

6-OHDA로 유도된 파킨슨 증후군의 동물 모델에서 도파민성 신경세포의 손실과 미세아교세포 활성화 사이의 관계

이진숙¹, 이지용¹, 조원길¹, 양영철¹, 조병필^{1,2}

¹연세대학교 원주의과대학 해부학교실, ²라이프스타일 의학연구소

(2012년 12월 8일 접수, 2013년 1월 11일 수정접수, 2013년 1월 18일 게재승인, Published Online 30 March 2013)

간추림 : 본 연구는 6-OHDA로 유도된 파킨슨증후군 동물 모델에서 활성화된 미세아교세포의 형태학적 특징 및 면역학적 표현형의 변화와 도파민성 신경세포와의 병리역학적 관계를 확인해 보고자 하였다. 오른쪽 안쪽 앞 뇌다발에 6-OHDA를 주입하여 흑색질 치밀부에 있는 도파민성 신경세포의 변성을 유도하였다. 동물모델을 6-OHDA 주입 후 1주, 2주, 4주 그리고 8주에 각각 희생시켰다. 활성화된 미세아교세포의 기능적 활성화의 변화를 확인하기 위하여 미세아교세포의 포식작용 표지자인 ED1과 쥐 활성화미세아교세포 특이적 표지자인 OX6을 사용하여 면역조직화학법 염색을 수행하였다. 활성화된 미세아교세포는 6-OHDA 주입 후 1주에 흑색질 치밀부에 있는 변성된 세포돌기 그리고 도파민성 신경세포의 세포체 등에 선택적으로 부착되어 있는 것을 확인할 수 있었고 이어서 흑색질 치밀부의 도파민성 신경세포와 신경섬유의 뚜렷한 손실을 나타내었다. 포식단계의 활성화된 미세아교세포는 6-OHDA 주입 후 2주에 가장 뚜렷하게 나타났고 시간이 지남에 따라 점진적으로 줄어들었지만 6-OHDA 주입 후 8주까지 남아 있는 것을 확인하였다. 또한 이는 흑색질 치밀부에 있는 도파민성 신경세포 수 계측의 결과와 일치함을 보였다. 이와 같은 결과는 미세아교세포의 활성화는 도파민성 신경세포의 변성 과정에 영향을 주어 도파민성 신경세포의 손실을 촉진하며 지속적으로 신경세포사를 이끈다는 것을 시사한다.

찾아보기 낱말 : 파킨슨증후군, 6-hydroxydopamine, 도파민성 신경세포, 미세아교세포

서 론

파킨슨씨병(Parkinson's disease)은 중간뇌 흑색질 치밀부(substantia nigra pars compacta, SNc)에 위치하는 도파민성 신경세포(dopaminergic neuron)의 사멸로 인한 심각한 수적 감소가 주요 병리학적 소견이다[1-3]. 파킨슨씨병은 미국의 경우 수백만 명의 환자가 있으며 매년 십만 명당 20명의 새로운 환자가 보고되고 있고, 우리나라의 경우 파킨슨씨병에 대한 사회적 인식이 매우 낮아 정확한 통계자료는 없지만 약 70,000명 정도

가 이병을 앓고 있을 것으로 추정된다. 이 질환은 주로 40대 이후에 발생하며 나이가 많아짐에 따라 발병이 증가함을 보인다. 따라서 국내에서도 인구 노령화에 따른 파킨슨씨병 환자가 더욱 증가할 것으로 예상되며 이에 따른 사회적 관심과 연구도 점차 이루어지고 있다.

파킨슨씨병의 원인은 parkin 유전자의 돌연변이 등 일부를 제외하면 잘 알려져 있지 않으며, 주로 환경적인 요인으로 촉발되는 oxidative stress가 주된 사멸기전으로 알려져 있다. 도파민성 신경세포 특이적 독소인 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)를 투여하면 MPTP의 대사산물인 MPP⁺는 사립체 전자전달계 중 complex I을 불활성화 시켜[4], 세포 내 ATP의 농도를 급격히 낮추는 oxidative stress를 유발한다고 알려져 있다[5]. Oxidative stress는 신경퇴행성 변화에 수반되는 사건 중의 하나이지만 이것이 신경세포사를 촉발시키는 직접적인 원인인지 아니면 신경세포사의

*이 연구는 2010년도 한국연구재단의 일반연구자 지원사업(과제번호 2010-0016650) 지원을 받아 수행한 것임.

저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.

저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.

교신저자: 조병필 (연세대학교 원주의과대학 해부학교실; 라이프스타일 의학연구소)

전자우편: bpcho@yonsei.ac.kr

과정으로 일어난 결과인지는 불분명하며 파킨슨씨병에서 초기 SNc 내 oxidative stress가 증가하는 것은 신경세포보다는 미세아교세포를 포함하는 신경아교세포 성분 때문일 가능성도 제기되어 있다[6]. 그래서 몇몇 역학조사에 의하면 어린 시절 외상성 뇌손상을 경험하였거나[7] 또는 뇌손상을 유발할 수 있는 특정 바이러스 및 다른 감염인자에 노출되었을 경우[8], 나중에 파킨슨씨병이 발병할 가능성이 높다고 한다. 이러한 사실은 선행된 뇌 염증으로 인한 미세아교세포의 활성화가 일련의 연쇄반응을 촉발하여 도파민성 신경세포의 점진적 사멸을 유도하는 하나의 위험인자로 작용할 수 있음을 나타낸다[9]. 또한 뇌 주요 부분의 미세아교세포 밀도와 형태는 균일하지 않지만 설치류 뇌에서 SNc에 가장 높은 밀도의 미세아교세포가 분포한다고 알려져 있기 때문에[10] SNc 내의 도파민성 신경세포들은 다른 부분의 신경세포들에 비해 미세아교세포에서 유래하는 특정 인자에 쉽게 영향을 받는 것으로 생각된다. 위와 같은 발견들은 역시 초기 단계의 파킨슨씨병 발병기전에서 활성미세아교세포가 어떤 역할을 할 것을 암시한다[11]. SNc 도파민성 신경세포의 선택적이고 점진적인 사멸 외에도 SNc 내 활성미세아교세포의 국소적 축적이 파킨슨씨병 환자 뇌의 주요 병리학적 소견 중의 하나이다[6,12]. 최근에는 파킨슨씨병 환자의 줄무늬체(striatum)와 SNc에 활성미세아교세포의 반응이 증가함이 활성미세아교세포에 대한 특정 리간드인 ^{11}C -PK11195를 이용한 *in vivo* 양전자 방사 단층 촬영(positron emission tomography, PET) 이미지화로 밝혀짐으로써 염증반응이 점진적 도파민성 신경세포 변성의 주요 인자임이 생체에서도 확인되었다. 또한 미세아교세포의 활성화는 MPTP 투여[13,14]나 안쪽앞뇌다발(medial forebrain bundle, MFB) 절단으로[15] 유도된 파킨슨씨병 동물모델에서도 확인되었다. 파킨슨씨병 환자의 뇌와 파킨슨씨병 동물모델에서 다수의 활성미세아교세포가 일정하게 출현한다는 사실은 활성미세아교세포가 파킨슨씨병의 발병과 진행에 중요한 역할을 담당함을 암시한다. 또한 활성미세아교세포의 다른 중요한 역할은 퇴행성인 신경세포를 인식하여 포식작용을 통해 제거하는 것이다. 미세아교세포는 중추신경계의 유일한 면역세포로서 신경세포사와 밀접한 관련을 맺고 있으며, 따라서 신경세포사에 동반되는 미세아교세포의 병리역학적 반응을 정확하게 이해하는 것은 생체에서 신경세포사의 발병과 진행뿐 아니라 신경보호 효과를 보이는 약물들의 작용기전을 이해하는 데에도 중요하다. 그럼에도 불구하고 신경퇴행성 변화에 대한 활성미세

아교세포의 병리역학적 반응과 신경세포-미세아교세포 사이의 상호작용 및 활성미세아교세포에 의한 퇴행성인 신경세포의 포식기전은 일부 말초신경 절단 후에 일어나는 중추 신경핵의 변성과 관련된 연구[16,17]에서 얻어진 결과를 제외하면 별로 알려진 바가 없다. 최근 중추신경계통에서 신경세포사와 관련된 미세아교세포의 역할에 대한 관심이 증가하고 있으며, minocycline[18,19], ibuprofen[20], 그리고 naloxone[21]과 같은 일부 항염증 약물이 미세아교세포의 여러 활성을 억제함으로써 파킨슨씨병을 비롯한 일부 퇴행성뇌질환 동물 모델에서 신경세포 보호효과를 보인다는 증거들이 보고되고 있다.

파킨슨씨병 동물 모델로는 최근에 발표된 rotenone[22] 주입법을 제외하면 catecholamine 신경세포 특이적 신경독소인 6-hydroxydopamine (6-OHDA)[23]과 MPTP[24] 투여 및 안쪽앞뇌다발(MFB) 절단[25] 등이 주로 이용되어 왔다. 6-OHDA는 catecholamine 신경독소로서 도파민성 및 노르아드레날린 신경세포의 세포체와 신경 섬유로 수송되어 신경종말과 신경세포체의 변성을 야기한다. 이러한 변화는 세포질 내 free calcium에 의해 증폭된 강력한 oxidative stress와 세포질 내 ATP의 감소로 이어져 결국 세포사를 일으킨다. 6-OHDA는 도파민성 및 노르아드레날린 신경세포에 모두 신경독성 효과를 보이지만 desipramine과 같은 noradrenaline transporter blocker와 함께 투여하면 도파민성 신경세포에 대해서만 선택적으로 신경독성을 나타내어 idiopathic 파킨슨씨병과 매우 유사한 동물모델을 제작할 수 있다. 최근에 6-OHDA 투여 파킨슨씨병 쥐 모델에서 미세아교세포의 수와 OX42 (anti-rat CR3) 면역반응성이 줄무늬체와 SNc에서 증가함이 보고되었다[14]. 그러나 OX42는 휴지미세아교세포(resting microglia)에서도 발현되고 특히 OX42의 활성 증가는 포식성의 증가와는 관련이 없음을 저자는 MFB axotomy 모델에서 확인한 바 있다[26]. 6-OHDA와 더불어 MPTP가 여러 파킨슨씨병 연구에 많이 이용되어 왔으나 MPTP의 효과는 여러 가지 요인(mouse 품종, 나이, 온도, 계절)에 의하여 큰 영향을 받는다고 알려져 있기 때문에 미세아교세포의 활성화 정도도 다양한 변이를 보일 것으로 생각된다. 그러나 6-OHDA를 쥐에 투여하면 농도와 주어진 time point에 따라 거의 일정한 정도로 SNc 도파민성 신경세포의 사멸이 유도되고, 이에 따라 미세아교세포의 활성화도 일정한 양상을 나타낼 것으로 기대된다. 미세아교세포는 신경퇴행성 기전에 중요한 역할을 담당하는 세포이고 6-OHDA는 파킨슨씨병 동물모델 제작에 광범위하게 사

용되고 있는 약물이므로 6-OHDA 투여 후 미세아교세포의 활성화, 면역학적 표현형의 변화, 퇴행중인 도파민성 신경세포와의 병리역학적 관계 등에 대해 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 Sparague-Dawley 계의 수컷 흰쥐 (250 ~ 300 g)를 사용하였다. 모든 동물은 실내온도는 20 ~ 24 °C로 명암주기는 12시간 간격으로 일정하게 유지되게 하고 물과 사료는 자유로이 먹게 하여 사육하였다.

2. 파킨슨씨병 동물모델

6-OHDA (Sigma, St. Louis, USA)에 의한 독성이 도파민성신경세포에만 영향을 줄 수 있도록 noradrenalin transporter blocker인 desipramine (12.5 mg/kg; Sigma, St. Louis, USA)을 6-OHDA를 주입하기 30분전 실험동물에 복강으로 주입하였다. Ketamine (40 mg/kg)과 xylazine (5 mg/kg) 혼합액을 복강주사하여 실험동물을 깊은 마취상태에 들게 한 후, 뇌정위장치(Stoelting Co., Illinois, USA)에 고정하고 머리의 피부를 절개하여 머리뼈를 노출시킨 후 정수리점을 확인하고 이를 기점으로 뒤쪽으로 3.8 mm, 오른쪽으로 1.5 mm 이동된 지점에 치과용 드릴을 이용하여 작은 구멍을 뚫었다. 구멍을 통해 배쪽으로 7.8 mm 지점까지 26-gauge needle을 삽입하여 오른쪽 안쪽앞뇌다발(medial forebrain bundle; MFB)에 위치하도록 하였다. 10 µL의 Hamilton syringe를 이용하여 6-OHDA 4 µL (5.0 µg/µL)를 Infusion pump (kd Scientific Co., USA)를 이용하여 1 µL/min의 속력으로 주입하고 주입이 완료된 후 2분을 더 기다렸다가 Hamilton syringe를 제거하고 피부를 봉합하였다. 왼쪽은 내부대조군(internal control)으로 사용하기 위하여 아무것도 주입하지 않았다.

3. 조직절편 제작

실험동물을 Ketamine (70 mg/kg)과 xylazine (8 mg/kg) 혼합액으로 마취한 뒤 심장을 통해 4% paraformaldehyde (in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)로 관류 고정하여 뇌조직을 적출한 후 동일한 고정액에 담가 4°C에서 2시간 동안 후고정하고 30% sucrose 용액에 하룻밤 침적시켜 -60°C isopentan으로 동결시킨 다음 cryo-cut

(Thermo Shandon, Germany)을 이용하여 40 µm 두께의 연속관상절편을 제작하여 12개의 tissue well에 차례로 분배하고 따라서 하나의 well에 있는 각 조직절편은 480 µm씩 규칙적으로 떨어져 있고, 각각의 tissue well은 조직 전체의 특성을 동일하게 반영하도록 하였다.

4. 면역조직화학법

조직절편을 0.1% Triton X-100이 포함된 0.1 M PBS (PBST, pH 7.4)로 수세한 후 3% 과산화수소로 15분간 처리하여 내재성 과산화효소의 활성을 방지하였고 다시 PBST로 세 차례 수세한 후 2차 항체가 만들어진 동종의 5% normal serum을 1시간 처리하여 비특이 면역반응을 방지하고 1차 항체를 25°C에서 12시간 동안 반응시켰다. 본 실험에서 사용된 1차 항체는 tyrosine hydroxylase (rabbit, TH, Chemicon, USA; 1 : 500)을 사용하였고, 1차 항체 반응을 마친 표본을 PBST로 세 차례 수세한 후 각 1차 항체에 대응되는 biotinylated anti-rabbit immunoglobulin G (Vector, USA)를 1:200의 비율로 희석하여 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 그 후 PBST로 세 차례 수세하고 avidin-biotin-peroxidase complex (Vector, USA)를 1시간 동안 반응시킨 후 0.01% 과산화수소를 포함하는 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma, USA)로 3 ~ 5분간 발색하였다. 또한 다중 면역조직화학적 염색을 위해서 다시 PBS로 여러 차례 수세한 후 5% normal serum을 이용한 비특이 면역반응 방지 단계부터 동일한 방법으로 과정을 수행하였고, 1차 항체는 OX6 (mouse, Serotec, Oxford, UK; 1 : 500) 또는 ED1 (mouse, Serotec, Oxford, UK; 1 : 500)을 2차 항체는 biotinylated anti-mouse immunoglobulin G (Vector, USA)를 사용하였다. 그리고 표지하고자 하는 단백질이나 세포의 색이 구별되도록 후자에서는 DAB-Ni를 사용하여 발색하였고 일련의 알코올 탈수과정을 거치고 xylene으로 투명화 한 후 Permount를 이용하여 봉입하였다.

5. 형태정량적 분석

첫 번째와 일곱 번째 well의 모든 절편을 염색하여 조직절편들을 순서대로 slide glass에 부착시켰다. 이 모든 절편에서 TH 면역염색에 양성 반응을 보이는 도파민성 신경세포의 수를 독일 Soft-Imaging Software GmbH사의 영상 분석 프로그램인 analysis 2.1을 이용하여 계측하고 평균값을 그래프로 나타내었다. 형태계측에 사용된 표본의 수는 각 time point당 5마리의 표본

을 사용하였다.

6. 통계분석

통계분석은 Prism 5 소프트웨어 (GraphPad software Inc., USA)를 사용하여 *t-test*를 거친 후 one-way ANOVA 방법으로 평가하였으며 *p* 값이 0.05 이하일 경우 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

1. MFB와 SNc에서 시간에 따른 활성미세아교세포의 양상

시간에 따른 활성미세아교세포의 정도를 관찰하기 위해 안쪽앞뇌다발(MFB)과 SNc의 앞쪽부분(rostral part),

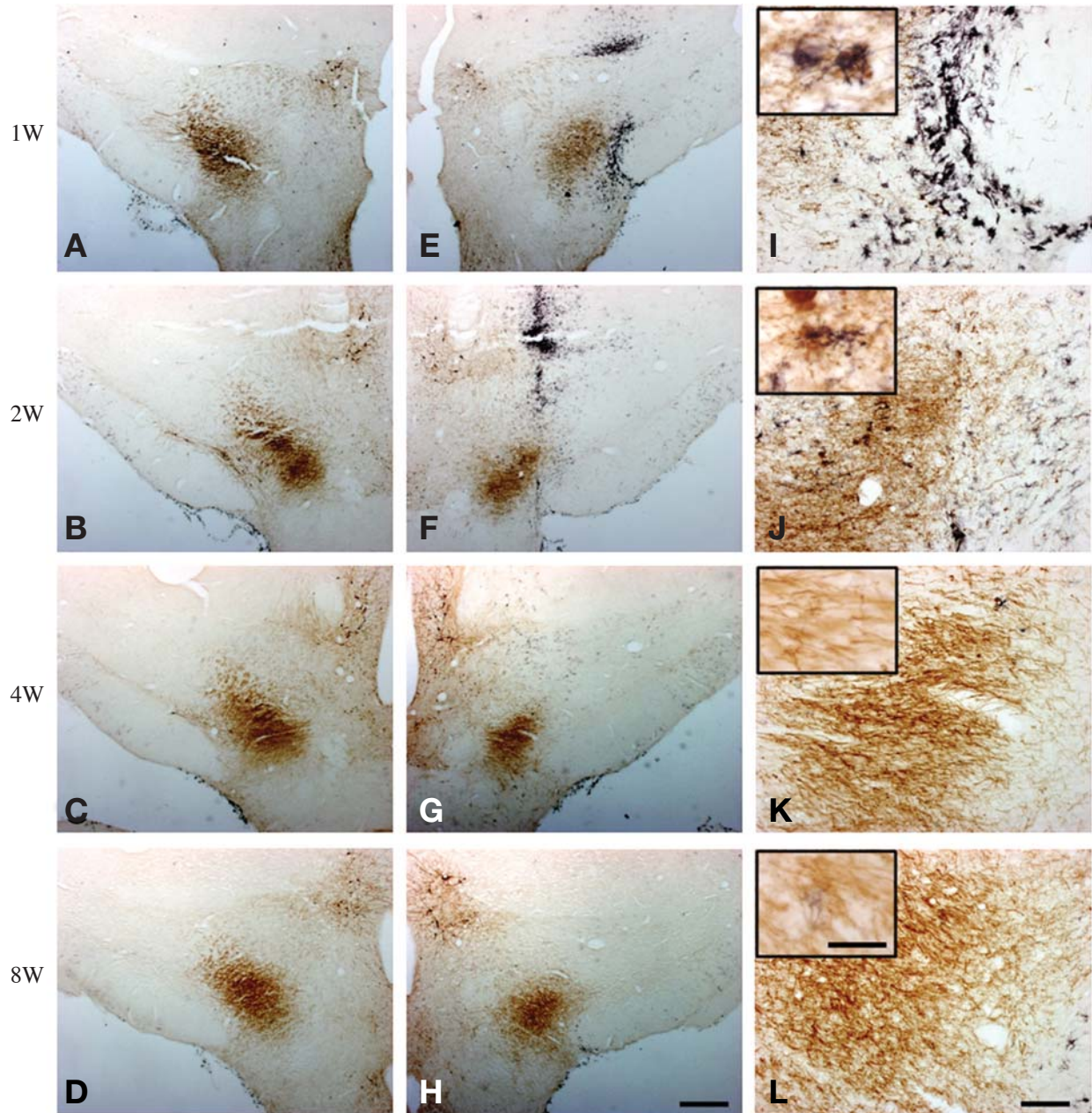


Fig. 1. Double immunohistochemistry of TH (brown) and OX6 (black) in coronal sections passing through the MFB middle to the lesioned site. (A~D) contralateral; (E~H) ipsilateral; (I~L) higher magnifications. The number of OX6-ir microglia increases to peak level at 1 week post lesion and then decrease gradually by 4 weeks post lesions. Scale bar represent 500 μ m in (H) and 100 μ m in (L), inset of (L)=25 μ m.

뒤쪽부분(caudal part)을 면역조직화화법을 통해 각각 관찰하였다. 먼저 안쪽앞뇌다발(MFB) 부분을 살펴보면 6-OHDA 주입 후 1주와 2주에서 동측(ipsilateral)에 활성화된 미세아교세포 표지자인 OX6에 면역 반응을 보이는 미세아교세포가 많이 증가된 것을 확인할 수 있었고 6-OHDA 주입 후 4주 이후로는 급격히 감소하는 것

을 확인하였다(Fig. 1). SNc의 앞쪽부분은 동측의 도파민성 신경세포가 죽어 가고 있는 자리에 OX6에 면역 반응을 보이는 활성화된 미세아교세포가 도파민성 신경세포에 부착되어 있는 것을 확인할 수 있었고(상단에 고배율 사진 삽입) 특히 6-OHDA 주입 후 1주와 2주에서 가장 많은 활성화된 미세아교세포를 확인할 수 있었다. 또한 6-

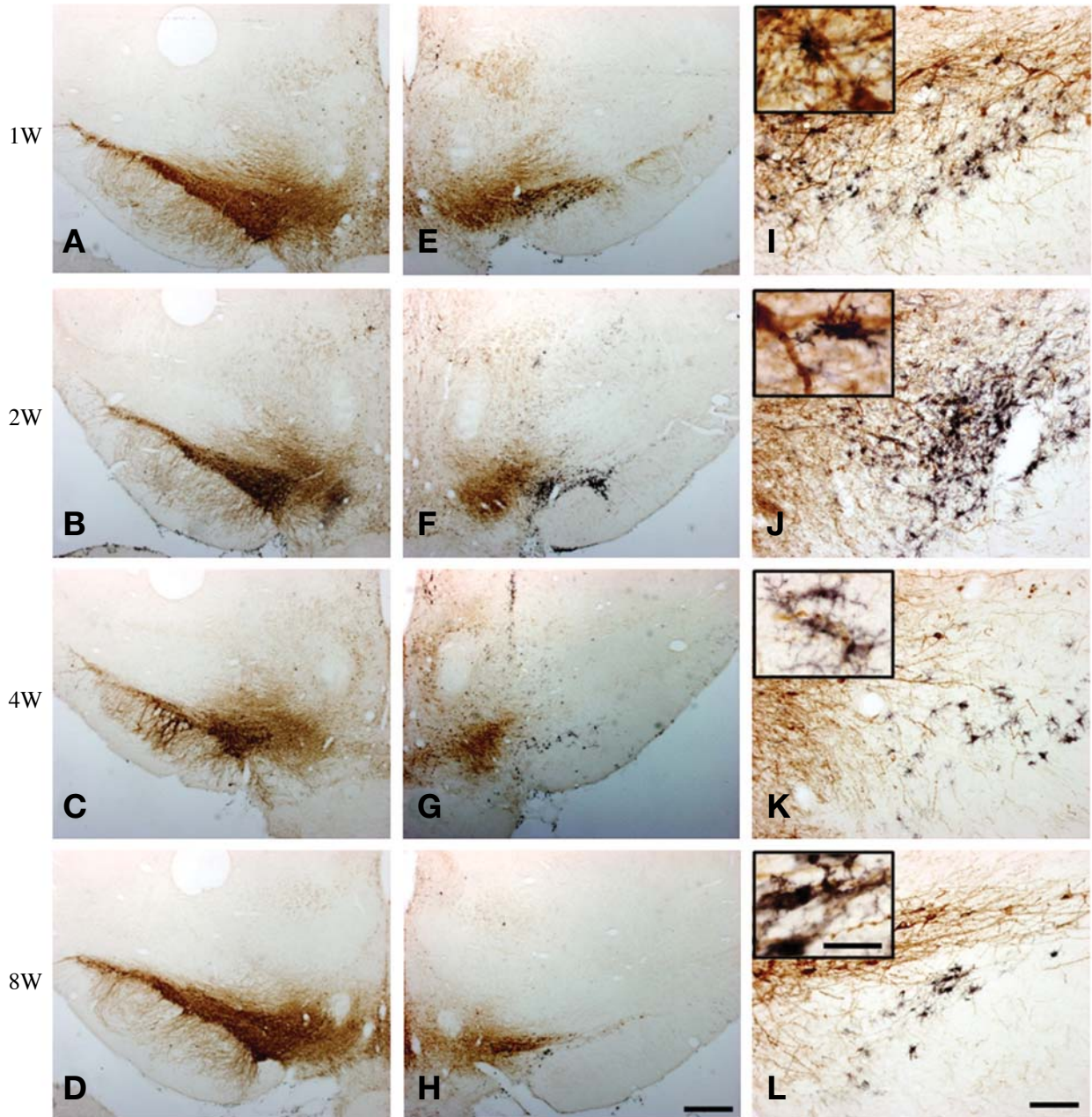


Fig. 2. Double immunohistochemistry of TH (brown) and OX6 (black) in coronal sections passing through the rostral part of SN. (A~D) contralateral; (E~H) ipsilateral; (I~L) higher magnifications. The great number of OX6-ir microglia are crowded in the ipsilateral SN between 1 and 2 weeks post lesion and then the microglial reaction subsides gradually by 4 weeks post lesions. Scale bar represent 500 μ m in (H) and 100 μ m in (L), inset of (L)=25 μ m.

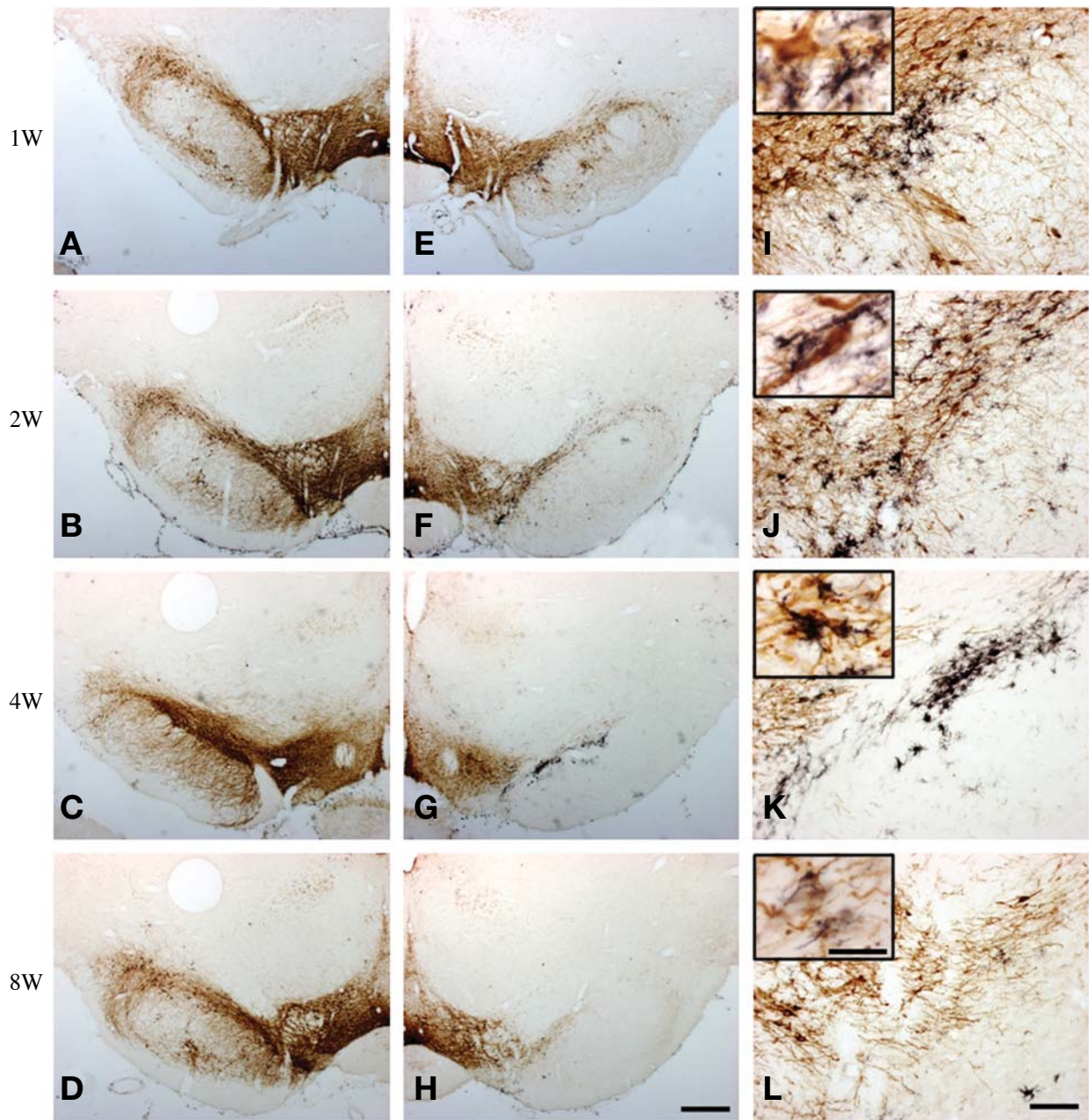


Fig. 3. Double immunohistochemistry of TH (brown) and OX6 (black) in coronal sections passing through the caudal part of SN. (A~D) contralateral; (E~H) ipsilateral; (I~L) higher magnifications. The great number of OX6-ir microglia are crowded in the ipsilateral SN between 2 and 4 weeks post lesion and then the microglial reaction subsides gradually by 8 weeks post lesions. Scale bar represent 500 μ m in (H) and 100 μ m in (L), inset of (L)=25 μ m.

OHDA 주입 후 4주 이후로는 활성화된 미세아교세포가 급격히 감소하였지만 8주까지 지속적으로 남아있는 것을 관찰하였다(Fig. 2). SNc의 뒤쪽부분은 앞쪽부분과 다르게 6-OHDA 주입 후 1주부터 4주까지 활성화된 미세아교세포가 증가된 것을 확인할 수 있었고 6-OHDA 주입 후 8주에서는 거의 사라지고 없는 것을 확인하였

다(Fig. 3). 이곳에서도 활성화된 미세아교세포가 도파민성 신경세포에 부착되어 있는 것을 확인할 수 있었다(상단에 고배율 사진 삽입) 그리고 반대측(contralateral)의 안쪽앞뇌다발(MFB)과 SNc에서는 OX6에 면역 반응을 보이는 미세아교세포가 전혀 나타나지 않았다.

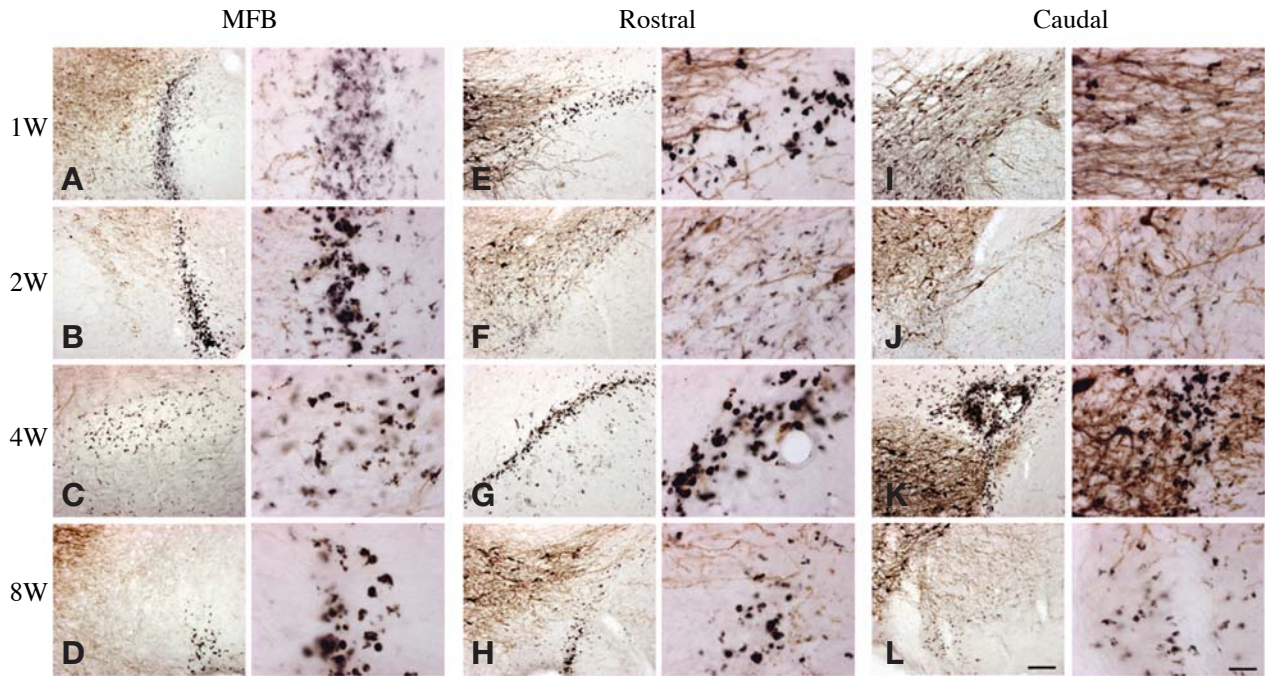


Fig. 4. Double immunohistochemistry of TH (brown) and ED1 (black) in the ipsilateral MFB or SN. (A~D) MFB middle level; (E~H) rostral part of SN; (I~L) caudal part of SN. Left panel of each group: lower magnification of the ipsilateral, scale bar represent 100 μ m in (L). Right panel of each group: higher magnification of the corresponding left panel, scale bar=25 μ m.

2. MFB와 SNc에서 시간에 따른 활성미세아교세포의 포식작용

시간에 따른 미세아교세포의 포식능을 관찰하기 위해 안쪽앞뇌다발(MFB)과 SNc의 앞쪽부분(rostral part), 뒤쪽부분(caudal part)을 면역조직화화법을 통해 각각 관찰하였다. 동측에 활성화된 미세아교세포의 포식능을 알아볼 수 있는 용해소체 효소 표지자인 ED1에 면역 반응을 보이는 미세아교세포는 안쪽앞뇌다발(MFB)에서는 6-OHDA 주입 후 1주와 2주에서 가장 많이 나타났고 8 주까지도 일부 남아 있었다(Fig. 4A-D). 그러나 SNc의 앞쪽부분(Fig. 4E-H)과 뒤쪽부분(Fig. 4I-L)은 6-OHDA 주입 후 1주에서 나타나기 시작하여 4주에서 가장 많이 나타났다.

3. SNc에서 시간에 따른 도파민성 신경세포의 수

SNc에서 TH 면역반응에 양성을 나타내는 도파민성 신경세포 수를 계측하고 각 time point당 5마리의 평균 값을 그래프로 나타내었다. 6-OHDA 주입 후 각각의 주수 별로 반대측과 비교하여 동측의 도파민성 신경세포 수가 1주에서는 32%, 2주에서는 60%, 4주에서는 69%, 8주에서는 72%가 감소하였다. 또한 반대측과 비

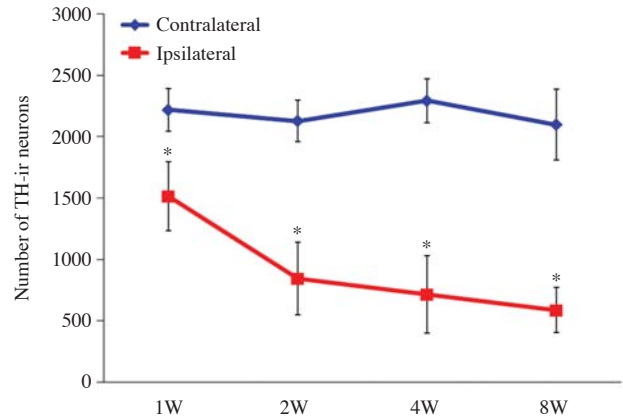


Fig. 5. Changes in the number of TH-ir neurons of the SN following unilateral injection of 6-OHDA into the MFB. Animals were killed at the indicated time points and immunostaining was carried out with TH antibody and TH positive neurons in SNc were counted. The data are displayed as the mean \pm SEM. * p < 0.05.

교하여 동측의 도파민성 신경세포 수가 통계적으로 유의함을 나타내었다. 6-OHDA 주입 후 2주에서 도파민성 신경세포 수가 가장 급격히 감소하였고 8주까지 지속적으로 감소하는 것을 보여주었다(Fig. 5).

고 찰

6-OHDA 투여는 세포사를 유발하는 최초의 원인이 약간씩 다르더라도 파킨슨씨병 환자에서 만성적이고 점진적으로 진행되는 도파민성 신경세포의 퇴행에 동반되는 미세아교세포의 반응은 비슷한 것이라 여겨진다. 또한 6-OHDA 투여 후 미세아교세포에서 MHC class I 및 II가 증가한다고 알려져 있지만 [27], 6-OHDA의 신경독성으로 사멸하는 도파민성 신경세포와 이를 포식하는 활성미세아교세포 사이의 세포역학적 관계는 밝혀져 있지 않았다. 본 연구에서 6-OHDA 투여 시 쥐 미세아교세포의 포식작용 표지자(rat microglial phagocytic marker)인 ED1 (anti-rat lysosomal enzyme)에 강한 양성반응을 보이는 포식성 미세아교세포와 쥐 활성미세아교세포 특이적 표지자인 OX6 (anti-rat MHC class II)에 강한 양성반응을 보이는 활성미세아교세포가 특이적으로 SNc 도파민성 신경세포에 부착함을 확인하였다. 또한 이전의 실험에서 대조군으로 PBS를 주입한 군에서는 시간에 관계없이 활성화된 미세아교세포를 확인할 수 없었다. 이는 뇌 속으로 직접 바늘을 주입하는 방법에서 오는 자극과 손상은 아주 미비하여 미세아교세포를 활성화 시키지 못하거나 있더라도 어떤 영향을 주지 못하고 사라지는 것으로 보이며 본 연구방법에서 보이는 활성화된 미세아교세포는 6-OHDA 투여에 따른 도파민성 신경세포의 손상으로 인해 나타나는 것으로 보인다.

활성화된 미세아교세포는 interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α), nitric oxide (NO), arachidonic acid metabolites, quinolinic acid 등의 pro-inflammatory cytokine 또는 세포독성 인자를 분비함으로써 oxidative stress를 포함하는 신경퇴행성 과정에 기여할 것이라 보고되어 있다 [28-30]. 그러나 최근에 catecholamine 특이적 신경독소인 6-OHDA를 투여한 파킨슨씨병 쥐 모델에서 IL-1 α 및 IL-1 β mRNA는 증가하지만 단백질 수준에서는 IL-1 α 및 IL-1 β 가 발현되지 않고, TNF- α mRNA는 거의 또는 전혀 발현되지 않는 것으로 보아 만성신경세포사(chronic neuronal death) 그 자체는 이러한 pro-inflammatory cytokine의 분비를 유도하지 않는다고 보고되었다 [31]. 본 연구자 역시 파킨슨씨병 동물모델의 하나인 안쪽앞뇌다발(MFB) 절단 모델에서 미세아교세포가 크게 활성화되어 활발한 포식작용을 수행하고 있음에도 불구하고 IL-1 β , iNOS 및 TNF- α 가 mRNA 및 단백질 수준에서 그 발현이 증가하지 않음을 밝힌 바 있다 [26]. 이 같은 결과는 미세아교세포가 느린 퇴행성

변화과정을 통해 사멸하는 신경세포를 IL-1 β 나 NO와 같은 pro-inflammatory cytokine에 의한 세포독성 효과 없이 포식함을 나타낸다.

반면, 활성화된 미세아교세포는 reactive oxygen species (ROS)의 생성을 조절하여 신경세포사에 관여한다고 보고되어 있다 [32]. 기존의 여러 in vitro 실험에서 활성화된 말초면역세포는 Nox gene의 발현을 증가시키며, 발현된 Nox는 수 분내에 다량의 superoxide 생성을 유도함이 잘 알려져 있었다 [33]. 최근 중추신경계 내에서도 Nox가 활성화된 미세아교세포에서 발현되며, 그 결과 ROS의 생성이 유도되어 주변 신경세포의 생존에 부정적인 영향을 줄 수 있다고 제안하였다 [34]. 이와는 반대로 활성화된 미세아교세포는 또한 Cu/SnSOD 및 MnSOD와 같이 antioxidant로 작용하는 유전자의 발현을 촉진시켜 상해 조직 주변에 생성된 superoxide를 제거해 줌으로서 신경세포의 생존에 긍정적인 영향을 줄 수 있다는 주장이 서로 대립되고 있다 [35]. 따라서 미세아교세포는 주변 환경의 미세변화에 따라 신경세포보호자로도 혹은 신경세포파괴자로도 작동할 수 있으며, 이와 관련되어 ROS의 생성 및 제거 기전이 매우 중요한 것으로 여겨진다.

최근 우리는 파킨슨씨병 동물모델 중 하나인 안쪽앞뇌다발(MFB) 절단모델에서 다중면역조직화학적 기법을 이용하여 퇴행성 변화의 아주 초기 단계부터 수많은 활성미세아교세포가 퇴행중인 도파민성 신경세포에 특이적으로 부착하여 지속적으로 조각조각(piece by piece) 포식함을 규명하였다 [36]. 이는 퇴행중인 도파민성 신경세포가 신경변성 시작단계부터 활성미세아교세포에 의해 부착된 채 부분적인 포식을 당하며 세포자멸사 과정을 통해 사멸하고, 미세아교세포는 세포자멸사 전 과정에 걸쳐 밀접하게 관여하고 있음을 증명한 연구이다 [36,37]. 미세아교세포는 동시 다발적이고도 지속적인 포식작용을 통해 초기부터 매우 적극적으로 신경세포사에 관여할 것으로 여겨지며, 한번 활성화된 미세아교세포의 포식작용은 꽤 긴 시간 동안 지속된다는 것도 알 수 있었으며 이러한 미세아교세포의 포식능은 신경세포 사멸에 많은 영향을 끼칠 수 있다는 점을 암시한다. 따라서 우리의 결과는 도파민성 신경세포가 스스로 혹은 신경영양인자와 같은 물질의 투여로 회복 가능한 (recoverable) 상태에 있는 신경변성의 초기단계에 미세아교세포의 활성을 억제한다면, 신경세포사의 지연 또는 신경세포 보호 효과를 얻을 수 있음을 시사한다. 더 나아가 미세아교세포의 활성을 억제하는 것이 도파민성 신경세포사를 지연시키거나 신경보호 효과를 보인다면

이는 상이한 원인으로 유발된 여러 파킨슨씨병 유형에 공통적으로 적용할 수 있는 치료법이 될 수 있을 것으로 보여진다.

참 고 문 헌

1. Beal MF. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* 1995; 38:357-66.
2. Jenner P. Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov Disord* 1998; 13 Suppl 1:24-34.
3. Gerlach M, Ben-Shachar D, Riederer P, Youdim M. Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *J Neurochem* 2002; 63:793-807.
4. Saporito MS, Heikkila RE, Youngster SK, Nicklas WJ, Geller HM. Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium analogs in cultured neurons: relationship to the dopamine uptake system and inhibition of mitochondrial respiration. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1992; 260:1400-9.
5. Cassarino DS, Fall CP, Swerdlow RH, Smith TS, Halvorsen EM, Miller SW, et al. Elevated reactive oxygen species and antioxidant enzyme activities in animal and cellular models of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1362: 77-86.
6. Foley P, Riederer P. Influence of neurotoxins and oxidative stress on the onset and progression of Parkinson's disease. *J Neurol* 2000; 247:1182-94.
7. Factor SA, Sanchez-Ramos J, Weiner WJ. Trauma as an etiology of parkinsonism: a historical review of the concept. *Mov Disord* 2004; 3:30-6.
8. Ling Z, Gayle DA, Ma SY, Lipton JW, Tong CW, Hong JS, et al. In utero bacterial endotoxin exposure causes loss of tyrosine hydroxylase neurons in the postnatal rat mid-brain. *Mov Disord* 2002; 17:116-24.
9. McGeer P, Itagaki S, Boyes B, McGeer E. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 1988; 38:1285-85.
10. Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 1990; 39:151-70.
11. Kim WG, Mohny RP, Wilson B, Jeohn GH, Liu B, Hong JS. Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci* 2000; 20:6309-16.
12. Knott C, Stern G, Wilkin GP. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Mol Cell Neurosci* 2000; 16:724-39.
13. Cicchetti F, Brownell A, Williams K, Chen Y, Livni E, Isacson O. Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. *Eur J Neurosci* 2002; 15:991-98.
14. O'Callaghan JP, Miller DB, Reinhard JF. Characterization of the origins of astrocyte response to injury using the dopaminergic neurotoxicant, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Brain Res* 1990; 521:73-80.
15. Kurkowska-Jastrzebska I, Wronska A, Kohutnicka M, Czl-onkowski A, Czl-onkowska A. The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. *Exp Neurol* 1999; 156:50-61.
16. Graeber M, Streit W, Kreutzberg G. Axotomy of the rat facial nerve leads to increased CR3 complement receptor expression by activated microglial cells. *J Neurosci Res* 2004; 21:18-24.
17. Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW. Functional plasticity of microglia: a review. *Glia* 2004; 1:301-07.
18. Du Y, Ma Z, Lin S, Dodel RC, Gao F, Bales KR, et al. Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:14669-74.
19. Thomas M, Le WD. Minocycline: neuroprotective mechanisms in Parkinson's disease. *Curr Pharm Des* 2004; 10:679-86.
20. Park EM, Cho BP, Volpe BT, Cruz MO, Joh TH, Cho S. Ibuprofen protects ischemia-induced neuronal injury via up-regulating interleukin-1 receptor antagonist expression. *Neuroscience* 2005; 132:625-31.
21. Liu B, Du LN, Hong JS. Naloxone protects rat dopaminergic neurons against inflammatory damage through inhibition of microglia activation and superoxide generation. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293:607-17.
22. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2000; 3:1301-6.
23. Kostrzewa RM, Jacobowitz DM. Pharmacological actions of 6-hydroxydopamine. *Pharmacol Rev* 1974; 26:199-288.
24. Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, et al. Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res* 1979; 1:249-54.
25. Tseng JL, Baetge EE, Zurn AD, Aebischer P. GDNF reduces drug-induced rotational behavior after medial forebrain bundle transection by a mechanism not involving striatal dopamine. *J Neurosci* 1997; 17:325-33.
26. Sugama S, Cho BP, Degiorgio LA, Shimizu Y, Kim SS, Kim YS, et al. Temporal and sequential analysis of microglia in

- the substantia nigra following medial forebrain bundle axotomy in rat. *Neuroscience* 2003; 116:925-33.
27. Akiyama H, McGeer PL. Microglial response to 6-hydroxydopamine-induced substantia nigra lesions. *Brain Res* 1989; 489:247-53.
28. Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Peterson PK. Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol* 1992; 149:2736-41.
29. Rogove AD, Tsirka SE. Neurotoxic responses by microglia elicited by excitotoxic injury in the mouse hippocampus. *Curr Biol* 1998; 8:19-25.
30. Takeuchi A, Isobe K, Miyaishi O, Sawada M, Fan ZH, Nakashima I, et al. Microglial NO induces delayed neuronal death following acute injury in the striatum. *Eur J Neurosci* 2001; 10:1613-20.
31. Depino AM, Earl C, Kaczmarczyk E, Ferrari C, Besedovsky H, del Rey A, et al. Microglial activation with atypical pro-inflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 2003; 18:2731-42.
32. Rodriguez-Pallares J, Rey P, Parga JA, Munoz A, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. Brain angiotensin enhances dopaminergic cell death via microglial activation and NADPH-derived ROS. *Neurobiol Dis* 2008; 31:58-73.
33. Bokoch GM, Knaus UG. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *Trends Biochem Sci* 2003; 28:502-8.
34. Zekry D, Epperson TK, Krause KH. A role for NOX NADPH oxidases in Alzheimer's disease and other types of dementia? *IUBMB life* 2008; 55:307-13.
35. Lindenau J, Noack H, Possel H, Asayama K, Wolf G. Cellular distribution of superoxide dismutases in the rat CNS. *Glia* 2000; 29:25-34.
36. Cho BP, Song DY, Sugama S, Shin DH, Shimizu Y, Kim SS, et al. Pathological dynamics of activated microglia following medial forebrain bundle transection. *Glia* 2005; 53: 92-102.
37. Cho BP, Sugama S, Shin DH, DeGiorgio LA, Kim SS, Kim YS, et al. Microglial phagocytosis of dopamine neurons at early phases of apoptosis. *Cell Mol Neurobiol* 2003; 23:551-60.

Relationship between Microglial Activation and Dopaminergic Neuronal Loss in 6-OHDA-induced Parkinsonian Animal Model

Jin-Suk Lee¹, Ji-Yong Lee¹, Won-Gil Cho¹, Young-Chul Yang¹, Byung-Pil Cho^{1,2}

¹*Department of Anatomy, Yonsei University Wonju Collage of Medicine*

²*Institute of Lifestyle Medicine, Yonsei University Wonju College of Medicine*

Abstract : This study assessed the dynamics of morphological and immunophenotypic properties of activated microglia in a 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced Parkinsonian animal model. Neurodegeneration in the substantia nigra pars compacta (SNc) was induced by unilateral injection of 6-OHDA into the medial forebrain bundle. Parkinsonian animal model were sacrificed at 1, 2, 4 and 8 weeks after 6-OHDA injection. Changes in the functional activity of activated microglia were identified using different monoclonal antibodies: OX6 for major histocompatibility complex (MHC) class II, ED1 for phagocytic activity. Phagocytic microglia, characterized by ED1- or OX6-immunoreactivity, appeared in the SNc at 1 week after 6-OHDA injection, activated microglia selectively adhered to degenerating axons, dendrites and dopaminergic neuron somas in the SNc. This was followed by significant loss of these fibers and nigral dopaminergic neurons. Activation of microglia into phagocytic stage was most pronounced at 2 week after 6-OHDA injection and gradually subsided, but phagocytic microglia persisted until 8 weeks after 6-OHDA injection. Taken together, our results indicate that activated microglia is lead to persistently neuron cell death and promotes loss of dopaminergic neuron by degeneration of the dopaminergic neurons.

Keywords : Parkinsonian, 6-hydroxydopamine, Dopaminergic neuron, Microglia