

뇌조직 면역이 외상성 척수손상에 미치는 영향

허 승 담, 안 미 정, 심 기 범*, 신 태 균

제주대학교 농업생명과학대학 수의학과, 제주대학교 의과대학 신경외과학교실*

Effect of Brain Tissue Immunization on the Traumatic Spinal Cord Injury in Rats

Seung Dam Heo, Mee Jung Ahn, Ki Bum Sim*, Tae Kyun Shin

Department of Veterinary Medicine, Cheju National University,

Department of Neurosurgery, Cheju National University*

ABSTRACT : Experimental autoimmune encephalomyelitis(EAE) is an inflammatory disease of the central nervous system that can be induced by immunization with brain tissues with adjuvants. After immunization of brain tissue, rats with EAE show hindlimb paralysis after 10 days and recover paralysis spontaneously after 17 days post-immunization. Even though EAE affected rats recover paralysis, brain tissues may contain elevated level of a variety of neuroprotective molecules including nitric oxide synthases. In the present study, we questioned whether spinal cord injury is milder in the rats which were previously challenged with brain tissue immunization, possibly autoimmune T cells. To test these facts, we induced spinal cord injury in Lewis rats with immunization of myelin basic protein and vehicle at day 21 post-immunization, and scored hindlimb paralysis depending on the locomotor function scoring system(BBB score). we show here that rats recovered from EAE had better outcome with a BBB score of 14.25 ± 7.81 ($n=5$), compare with 10.75 ± 6.5 ($n=5$) in the control group after 3 weeks. These results suggest that animals

with pre-exposure of brain tissue antigens may have a neuroprotective function in the central nervous system, and showed a better locomotor recovery in induced spinal cord injury. The precise mechanism of locomotor recovery in rats needs further study.

Key words : experimental autoimmune encephalomyelitis, spinal cord injury, neuroprotection.

서 론

자기면역성 뇌척수염 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)은 T세포매개성 질병으로 중추신경계에서 T세포침윤과 수초탈락이 특징이며, 사람의 다발성 경화증 (multiple sclerosis, MS)의 동물모델로 활용된다(Raine and Traugott, 1984). EAE의 발병은 뇌 내 침윤된 염증세포로부터 분비된 pro-inflammatory cytokine (IL-1 β , TNF- α)에 의해 야기되며(Tanuma 등, 1997). 심한 마비기를 지니게 되면 anti-inflammatory cytokine (IL-4, IL-10, TGF- β 등)의 작용(Tanuma 등, 1997) 및 침윤된 염증세포의 apoptosis에 의해 회복하는 것으로 알려져

고 있다(Schmied 등, 1993).

뇌조직내 신경세포 및 아교세포는 여러 생리활성 물질에 자극을 받게 되면 다음에 올 수 있는 2차적 자극에서 신경세포는 비교적 손상이 적을 수 있다는 가설이 제시되고 있으며 실제로 자기면역성 림프구를 이식한 경우 신경조직의 손상이 완화될 수 있다는 실험들이 보고되고 있다(Moalem 등, 2000; Kipnis 등, 2002; Jones 등, 2002). 지금까지 실험은 주로 자기면역성 림프구를 분리 배양한 후 이들의 기능적 특성에 주안점이 맞추어져 왔지만 실제 동물 생체에서는 어떤 반응이 나타나는지 알려진 바 많지 않다. 최근 척수 손상 환자의 증가와 함께 이에 대한 동물 모델 개발도 많아지고 있다. 본 연구팀은 랫트에서 척수 손상 모델을 연구하면서 손상정도에 따라 다소 다르지만 스스로 회복하는 것을 확인하였고 또한 생체에는 자체 회복과 관련된 여러 인자가 내재함을 증명하였다. 이와 같은 실험 결과를 미루어 볼 때 척수 손상과 척수에 주로 병변을 일으키는 자기면역성 뇌척수염과는 상당히 밀접한 관련성이 있을 것으로 생각되었다.

이 연구에서는 뇌조직의 면역으로 생기는 자기면역성 뇌염을 야기 시킨 후 마비가 회복되는 3주 후 수술을 통한 외상성 척수손상을 유도 한 경우 운동성 회복이 어떤 경과를 취하는지를 행동학적 및 조직학적으로 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

Lewis rats를 Harlan(Sprague-Dawley, Inc., Indianapolis, IN)으로부터 구입 후 실험실에서 유지하면서 사용하였다.

2 자기면역성뇌척수염(EAE)의 유도와 임상증상의 평가

정상 Lewis 랫트의 척수를 추출하여 0.05M phosphate buffer에서 균질화시킨 후(1g/ml), complete Freund's adjuvant(CFA: Mycobacterium tuberculosis H37Ra,

5mg/ml; Difco)를 동량 혼합한 후 면역원으로 사용하였다(Shin 등, 1995). 면역은 랫트의 좌우뒷발바닥에 100 ul씩 접종하였고, 면역한 랫트는 자기면역성 뇌척수염의 특징적인 임상증상을 단계별로 구분하였다. 즉, 증상 없으면 Grade 0, 꼬리가 힘없이 늘어지면 Grade 1, 한쪽 뒷다리가 마비되면 Grade 2, 양쪽 뒷다리가 마비되면 Grade 3, 사지가 마비되면 Grade 4로 구분하였다(Shin 등, 1995). 3주 후 마비가 회복된 랫트를 척수손상 수술에 이용하였다.

3. 척수 손상 수술: 척수에 손상을 주기 위하여 실험동물을 ethyl ether에 흡입 마취시킨 후 피부를 절개하고 laminectomy를 실시하였다(Jung 등, 2003). 그 후 aneurysm vascular clip(power 15-20g)으로 60초간 손상을 주었다. 이와 같은 손상은 척수의 심한 손상으로 일으키며 경시적으로 회복할 수 있음을 앞서 보고한 바 있다(Kim 등, 2003). 대조군으로는 뇌조직을 면역하지 않는 랫트에서 같은 척수 손상을 주었다.

4. 행동학적 평가 : rat의 마비정도를 평가하기 위하여 Basso, Beattie and Bresnahan(BBB)의 평가 방법을 따랐다(Table 1). 랫트의 운동기능을 평가하기 위하여 수술후 매일 1X 1 m의 종이로 덮여진 테이블 위에서 4명의 관찰자가 1분간 랫트의 움직임을 평가하였다. 수술후 1일째 BBB score 가 1 또는 2인 랫트를 중심으로 행동학적 회복 정도를 3주간 기록하였다.

5. 조직표본 준비와 조직 검사

실험동물은 수술 후 약 3주간 관찰하였다. 그 후 ether로 마취하여 방혈하였고, 실험군 당 3마리씩 희생시켜 척수를 채취하였다. 그리고, 면역조직화학염색용 조직은 10% 포르말린 고정하고 에탄올과 xylene으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 파라핀에 포맷한 후 5 μ m의 두께로 조직절편을 만들어 H-E염색을 실시하였다.

Table 1. Basso, Beattie and Bresnahan Locomotor Rating Scale(Basso *et al.* 1996).

0	No observable hindlimb(HL) movement
1	Slight movement of one or two joints, usually the hip and/or knee
2	Extensive movement of one joint or extensive movement of one joint and slight movement of one other joint
3	Extensive movement of two joints
4	Slight movement of all three joints of the HL
5	Slight movement of two joints and slight movement of the third
6	Extensive movement of two joints and slight movement of the third
7	Extensive movement of all three joints of the HL
8	Sweeping with no weight support or plantar placement of the paw with no weight support
9	Plantar placement of the paw with weight support in stance only (i.e., when stationary) or occasional, frequent, or consistent weight-supported dorsal stepping and no plantar stepping
10	Occasional weight-supported plantar steps: no FL-HL coordination
11	Frequent to consistent weight-supported plantar steps and no FL-HL coordination
12	Frequent to consistent weight-supported plantar steps and occasional FL-HL coordination
13	Frequent to consistent weight-supported plantar steps and frequent FL-HL coordination
14	Consistent weight-supported plantar steps, consistent FL-HL coordination, and predominant paw position during locomotion is rotated (internally or externally) when it makes initial contact with the surface as well as just before it is lifted off at the end of stance: or frequent plantar stepping, consistent FL-HL coordination, and occasional dorsal stepping
15	Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination and no toe clearance or occasional toe clearance during forward limb advancement: predominant paw position is parallel to the body at initial contact
16	Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination during gait and toe clearance occurs frequently during forward limb advancement: predominant paw position is parallel at initial contact and rotated at lift off
17	Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination during gait and toe clearance occurs frequently during forward limb advancement: predominant paw position is parallel at initial contact and lift off
18	Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination during gait and toe clearance occurs consistently during forward limb advancement: predominant paw position is parallel at initial contact and rotated at lift off
19	Consistent plantar stepping and consistent coordinated gait, consistent toe clearance, predominant paw position is parallel at initial contact and lift off, and trunk instability: tail consistently up
20	Consistent plantar stepping and consistent coordinated gait, consistent toe clearance, predominant paw position is parallel at initial contact and lift off, and trunk instability: tail consistently up
21	Consistent plantar stepping and coordinated gait, consistent toe clearance, predominant paw position is parallel throughout stance, and consistent trunk stability: tail consistently up

6. 조직학적 검사

조직의 파라핀을 제거하고 조직변화를 확인하기 위하여 hematoxylin-eosin 염색을 실시하였다.

결 과

1. EAE의 임상경과

면역 후 9-11일경에 꼬리의 마비(G1)가 나타나 뇌척수염의 발병을 알 수 있었고, 12-15일경에는 꼬리 및 양쪽 후지의 마비(G3)가 일어나며 이 질병이 악화되었다. 16-17일경에 마비가 사라지면서 자연 회

복되었다. 그러나 면역후 21일째 행동학적 평가에서 마비는 회복되었으나 척수 조직내 다수의 염증세포는 남아있었다(Fig. 1).

2. BBB score 의 변화에 의한 척수 손상 후 회복 과정

뇌조직을 면역한 그룹과 대조군에서 척수 손상후 회복 과정을 비교한 결과 Table 2 와 같다. 척수손상 후 약 3 주차부터 뇌조직을 면역한 그룹의 BBB score 평균치가 (14.25±7.81) 로써 대조군의 (10.75±6.5) 보다 증가되어 있었다. 이와 같은 소견은 3주의 짧은 기간 동안 평가 된 것으로 현저히 회복이 빠름을 알 수 있었다(Table 2).

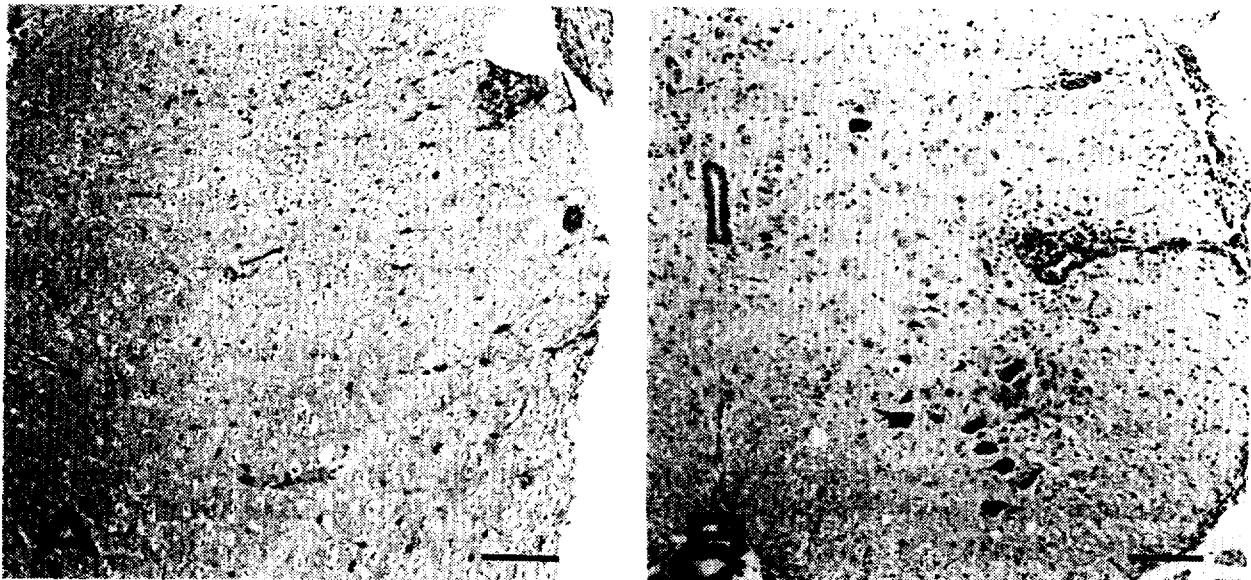


Figure 1. Histology of spinal cord with normal(A) and EAE at 21 post-immunization of myelin basic protein(B). There are some inflammatory cells in the EAE affected spinal cord(B), while no cells were found in normal control (A). A and B: H-E staining. Scale bars represent 100 um.

Table 2. A comparison of BBB score of rats with spinal cord injury^a

Days post-injury	SCI only(n=5)	SCI in rats with pre-immunization(n=5)
1	1.0±0.0	1.2±0.45
7	3.2±3.27	3.2±3.49
14	7.0±5.43	9.6±6.11
21	10.75±6.5	14.25±7.81 ^b

^aSCI, spinal cord injury. Values are mean ± standard deviation.

^bp=0.46, compared with SCI only and SCI in rats with pre-immunization

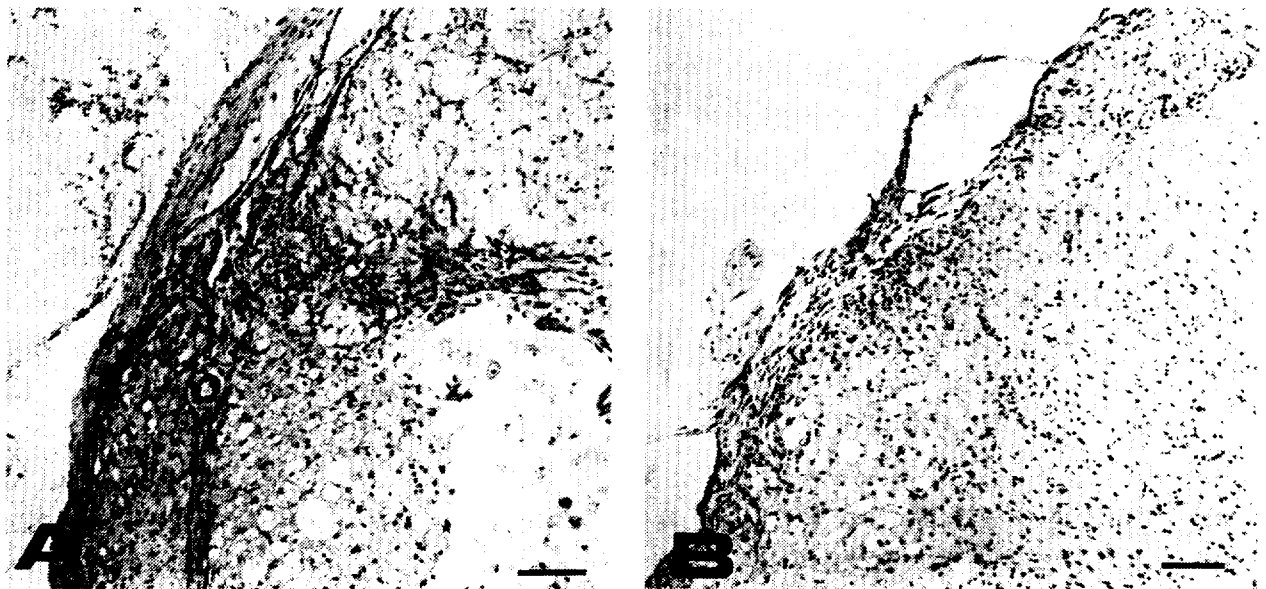


Figure 2. Histology of spinal cord of rats with spinal cord injury. A: spinal cord of control rats with spinal cord injury. B: Spinal cord of rats with brain tissue immunizations at 21 days prior to spinal cord injury. A and B were obtained at day 21 post injury. Scale bars represent 100 um.

3. 조직 절편의 비교

그룹간 조직 소견을 비교한 결과 저배율 소견상 큰 차이가 인정되지는 않았다(Fig. 2).

고 찰

EAE는 척수내 염증이 주 소견이며 이들은 약 3주 후 뒷다리의 마비가 회복, 그 후 일부 염증세포가 남아 있기도 하다. 이 세포군들은 주로 suppresser T cell, NK cell, Macrophage들로 알려져 있다. 이 세포들이 척수 조직 보호에 관여한다는 것을 알려져 있다(Moleam 등, 1999; Jones 등, 2002).

이 실험에서 뇌조직을 면역한 후 생기는 자기면역성 뇌척수염은 척수의 염증과 뒷 다리의 일시적인 마비를 주 증으로 하지만 단계적으로 2주 후부터 회복되기 시작하여 약 3주 후면 뒷 다리의 마비가 정상적인 보행으로 운동기능을 회복한다. 이 시기에는 뇌조직내 일부 suppressor T cell, 활성화된 macrophage 및 astrocyte 가 광범위하게 관찰된다. 이 세포들은 질병의 초기 단계에서는 염증의 유도과 촉진에 관여

하지만 뇌조직 면역후 2주 이후가 되면 TGF beta 와 같은 물질들을 분비하여 회복을 도운다고 한다(Kipnis 등, 2002). 즉 이 시기를 전후한 경우 뇌 조직은 외부의 손상도 견딜 수 있는 기능을 갖게 되는 것은 당연한 것으로 추정된다. 본 실험팀은 선행연구를 바탕으로 비특이적 신경조직 방어 물질이 총만된 시기에 척수 손상을 유도하였다. 그 결과 외상을 가하지 않는 대조군과 비교해서 손상후 7일까지는 BBB 등급에서 큰 차이를 보이지 않았지만 손상후 2주째부터 뇌조직을 면역한 그룹에서는 뒷 다리의 기능회복이 점차적으로 빠르게 나타났고 3주째는 회복이 더 증가하였다. 이 결과로 보아 수술후 시간 경과에 따라 EAE 이환 동물은 척수 손상에 대하여 저항하는 기능 또는 회복기능이 더욱 왕성함을 알 수 있었다.

중추신경손상 후에 신경조직의 재생에는 macrophage 가 관여한다는 보고가 있다(Rapalino 등, 1998). 지금까지 많은 연구 결과 macrophage는 뇌조직의 손상에 주안점을 두어 왔으나 뇌조직내 이물질이나 퇴행물의 청소에는 macrophage의 역할이 매우 크다고 할 수 있다. 실제적으로 척수 손상 후 macrophage를 이식한 경우 척수의 기능회복이 촉진되었다는 연구보고(Rapalino 등, 1998)가 있으며 아마도 이는 청소기

능을 통해 axon의 성장을 억제하는 물질(Nogo)을 가진 myelin의 제거가 기능회복을 도운 것으로 추정할 수 있다. 뇌조직을 면역한 이 과제에서도 자가 면역 뇌척수염이 행동학적으로 회복되더라도 상당기간 뇌조직내에는 autoimmune T cell 과 macrophage가 남아있는데 이들은 외부의 충격으로 이겨내는데 깊이 관여할 수 있을 것으로 추정된다.

결론

뇌조직 면역을 통해 생긴 비 특이 방어 기능이 뇌조직내 남아 있을 경우 척수의 외상성 손상으로부터 조직을 보호하는 기능이 내재함을 실험적으로 증명하였으며 이와 같은 형태의 면역은 생체의 정상적인 방어에 유용할 것으로 생각된다.

적요

EAE는 myelin basic protein의 면역후에 일어날 수 있는 중추신경계의 염증성 질병이며 다발성경화증의 동물모델로 이용된다. 본 연구는 EAE로부터 회복한 동물에서 외상성 척수 손상후 회복 정도를 비교검토하였다. 그 결과 뇌조직을 면역한 랫트는 3주 후 마비에서 회복하였고 그 때 수술을 통해 척수에 압박손상을 주었다. 대조군은 압박손상만 가한 후 운동기능의 회복정도를 구분하여둔 BBB등급으로 평가하였다. 그 결과 뇌조직을 면역한 동물에서는 BBB score가 3주째 14.25 ± 7.81 (n=5) 로써 대조군의 10.75 ± 6.5 (n=5)보다 현저히 높게 나타났다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 뇌 조직 면역 후 중추신경계 내에서는 염증 반응에 대응하는 여러 분자들이 증가하게 되고 이들은 척수의 외상성 자극으로부터 방어 기능을 가질 수 있는 것으로 추정되었다.

Acknowledgment : This study was supported by a grant from the Korean Health 21 R & D Project. The Ministry of Health & Welfare, Republic of

Korea (02-PJ1-PG10-21305-0003).

인용문헌

1. Basso, D.M., Beattie, M.S. and 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.
2. Jones, T.B., Basso, D.M., Sodhi, A., Pan, J.Z., Hart, R.P., MacCallum, R.C., Lee, S., Whitacre, C.C. 2002. Popovich PG. Pathological CNS autoimmune disease triggered by traumatic spinal cord injury: implications for autoimmune vaccine therapy. *J. Neurosci.* 22(7):2690-2700.
3. Jung, K., Min, D.S., Sim, K.B., Ahn, M., Kim, H., Cheong, J., and Shin, T. 2003. Upregulation of phospholipase D1 in the spinal cords of rats with clip compression injury. *Neurosci. Lett.* 336(2):126-130.
4. Kim, D.H., Heo, S.D., Sim, K.B., Shin, T. 2003. A model of acute severe spinal cord injury using a vascular clip. *J. Subtrop. Agric. Biotech.* 19: 63-70.
5. Kipnis, J., Mizrahi, T., Yoles, E., Ben-Nun, A., Schwartz, M., Ben-Nur, A. 2002 Myelin specific Th1 cells are necessary for post-traumatic protective autoimmunity. *J Neuroimmunol.* 130(1-2):78-85.
6. Moalem, G., Gdalyahu, A., Shani, Y., Otten, U., Lazarovici, P., Cohen, I.R., Schwartz, M. 2000. Production of neurotrophins by activated T cells: implications for neuroprotective autoimmunity. *J. Autoimmun.* 15(3):331-345.
7. Moalem, G., Leibowitz-Amit, R., Yoles, E., Mor, F., Cohen, I.R., Schwartz, M. 1999. Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat. Med.* 5(1):49-55.

8. Schmied, M., Breitschopf, H., Gold, R., Zischler, H., Rothe, G., Wekerle, H., Lassmann, H. 1993. Apoptosis of T lymphocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. Evidence for programmed cell death as a mechanism to control inflammation in the brain. *Am. J. Pathol.* 143(2):446-452.
9. Shin, T., Kojima, T., Ishihara, Y., Matsumoto, Y. 1995. The subarachnoid space as a site for precursor T cell proliferation and effector T cell selection in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 56:171-178.
10. Tanuma, N., Kojima, T., Shin, T., Aikawa, Y., Kohji, T., Ishihara Y. and Matsumoto, Y., 1997. Competitive PCR quantification of pro- and anti-inflammatory cytokine mRNA in the central nervous system during autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 73(1-2): 197-206
11. Raine, C.S., Traugott, U. 1984. Experimental autoimmune demyelination. Chronic relapsing models and their therapeutic implications for multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 436: 33-51.
12. Rapalino, O., Lazarov-Spiegler, O., Agranov, E., Velan, GJ., Yoles, E., Fraidakis, M., Solomon, A., Gepstein, R., Katz, A., Belkin, M., Hadani, M., Schwartz, M. 1998. Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat. Med.* 4(7):814-821.