액 (NG 배지에서 5- 플루오로 데옥시 우리딘 및 우리딘 40 mM, 1 mM Arabinofuranosyl Cytidine (Ara C, Sigma-Aldich, Saint Louis, MO))을 각 웰에 첨가하여 5-fluorodeoxyuridine / uridine 20 mM의 최종 농도로 만들어 배양액을 5 % CO2 배양기에서 37 °C로 배양 하였다. 72 시간 후, NGF 저장 용액의 2/3를 NG 배지로 교환하고 배양액을 2 일마다 NG 배지로 재 공급 하였다. 세 가지 배지를 변경한 후, 뉴런은 슈반 세포 추가에 대한 준비가 되었다 [2].

2.5. 척수신경절 신경 세포 배양에 슈반 세포의 첨가

슈반 세포를 소화시키고 10% FBS를 함유하는

DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA)으로 1 회 세척 한 후 C 배지 (MEM, 10 % FBS, 2mM l- 글루타민, 0.4 % 글루코스 및 50ng / NGF)에서 재현탁 하였다. 각 척수신경절 배양액에 슈반 세포 100 mL (약 200,000 세포)를 C 배지상태에서 첨가 하였다. 3 일 후, 공동 배양체에 50 mg / mL의 아스코르브 산을 보충하여 기초 층 형성 및 수초 형성을 시작하도록 하였다. 수초화 형성 기간은 21 일까지 지속되었다. 수초 형성 과정을 위상차 현미경으로 관찰하고 관찰하였다.

2.6. 면역 세포 화학

수초화 형성을 관찰하기 위해 척수신경절 뉴런 / 슈반 공동배양 (초기 미엘린 형성 후 14 일)을 PMP22에 대한 단클론 항체 (mAb)를 포함하는 1 차 항체로 표지 하였다[6-8]. PBS로 3 회 세척 한 후, coverslips를 실은 에서 60 분 동안 Alexa Fluor 488 마우스 항 - 토끼 IgG 및 Alexa Fluor 594 염소 항 - 마우스 IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 첨가하여 배양 하였다. PBS로 최종 세척한 후, 슬라이드를 장착 유체(DAKO Ltd., Carpinteria, CA)로 장착하고 형광 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan) 하에서 시각화 하였다. 형광 현미경의 이미지는 컴퓨터 프로그래밍으로 설계된 디지털 영상으로 기록되고 Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Atlanta, GA)를 이용하여 처리 되었다.

III. 결 과

본 실험과정은 다음과 같은 4 단계로 구성되어 있다 : 첫 번째 단계는 배아의 척수 신경절 세포의 현탁과정, 두 번째 단계는 anti mitotic cocktail의 추가과정, 세 번째 단계는 척수신경절 세포의 정제과정, 및 네 번째 단계는 척추 신경절 세포에 슈반 세포의 추가과정이다(그림 1).

본 실험과정은 기존의 전통적인 방법에 비해 2배정도 실험기간을 단축 시키는 시간적으로 경제적으로 좋은 실험 방법이었다. 본 연구과정의 결과로, 수초 형성의 형성을 위해 래트(쥐) 배아의 척수신경절 (E 16 일)로부터 슈반세포와 신경 세포를 각각 제조하였고 배양하였다(그림 2).

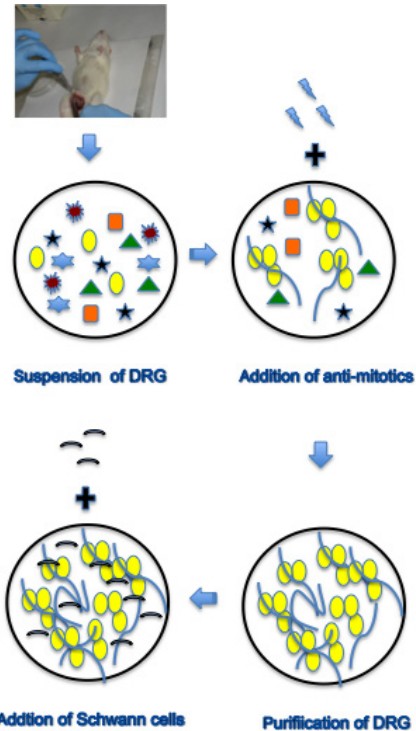


Fig. 1 Procedure of coculture with Schwann cells and neuronal cells for myelination

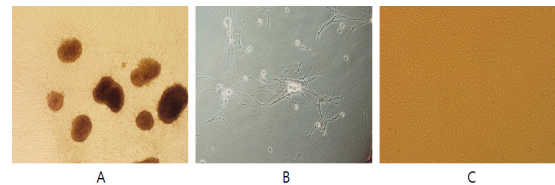


Fig. 2 Purification of populations of Schwann cells and neuronal cells, respectively, from DRG of rat embryo (E 16 day) (A: DRG; B: neuronal cells; C: Schwann cells).

수초 형성 및 탈수초 과정을 확인하기 위해, 세포 집단을 PMP22에 대한 단클론 항체로 표지하고 형광 현미경으로 관찰하였다. 수초화된 세포의 집단은 수초화 단백질에 결합하는 PMP22에 대한 단일 클론 항체로 인해 형광 색소를 나타낸다. 한편, 탈수초화된 세포의 집단은 PMP22에 대한 단일 클론 항체가 없기 때문에 형광색소가 발생하지 않았다 (그림 3).

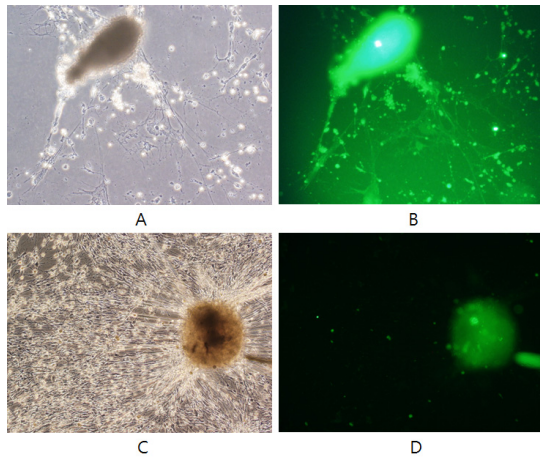


Fig. 3 Identification and distinction of myelination and demyelination processing with monoclonal antibody against PMP22 (A: population of myelinated cells, B: anti-PMP22 in myelinated cells C: population of demyelinated cells, D: anti-PMP22 in demyelinated cells).

IV. 토론

본 연구에서, 수초 형성은 각각 일차 슈반 세포 및 일차 신경 세포의 순수 집단과 함께 배양함으로써 구성되었다. 일차 슈반 세포와 일차 신경 세포의 공동 배양 집단은 각각 래트 배아의 척수신경절에서 유도되었다.

사실 상 실험과정에서 일차 슈반 세포 및 일차 신경 세포의 순수 집단을 각각 분리하여 배양하는 것은 쉽지 않았으며 더욱이 일차 슈반 세포 및 일차 신경 세포의 각각 순수 집단을 함께 공동배양한다는 자체가 매우 힘들고 많은 실패를 동반한 과정이었다.

하지만 우리는 본 연구결과를 통해서 Semliki forest virus가 공동 배양체 집단을 감염 시켰을 때 신경 세포에 작용하여 수초 형성 과정을 파괴하는 것을 현미경적으로 관찰할 수 있었다. 현미경적 관찰보다 확실한 증거는 항체를 이용한 PMP22의 검출이었다. 즉 PMP22에 대한 단클론 항체 (형광 염료로 표지 됨)의 존재는 수초화 형성 세포의 존재를 나타내고 수초화 과정을 의미한 것이다. 반대로 PMP22에 대한 단클론 항체의 부재는 탈수초화 형성 세포의 존재를 나타낼 뿐만 아니라 탈수초화 과정을 의미하게 되는 것이었다.

따라서 본 연구를 통하여 Semliki forest virus에 의한

감염은 이 바이러스가 수초화로 형성된 세포집단을 탈수초화를 발생 시키고 유도한다는 것을 확인하게 해주었다.

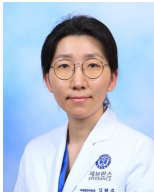
ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from Mid-Career Researcher Program (NRF-2016R1A2B4016552) through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science, ICT & Future Planning (MSIP) and a faculty research grant of Yonsei University College of Medicine for 2015(6-2015-0070).

REFERENCES

- [1] R. Liu, G. Lin, and H. Xu, "An efficient method for dorsal root ganglia neurons purification with a one-time anti-mitotic reagent treatment," *PLoS one*, vol. 8, no. 4, pp. 1-7, Apr. 2013.
- [2] J. Fukuda, "Nerve cells of adult and aged mice grown in a monolayer culture: age-associated changes in morphological and physiological properties of dorsal root ganglion cells in vitro," *Developmental Neuroscience*, vol. 7, no. 5-6, pp. 374-394, 1985.
- [3] J. Fukuda, and M. Kameyama, "Enhancement of Ca spikes in nerve cells of adult mammals during neurite growth in tissue culture," *Nature*, vol. 279, no. 5713, pp. 546-548, Jun. 1979.
- [4] K. Unsicker, S. D. Skaper, G. E. Davis, M. Manthorpe, S. Varon, "Comparison of the effects of laminin and the polyornithine-binding neurite promoting factor from RN22 Schwannoma cells on neurite regeneration from cultured newborn and adult rat dorsal root ganglion neurons," *Developmental Brain Research*, vol. 17, no. 1-2, pp. 304-308, Jan. 1985.
- [5] H. A. Kim, and P. Maurel, "Protocols for Neural Cell Culture," in *Springer Protocols Handbooks*: Humana Press, a part of Springer Science+Business Media, ch.15, pp. 253-268, 2001.

- [6] YR. Choi, SC. Jung, J. Shin, S. Y. Yoo, JS. Lee, J. Joo, J. Lee, Y. B. Hong, BO. Choi, "Development of cell models for high-throughput screening system of Charcot-Marie-Tooth disease type 1," *Journal of Genetic Medicine*, vol. 12, no. 1, pp. 25-30, Jun. 2015.
- [7] M. Ravasi, A. Scuteri, S. Pasini, M. Bossi, V. R. Menendez, D. Maggioni, and G. Tredici, "Undifferentiated MSCs are able to myelinate DRG neuron processes through p75," *Experimental Cell Research*, vol. 319, no. 19, pp. 2989-2999, Nov. 2013.
- [8] J. P. Lima, J. Devauxb, and N. Yuki, "Peripheral nerve proteins as potential autoantigens in acute and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathies," *Autoimmunity Reviews*, vol. 13, no. 10, pp. 1070-1078, Oct. 2014.



김현주(Hyun Joo Kim)

2015년-현재 세브란스병원 조교수
2013년-2015년 세브란스병원 임상조교수
2012년-2013년 서울대학교병원 진료교수
2011년-2012년 서울대학교병원 전임의
2007년-2011년 서울대학교병원 전공의
2016년 서울대학교 의과대학 의학과 박사
※관심분야: 바이오생물정보, 기도관리



사영희(Young-Hee Sa)

2005년-현재 연세의료원 임상의학연구센터 연구원
2004년 한국방송통신대학교 일본문학사
※주관심분야: 바이오생물정보



홍성갑(Seong-Karp Hong)

2000년-현재 목원대학교 바이오건강학부 겸임교수
2003년-2009년 가톨릭대학교 의과대학 연구교수
1997년 고려대학교 이학박사
※주관심분야: 바이오생물정보, 나노생물