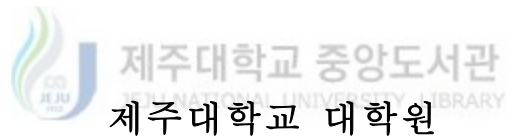


석사학위논문

압박손상을 받은 랫드 척수조직에서 CD44의
면역조직학적 관찰



수의학과

허승담

2004년 2월

압박손상을 받은 랫드 척수조직에서 CD44의
면역조직학적 관찰

지도교수: 신 태 균

허 승 담

이 논문을 수의학 석사학위 논문으로 제출함

2003 년 10 월

허승담의 수의학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____

위 원 _____

위 원 _____

제주대학교 대학원

2003년 12월

Abstract

Immunohistochemical study of CD44 in the spinal cord of rats with clip compression injury

Advised by Professor Taekyun Shin

Seungdam Heo

Department of Veterinary Medicine

Graduate School, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

CD44 is one of ligands for osteopontin (OPN) which has been known to be an extracellular matrix phosphoglycoprotein that is involved in cell adhesion, chemoattraction, and immunomodulation. In this study, the expression of CD44 and OPN was investigated in the spinal cords of rats at days 0(sham), 1, 4 and 7 post compression injury. Immunohistochemically, CD44 was constitutively expressed in some astrocytes in sham control. In spinal cord compression injury, CD44 was upregulated in astrocytes at day 1 to 7 post-injury as well as inflammatory cells in core lesions. OPN was extracellularly detected in the core of clip injury, and was localized in activated microglia/macrophages in the injured lesion and in some astrocytes in peri-lesion at day 1 and gradually increased at day 4 and 7 post-injury. In conclusion, it is suggested that upregulation of CD44 and OPN contributes cell adhesion, glial cell attraction at an early stage after spinal cord injury,

leading to the remodeling of injured spinal cords.

Key word: CD44, macrophage, osteopontin, spinal cord injury



목 차

1. 서 론	-----	1
2. 재료 및 방법	-----	2
3. 결 과	-----	4
4. 고 찰	-----	13
5. 참고 문헌	-----	15



I. 서론

최근 중추신경계 및 말초신경계에서 신경세포의 손상과 신경재생에 관한 연구가 많이 진행되면서 척수손상 동물모델 에서 척수의 퇴행성 변화 및 외상 후 척수 조직의 재생기전에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다 (Basso 등, 1996). 이와 같은 척수손상은 일차적으로 세포 기능의 손실을 야기시키며, 염증반응에 의한 이차적인 손상을 초래하기도 한다. 척수손상 모델에는 혈관결찰 클립을 이용한 clip compress injury model과 무게추를 활용한 weight-drop contusion model 등이 알려져 있으며 부종, 수초변성, 염증세포의 침윤 및 astrogliosis가 특징적인 소견이다 (Von Euler 등, 1997; Basso 등, 1996). 손상된 척수조직에서는 여러 형태의 염증 반응이 나타나는데 이 과정 중 CD44와 같은 접착분자들이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

CD44는 태아조직과 성숙된 조직에서 다양하게 발현하며, 세포간의 부착과 이동을 용이하게 하여 기관의 형성과 조직재생에 매개자 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Borland 등, 1996). 또한 CD44는 osteopontin의 ligand로서 대식세포의 침윤 및 염증세포의 활성화에 관여하는 것으로 알려져 있으며 이 분자를 차단할 경우 염증이 완화될 수도 있다고 한다 (Weber 등, 1998). 이와같이 중추신경계의 염증반응에서 중요한 역할을 할 것으로 추정되는 osteopontin 과 이의 ligand 로 알려진 CD44에 관하여 척수손상모델에서는 연구된 바 많지 않다.

본 실험에서는 CD44가 척수 손상의 진행에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하고, 척수 손상에 따르는 퇴행성변화와 조직의 재생기전에서 이 두 분자의 관련성을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

성숙한 랫드(Sprague-Dawley, 160-200g, 7-12주령, male)을 대한바이오링크(청주)로 부터 구입하여, 본 실험에 사용하였다.

2. 척수손상수술

척수손상은 microvascular clip (Storeling, Wood Dale, Illinois, USA)을 이용한 Rivlin과 Tator(1978)의 방법을 응용하였다. 실험동물을 에테르로 흡입마취 시키면서 8-9번째 흉추 부위에서 추궁절제술을 시행하였다. 실험군당 3마리 랫드의 척수를 노출시킨 후 1분간 vascular clip(10-15g)을 수직으로 삽입한 후 압박하였고, 대조군은 추궁절제술만 실시하였다. 수술 후 근육과 피부를 봉합하였다. 조직검사를 위해 실험군은 수술 후 0(대조군), 1, 4, 7 일째 랫드를 희생시켰다.

3. 면역조직화학염색

면역염색시 1차항체로는 CD44와 osteopontin에 대한 항체로 monoclonal mouse anti-rat CD44(OX49)(Pharmingen, San Diego, CA)와 anti-osteopontin (Akm2A1, sc-21742, IgG 1)(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)을 사용하였고 별아교세포와 큰포식세포를 확인하기 위하여는 rabbit anti-GFAP(1:800 dilution)(Dako, Copenhagen, Denmark)와 mouse monoclonal anti rat macrophages(ED1, Serotec, London, U.K.)를 사용하였다. avidin-biotin complex

Elite kit(Vector, Birlingham, CA)를 활용한 면역염색을 하기 위해 랫드 척수조직을 10% buffered formalin 용액에서 고정시킨후 ethanol과 xylene으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 paraffin에 포매한 후 5- μ m 두께로 조직절편을 만들었다. 파라핀을 제거한 후 내재성 peroxidase를 제거하기 위해 0.3% H₂O₂/methanol 용액에 20분간 반응시켰으며, masking된 항체를 노출하기 위해 osteopontin 염색은 citrate buffer(PH 6)에서 microwave처리하였다. 이어서 비특이적 면역반응을 방지하기 위해 10% normal goat serum으로 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 1차항체 anti-rat CD44(1:800)(Pharmingen) 와 anti-osteopontin(1:800)(Santa curz), rabbit anti-gial fibrillary acidic protein(anti-GFAP)(1:800)(Dake, Copenhagen, Denmark) 및 ED1(1:800)을 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 biotinylated anti-rabbit IgG 또는 biotinylated anti-mouse IgG를 실온에서 45분 동안 반응시켰다. 이어서 avidin-peroxidase conjugate로 45분간 실온에서 반응시켰으며 각 단계 사이에는 PBS로 5분간 3회씩 충분히 세척하였다. 면역 반응이 끝난 조직은 diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB) substrate kit(Vector)를 이용하여 발색하고 hematoxylin으로 대조염색하였다. 그 후 ethanol, xylene의 탈수 및 투명화 과정을 거친 후 봉입하여 광학현미경하에서 관찰하였다. 발현세포형을 구분하기 위하여는 연속절편을 이용하여 같은세포임을 입증하였다.

Ⅲ. 결과

1. 척수 손상 부위에서 형태학적 관찰

조직학적 특징을 비교하기 위해서 급성 척수 손상을 중심으로 퇴행성 과정을 관찰하였다(Fig. 1, Table 1). 추궁절제술만 시행한 대조군의 척수에서는 물리적 조직 손상과 큰포식세포를 찾아볼 수 없었다. 그러나 손상을 받은 실험군에서 척수 손상 후 1일째 점상출혈, 범발적 괴사, 백색질과 회색질부에 조직손상이 관찰되었다. 손상이 심한 4일째 병변부위에서는 큰포식세포로 보이는 구형의 세포가 적혈구를 탐식한 것이 관찰되었고(Fig. 1A), 병변 부위 주변부로 별아교세포가 관찰되었다(Fig. 2B). 손상 후 7일째 백색질 및 회색질 모두에서 많은 수의 큰포식세포가 침윤되었고(Fig. 3C), 손상부위를 중심으로 별아교세포의 증가가 명확하게 나타났다(Fig. 2D).

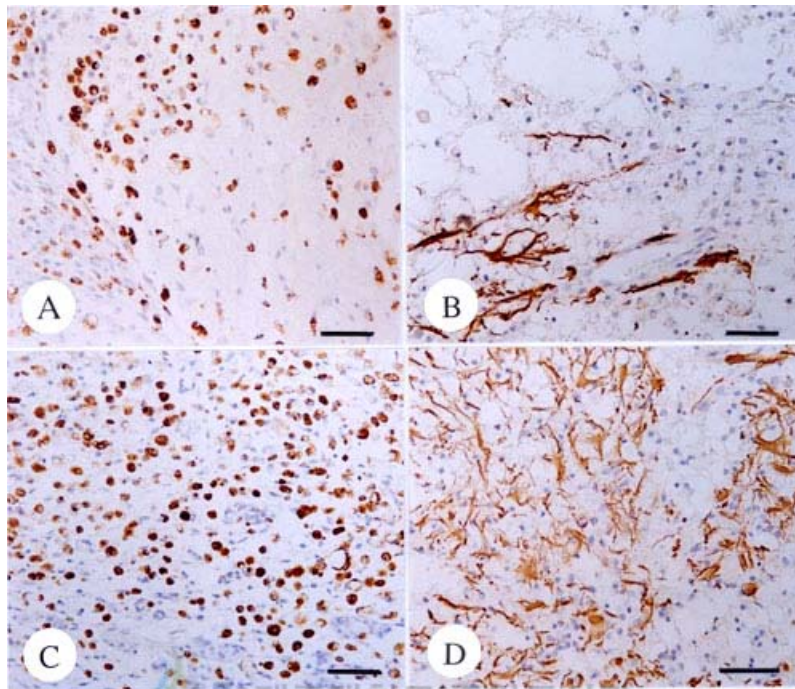


Figure 1. Histology of spinal cord sections on days 4 (A, B) and 7 (C, D) post-injury.

On day 4 post-injury, the number of ED1-positive macrophages increased in the affected lesion (A); GFAP immunoreactivity was rare in the cavity, but abundant at the boundary (B). At day 7 post-injury, the majority of cells in the cavity were ED1-positive macrophages (C); some GFAP-positive astrocytes extended processes toward the core lesion (D). A-D, counterstained with hematoxylin. The bar represents 50 μm .

Table 1. CD44 and osteopontin immunoreactivity in the spinal cords of rats with normal and spinal cord injury.

Antibodies	Cell type	Sham ^d	SCI day 1 ^d	SCI day 4	SCI day 7
Osteopontin ^a	Neurons	+	+	+	+
	Astrocytes	+ ^b	++	++	++
	Macrophages*	ND ^c	+	+++	++
	Ependymal cells	-	-	-	-
CD44	Neurons	-	-	-	-
	Astrocytes**	Weak	Moderate	Intense	Intense
	Macrophages*	ND ^c	++	+++	+++
	Ependymal cells	-	-	-	-

^aThree different sections from three animals were examined in each group by two blind observers.

^bThe presence of immunoreactive cells in the spinal cords of each group is expressed as negative (-), under 10 cells positive (+), 10 to 30 cells(++), over 30 cells (+++) under X20 magnification of objective lens.

^cND ; There were no inflammatory cells in the spinal cords of sham control rats.

^dRat spinal cords were obtained at days 0(sham), 1, 3, 7 post-injury.

* Macrophages are confirmed by ED1 immunostaining, and include ED1+ activated microglia and/or ED1-positive cells.

** The intensity of CD44 in astrocytes is arbitrarily classified as weak(some astrocytes along the pia mater, some in dorsal horn of gray matter), moderate(enhanced expression of CD44 in the white matter) and intense (CD44 + in all over the white matter) by two blind observers.

2. 척수 손상 부위에서 CD44의 면역세포학적 관찰

대조군의 척수조직에서 CD44 염색은 약하게 나타났으며 회색질중 dorsal horn부위에서 일부 별아교세포가 CD44 양성반응을 나타내었다 (Fig. 2A). 그러나 백색질의 신경세포에서 양성반응은 거의 관찰되지 않았다. 척수손상 1일째에는 병변부에 출현한 일부 큰포식세포와 회색질의 별아교세포에서 대조군에 비하여 강하게 CD44가 염색되었다 (Fig. 2B). 척수손상 4일째에는 병변부에서 염증세포 및 백색질의 별아교세포에서 CD44가 강하게 발현되었다(Fig. 2C). CD44 (Fig 2D) 양성세포의 세포형을 조사한 결과 ED1에 양성인 큰포식세포와 (Fig. 2E) 별아교세포(Fig. 2F)로 확인되었다 (Fig. 2G). 척수손상 7일째는 4일째와 비슷한 면역반응을 보였다.



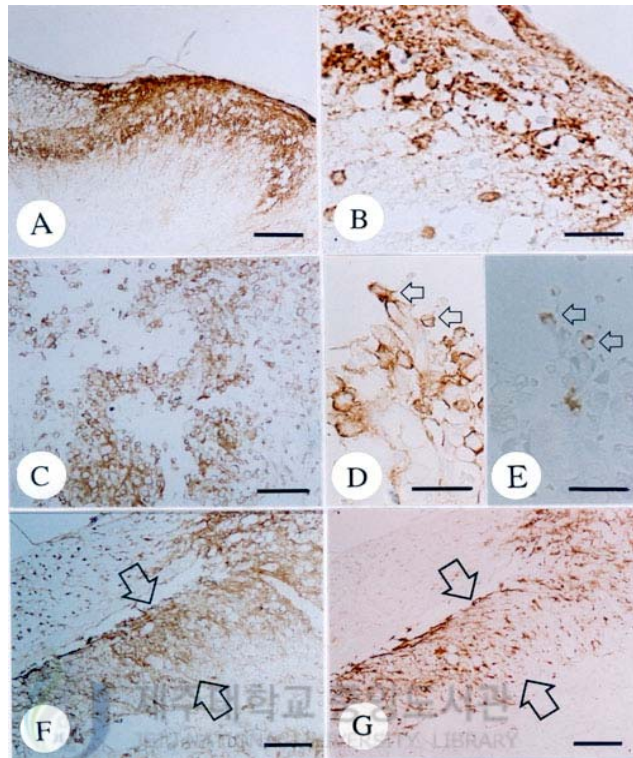


Figure 2. Immunostaining of CD44 in the spinal cords of sham control and SCI rats at day 4 post-injury. CD44 was constitutively expressed in the dorsal horn of spinal cord gray matter of normal or sham-operated rats (A). At day 1, some cells were positive for CD44 (B). At day 4 after injury, a majority of cells in the cavity expressed CD44 (C). In serial sections immunostained with CD44 (D) and ED1 (E), some CD44 positive cells (D, arrows) are positive for ED1 (E, arrows). Arrows indicate same cells. CD44 (F) was intensely immunostained in glial cells in peri-lesions, while those are GFAP positive astrocytes (G). Arrows in F and G demarcate same area of CD44 and GFAP immunoreaction. A-F: counterstained with hematoxylin. Bar represents 30 μm (B, D, E) and 100 μm (A, C, F, G).

3. 척수 손상 부위에서 osteopontin 의 면역세포학적 관찰

대조군의 척수조직에서는 osteopontin의 염색이 신경세포와 별아교세포에서 양성반응을 보였으나 (Fig. 3A) 그 수는 많지 않았다. 척수손상 1일째에는 일부 염증세포에서 osteopontin의 양성세포들이 관찰되었다 (Fig. 3B). 척수손상 4일째 osteopontin의 면역반응은 병변부에 증가한 염증세포에서 관찰되었고 (Fig. 3C), 이들 염증세포들은 ED1 양성 큰포식세포였다 (Fig. 3D). 병변 주위 별아교세포에서도 (Fig. 3F), osteopontin의 양성반응이 확인되었다 (Fig. 3E). 그러나 별아교세포(astrocyte)에서의 osteopontin 양성반응 세포들은 큰포식세포에서의 osteopontin 양성반응 세포에 비하여 그 수가 많지는 않았다. 척수 손상 7일째 면역반응은 4일째와 유사하였다.



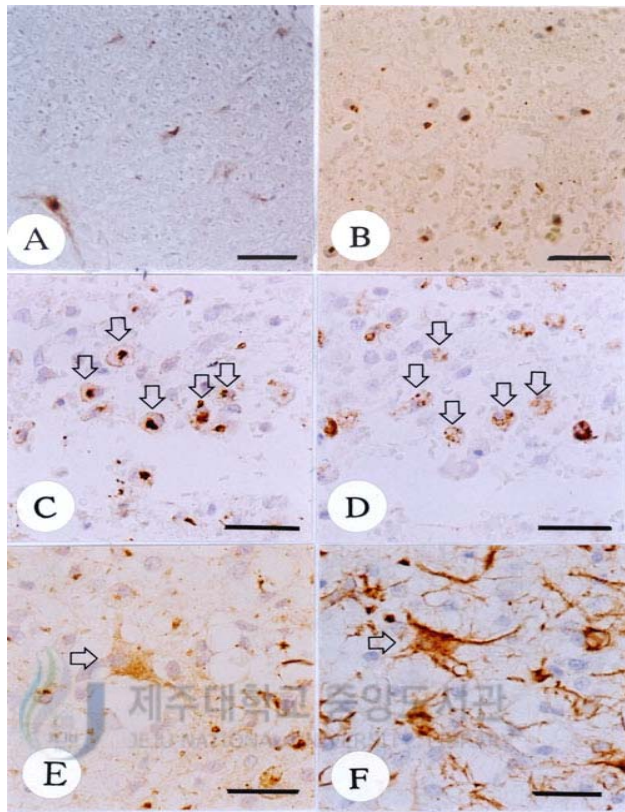


Figure 3. Immunostaining of OPN in the spinal cords of sham control and SCI rats at days 1 and 4 post-injury. In normal spinal cord (A), OPN was detected in some astrocytes and neurons. After spinal cord injury, a few cells were immunopositive for OPN in the injured spinal cords at day 1 (B). At day 4 after injury, a majority of cells in the cavity expressed OPN (C, arrows), and those cells were positive for ED1 (D, arrows). In the peri-lesions, some astrocytes showed OPN immunoreactivity (E) which were positive for GFAP immunoreactivity (F). A-F: counterstained with hematoxylin. Bar represents 30 μm (C, D, E, F) and 50 μm (A, B).

IV. 고찰

CD44는 세포표면에 광범위하게 분포하고 있는 당단백으로서 기관형성이나 창상 치유 및 염증반응 등에 중요한 역할을 하는 osteopontin에 대한 수용체로 알려져 있다 (Weber 등, 1996; Borland 등, 1998). 이런 CD44는 세포부착조절인자로서, 급성 신장염과 같은 질병모델에서 세포의 이동과 유착과정에 관여함으로써 조직이 재생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Lewington 등, 2000). 본 연구에서 CD44는 정상 척수조직에서 일부 별아교세포와 척수의 dorsal horn에서 발현함을 확인하였다. 더욱이 척수 조직에서는 상존하면서 염증이 진행됨에 따라 이들세포에서 CD44의 발현이 증가함을 확인하였다. 아울러 침윤 또는 세포분열로 생긴 염증세포에서 CD44가 강하게 발현하는 것으로 보아 이들세포들은 상호 접착을 통한 세포의 활성화 또는 이동에 관여할 수 있음을 알 수 있었다. 그 CD44 양성세포로는 ED1 양성 큰포식세포와 병변주위부에서 증식되는 GFAP 양성 별아교세포들으로써 이들은 염증의 초기 및 후기에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 다양한 cytokines을 분비하기도 하는 것으로 보아 이들 CD44의 발현은 세포활성과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다.

CD44는 osteopontin 또는 hyaluronate의 중요한 ligand로써 이들의 상호작용으로 세포의 이동이 촉진된다고 한다(Weber 등, 1996; Borland 등, 1998). 중추신경계 조직의 초기손상과 관련성이 깊은 osteopontin은 울혈성 뇌 손상시에 macrophage/ activated microglia 의 세포에서 증가한다는 보고가 있다 (Wang 등, 1998). 본 실험에서는 척수 손상 후에 병변부에 출현한 큰포식세포에서 osteopontin 양성반응이 많이 관찰되었고, 병변 주위의 별아교세포에서도 osteopontin이 경미하지만 면역양성으로 나타났다. 이런 결과는 앞에서 언급한 보고와 유사한 소견을 보여주고 있으며, 척수 손상후 진행 경과에 따라 병변부와 병변 주위부에서 osteopontin 양성반응이 증가와 함께 CD44 양성반응이 점차 증

가한 것으로 관찰되었다.

결론적으로 본 실험을 통하여 척수 손상의 초기 반응중 중추신경계 조직에서 상존하는 CD44의 발현이 증가되는 것을 확인하였고 동시에 초기 염증세포에서 분비되는 osteopontin은 CD44와 협동으로 손상부위로 염증 세포의 이동을 활발히 증진시키고 세포와 세포의 부착을 용이하게 하여 척수 손상후의 조직의 재생에 관여할 수 있을 것으로 생각된다.



V. 참고문헌

Basso, D.M., Beattie, M.S., Bresnahan, J.C. 1996. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp. Neurol.* 139, 244-256.

Borland, G., Ross, J.A., Guy, K. 1998. Forms and functions of CD44. *Immunol.* 93(2), 139-148.

Lewington, A.J., Padanilam, B.J., Martin, D.R., Hammerman, M.R. 2000. Expression of CD44 in kidney after acute ischemic injury in rats. *Am. J. Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 278(1), R247-254.

Von Euler, M., Seiger, A., Sundstrom, E. 1997. Clip compression injury in the spinal cord: a correlative study of neurological and morphological alterations. *Exp. Neurol.* 145, 502-510.

Wang, X., Loudon, C., Yue, T.L., Ellison, J.A., Barone, F.C., Solleveld, H.A. and Feuerstein, G.Z. 1998. Delayed expression of osteopontin after focal stroke in the rat. *J. Neurosci.*, 18 2075-2083.

Weber, G.F., Ashkar, S., Glimcher, M.J., Cantor, H. 1996. Receptor-ligand

interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). Science 271(5248), 509-512.

