

얼굴신경 절단으로 유도된  
얼굴신경운동핵의 퇴행성 변화에  
수반되는 미세아교세포의 활성화

연세대학교 대학원  
의 학 과  
박 병 구

얼굴신경 절단으로 유도된  
얼굴신경운동핵의 퇴행성 변화에  
수반되는 미세아교세포의 활성화

지도 조 병 필 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2005년 1월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

박 병 구

# 박병구의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2005년 1월 일

## 감사의 글

본 논문의 시작에서 마지막까지 세심한 지도와 격려로 이끌어주신 조병필 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 교수님의 지도로 학문의 폭을 넓힐 수 있는 많은 기회를 접할 수 있었습니다.

대학원 과정동안 알찬 결실을 맺도록 강의와 충고를 해주신 강호석 교수님과 최병영 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

부족한 논문을 심사해 주시고, 첨삭해 주신 정성우 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

대학원 생활하는데 있어 항상 격려와 도움을 주시고, 논문이 완성되기까지 많은 도움을 주신 박중철, 송대용, 이진숙 선생님과 항상 아껴주시고 실험기간 동안 도움을 주신 이인수, 박대성, 김영철 선생님께 깊이 감사드립니다.

그리고 항상 아낌없는 사랑과 인자하신 모습으로 보살펴 주시는 사랑하는 부모님께 감사의 마음을 전합니다.

저자 씀

# 차 례

그림 차례 .....	ii
표 차례 .....	ii
국문 요약 .....	iii
제1장 서론 .....	1
제2장 재료 및 방법 .....	4
2.1. 실험동물 및 왼쪽 얼굴신경 절단 .....	4
2.2. 면역조직화학염색 .....	4
2.3. 이중 면역형광법 .....	6
2.3.1. pc-Jun과 ATF3의 이중 면역형광염색 .....	6
2.3.2. ED1과 OX-6의 이중 면역형광염색 .....	7
2.4. 얼굴운동신경세포의 계수 .....	7
2.5. 자료 분석 .....	8
제3장 결과 .....	9
제4장 고찰 .....	20
제5장 결론 .....	25
참고 문헌 .....	26
영문 요약 .....	32

## 그림 차례

그림 1. Cresyl violet으로 염색된 얼굴신경운동핵. ....	11
그림 2. 얼굴신경 절단 후 얼굴신경운동핵 내 신경세포 수의 변화. ....	12
그림 3. 얼굴신경 절단 후 얼굴신경운동핵에서 pc-Jun의 발현. ....	14
그림 4. 얼굴신경 절단 후 얼굴신경운동핵에서 ATF3의 발현. ....	15
그림 5. 얼굴신경 절단 2주 후 얼굴신경운동핵에서 관찰된 pc-Jun과 ATF3의 발현. ....	16
그림 6. 얼굴신경 절단 후 얼굴신경운동핵에서의 OX-6 면역조직화학염색. ....	17
그림 7. 얼굴신경 절단 후 얼굴신경운동핵에서의 ED1 면역조직화학염색. ....	18
그림 8. 얼굴신경 절단 8주 후 얼굴신경운동핵에서 시행된 OX-6 와 ED1에 대한 이중 면역형광염색. ....	19

## 표 차례

표 1. 얼굴신경 절단 후 얼굴신경운동핵 내 신경세포 수의 변화 .....	13
---	----

## 국 문 요 약

### 얼굴신경 절단으로 유도된 얼굴신경운동핵의 퇴행성 변화에 수반되는 미세아교세포의 활성화

외상이나 중양 혹은 수술 등에 의해 발생할 수 있는 얼굴신경의 손상은 얼굴신경운동핵 내 신경세포의 퇴행성 변화를 일으킬 수 있다. 신경 손상에 따른 얼굴운동신경세포의 퇴행성 변화와 그 기전을 연구함에 있어서 얼굴신경절단 모델은 유용하게 사용된다. 특히 두개의 얼굴신경 절단을 시행할 경우 뇌-혈관 장벽의 손상 없이 신경아교세포의 반응을 연구할 수 있다는 장점이 있다. 본 실험의 목적은 두개골 밖에서 얼굴신경을 절단한 다음 얼굴운동신경세포의 퇴행성 변화와 그에 수반되는 activating transcription factor 3 (ATF3)와 phospho-c-Jun (pc-Jun)의 발현을 조사하여 이들 immediate early gene의 발현이 내포하는 기능적 의미를 추론하며, 신경세포사에 반응하여 활성화되는 미세아교세포의 기능적 역할을 면역조직화학적 방법으로 규명하는 것이다.

얼굴신경운동핵 내 신경세포의 수와 크기는 두개의 얼굴신경 절단 후 시간이 경과함에 따라 반대쪽에 비해 점진적으로 감소하였다. 얼굴운동신경세포의 수는 얼굴신경 절단 후 지속적으로 감소하여 16주와 24주에서는 반대쪽에 비해 각각 21.9%와 34.8%가 유의하게 감소하였다. 축삭 절단 후 초기에는 대다수의 얼굴운동신경세포 핵에서 ATF3와 pc-Jun이 발현되었지만, 흥미롭게도 얼굴신경 절단 8주 이후에는 매우 위축된 형태를 보이는 퇴행성 신경세포에서만 지속적으로 ATF3와 pc-Jun이 발현되었다. 신경 절단 후 2주까지는 포식 활성의 표지자로 알려진 ED1의 면역 활성이 주로 미세아교세포의 세포체와 세

포질돌기에 미세한 입자상으로 산재하였으며, 나중에는 phagosome으로 보이는 비교적 큰 구형의 입자들이 강한 ED1 면역반응성을 나타내었다. 신경 절단 후 초기에 ED1 면역반응세포의 수가 OX-6 면역반응세포 보다 훨씬 많은 것으로 보아 미세아교세포의 포식활성이 major histocompatibility complex II의 발현에 선행하는 것으로 생각되었다. 시간이 경과함에 따라 많은 활성 미세아교세포가 ED1과 OX-6에 모두 면역반응성을 나타내었고, 이들은 모두 굵은 세포질돌기를 가진 분지형 미세아교세포의 형태를 보였다. 이 분지형 활성 미세아교세포들은 얼굴운동신경세포를 밀접하게 둘러싸고 있었으며, 이들이 강한 ED1 면역반응성을 나타내는 것으로 보아 활발한 포식작용을 수행하고 있는 것으로 판단되었다. 그러나 아메바형 미세아교세포는 거의 관찰할 수 없었다. 이상의 결과는 두개골 밖에서 얼굴신경을 절단할 경우 일부 얼굴운동신경세포의 퇴행성 변화가 일어나고 ATF3와 pc-Jun의 지속적인 발현이 신경손상으로 유도된 퇴행성 변화 기전에 중요한 인자로 작용함을 나타내는 것이며, 아울러 이에 반응하여 활성화된 분지형 미세아교세포가 퇴행성 신경세포를 둘러싸서 포식작용을 수행함을 증명하는 것이다.

---

핵심되는 말 : 미세아교세포, 얼굴신경절단, 얼굴신경운동핵, pc-Jun, ATF3



# 얼굴신경 절단으로 유도된 얼굴신경운동핵의 퇴행성 변화에 수반되는 미세아교세포의 활성화

<지도 조 병 필 교수>

연세대학교 대학원 의학과

박 병 구

## 제1장 서론

얼굴신경은 다리뇌 바닥과 숨뇌 사이에 있는 고랑을 따라 뇌줄기의 앞가쪽으로 나와 주로 얼굴의 표정근육들을 지배하는 일곱째 뇌신경이다. 얼굴신경은 두개골 내에서 긴 해부학적 경로를 지날 뿐 아니라 두개골 바깥으로 나온 후 피부 표면에 가까이 위치하기 때문에 뇌신경 가운데에서 가장 손상받기 쉬운 신경 중의 하나이다 (Moran and Graeber, 2004). 외상이나 종양 혹은 수술 중에 발생할 수 있는 얼굴신경의 손상은 미각상실, 표정의 비대칭성 등의 기능적, 심미적 문제를 유발하여 개인의 신체적, 사회적인 장애를 초래하므로 (VanSwearingen et al., 1998; Gilden, 2004; Moran and Greaver, 2004), 얼굴신경 절단 모델 (facial nerve axotomy model)은 얼굴신경 손상 시에 발생할 수 있는 여러 증상을 예견하고 판단하는 모델로서 중요한 의의를 가진다. 얼굴신경 절단은 절단 위치에 따라 두개외 (extracranial) 절단 모델과 두개내 (intracranial) 절단 모델로 나뉘는데, 두개외 절단 모델의 경우 중추신경계에 직접적인 외상을 가하지 않기 때문에 뇌-혈관 장

벽 (blood-brain barrier)의 손상을 유발하지 않은 채로 신경아교세포의 반응 (glial cell response)을 연구할 수 있다는 장점 (Streit and Kreutzberg, 1988; Raivich et al., 1998)이 있으므로 중추신경계 신경세포의 퇴행성 변화 및 이와 관련된 미세아교세포의 반응을 연구하는데 중요한 모델로 받아들여지고 있다. 일반적으로 성숙한 흰쥐의 두개외 얼굴신경절단은 성숙한 흰쥐의 두개내 절단 (Mattsson et al., 1998)이나 신생 흰쥐의 얼굴신경 절단 (Graeber et al., 1998) 혹은 얼굴신경을 통한 독성물질인 ricin의 역행수송 (Streit and Kreutzberg, 1988)에 비해 경미한 얼굴운동신경세포의 사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다. 그리고 얼굴신경의 으깬 손상 (crush lesion)의 경우엔 신경세포의 재생을 이끌지만, 가로절단 (transection)이나 절제 (resection)할 경우 신경세포의 사멸이 유도됨이 발표되었다 (Torvik and Soreide, 1975). 신경세포 사멸의 원인에 관해서는 신경 손상에 의해 활성화된 미세아교세포가 신경독성인자 (neurotoxic factor)를 생산하여 사멸을 유도하거나 (Thery et al., 1991; Boje and arora, 1992), 말초로부터 충분한 신경영양인자 (neurotrophic factor)의 공급을 받지 못해 사멸이 유도된다는 발표가 있었다 (Sendtner et al., 1990).

일반적으로 정상 뇌에서 미세아교세포는 휴지기 상태의 미세아교세포 (resting microglia)로 존재하는데, 신경손상 신호를 받아 활성화되면 세포체의 크기가 커지고 근위부 가지의 두께가 두꺼워지는 활성 미세아교세포 (activated microglia)를 거쳐, 가지는 거의 소실되고 세포체의 크기가 증가하여 마치 아메바와 같은 형태로 활발히 포식작용을 수행하는 포식성 미세아교세포 (phagocytic microglia)로 전환되어 비로소 포식능을 가지게 된다 (Streit et al., 1999; Bruce-Keller, 1999). 미세아교세포는 중추신경계의 유일한 면역 감시자로서 신경병리학적 인자에 민감하게 반응하여 신경세포 보호자로서 역할을 수행하며 (Giulian et al., 1993), 경우에 따라서는 신경세포의 사멸을 촉진시킬 수도 있는 것으로 알려져 있다 (Banati et al., 1993). 그러므로 얼굴신경 절단 시 얼굴신경운동핵에 출현하는 미세아교세포의 형태적 변화와 면역학적 표현형의 변화를 포함한 기능적 변화를 정확하게 이해하는 것은 얼굴신경 절단 시 증상을 예견하고, 퇴행성 변화의 기전을 밝히는데 매우 중요한 의의를 가진다.

신경 손상 후 activating transcription factor 3 (ATF3)와 phospho-c-Jun (pc-Jun)의 발현이 증가한다고 알려져 있다 (Tsuji et al., 2000). 이들은 신경 손상과 같은 스트레스 자극에 의해 초기에 발현되는 immediate early genes (IEGs)이며 전사조절인자 (transcription factor)로서 작용하여 신경 세포의 장기간에 걸친 변화를 유도할 수 있다 (Haas et al., 1993). 신경 손상에 반응해 pc-Jun이 신경 세포의 재생이나 보호의 역할을 수행한다는 보고가 발표되었으나 (Leah et al., 1991; Haas et al., 1993), pc-Jun의 발현이 세포의 사멸과 시간적, 공간적으로 일치하였고, 세포사멸사의 형태적인 특징을 나타내는 세포에서 발현되므로 세포사멸사의 개시와 관련되어 사멸을 이끈다는 견해 또한 발표되었다 (Dragunow et al., 1993; Ferrer et al., 1996; Oo et al., 1999). 한편 ATF3는 여러 조직에서 사멸 혹은 보호의 기능을 수행하는 것으로 보고되었으며 (Mashima et al., 2001; Kawauchi et al., 2002), 신경 손상과 관련된 연구에서 주로 pc-Jun과 동시에 발현됨이 관찰되었다 (Tsuji et al., 2000). ATF3와 pc-Jun은 이종 이합체 (heterodimer)를 형성하여 전사를 활성화시키며, 각각의 동종 이합체 (homodimer)는 전사를 억제시키는 것으로 알려져 있다 (Hai and Curran, 1991; Chen et al., 1996).

본 연구에서는 얼굴신경 절단으로 유도된 얼굴운동신경세포의 사멸을 시간의 경과에 따라 정량화하였으며, 그에 따른 신경세포의 퇴행성 변화 양상을 세포, 조직학적으로 분석하였다. 그리고 얼굴운동신경세포 손상에 따른 미세아교세포의 반응을 활성 미세아교세포 (activated microglia)의 표지자인 OX-6 (Streit et al., 1989)와 포식작용의 표지자로서 널리 알려진 ED1 (Damoiseaux et al., 1994; Bauer et al., 1994)을 통해 확인하고자 하였다. 아울러 신경세포의 재생과 사멸에 관여한다고 알려진 ATF3와 pc-Jun의 발현 양상을 비교, 분석하였다 .

## 제2장 재료 및 방법

### 2.1. 실험동물 및 왼쪽 얼굴신경 절단

모든 실험동물의 관리는 연세대학교에서 규정하는 동물실험관리수칙에 의거하여 시행하였다. 사용한 실험동물은 30마리의 수컷 Wistar 쥐 (250~300 g)로 항온, 항습, 12시간의 밤-낮 주기가 유지되는 환경에서 사육하였다. 왼쪽 얼굴신경 절단을 위해 ketamine (70 mg/kg, 유한양행)과 xylazine (8 mg/kg, 유한양행) 혼합액을 복강주사하여 깊은 마취상태에 들게 한 후, 왼쪽 귀의 뒤쪽 피부를 절개하여 얼굴신경을 노출시켰다. 붓꼭지구멍 (stylomastoid foramen)으로부터 2.0 mm 되는 지점에서 얼굴신경을 절단한 후, 수술 후 재결합되는 것을 차단하기 위해 말단 쪽 2.0 mm를 제거하고 피부를 봉합하였다. 얼굴신경 절단을 시행한 지 1 (n=5), 2 (n=5), 4 (n=5), 8 (n=5), 16 (n=5) 및 24 (n=5) 주 후에 동물을 희생하였으며, 절단을 시행하지 않은 오른쪽의 결과는 대조군으로 사용하였다.

### 2.2. 면역조직화학염색

위와 동일한 방법으로 실험동물을 깊이 마취시킨 후, 가슴을 열고 심장을 통하여 100 ml의 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.4)를 관류한 다음 400 ml의 4% paraformaldehyde로 관류고정하였다. 뇌를 적출하여 얼굴신경운동핵이 포함되도록 뇌줄기를 절단하고, 이를 관류고정액과 동일한 고정액에 12시간 동안 후고정한 다음 4℃에서 30% sucrose에 하룻밤 침적시켰다. Tissue-Tek OCT compound (Sakura Finetechnical Co. Japan)를 이용하여 조직을 봉입하고 드라이아이스로 급속 동결한 후, Cryostat Microtome (Leica Microsystems Inc., Germany)을 이용하여 -20 ℃에서 40  $\mu$ m 두께의 연속적인 관상절편을 제작하여 0.1 M PB가 담긴

12개의 tissue well에 차례로 분배하였다. 절편의 제작은 뇌줄기로부터 얼굴신경 축삭이 출현하는 지점에서부터 등쪽 달팽이핵이 사라지는 지점까지 (Paxinos and Watson, 1998) 시행하였다. 이어서 조직 절편을 cryo-protection solution (30% glycerol, 30% ethylene glycol, 0.2 M NaOH in 0.1 M PB)이 담긴 tissue well에 순서대로 옮긴 후, -20℃에서 보관하였다.

조직절편을 0.9% sodium chloride와 0.1% Triton X-100이 포함된 0.1 M PB (PBST, pH 7.4)로 세 차례 수세한 후 3% 과산화수소에 15분간 처리하여 내재성 과산화효소의 활성을 방지하였다. 그 후 PBST로 세 차례 수세하고 2차 항체가 만들어진 것과 같은 종의 동물에서 추출된 5% normal serum을 1시간 처리하여 비특이 면역반응을 방지한 다음 1차 항체를 25 ℃에서 12시간 동안 반응시켰다. 일차항체로는 ED1 (mouse anti-rat CD68; 1:500; Serotec, Oxford, United Kingdom), OX-6 (mouse anti-rat MHC class II; 1:500; Serotec, Oxford, United Kingdom), rabbit anti-phospho c-Jun (Ser 63; 1:300; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), 그리고 rabbit anti-activating transcription factor 3 (1:500; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) antibody를 사용하였다. ED1은 lysosomal enzyme을 표지하기 위해, OX-6는 major histocompatibility complex II (MHC II)를 표지하기 위해 사용하였고, anti-ATF3와 anti-pc-Jun은 스트레스에 의해 발현되어 전사활성인자로서 작용하는 ATF3와 pc-Jun을 표지하기 위해 사용하였다.

일차항체 반응을 마친 표본을 PBST로 세 차례 수세한 후 ED1과 OX-6에 대해서는 biotinylated horse anti-mouse IgG (Vector Labs, USA)를, ATF3와 pc-Jun에 대해서는 biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vector Labs, USA)를 각각 1:200의 비율로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. PBST로 세 차례 수세한 후, avidin-biotin-peroxidase complex (ABC; Vector Labs, USA)에 1시간 동안 반응시키고 0.01% 과산화수소를 포함하는 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Sigma, USA)로 5분간 발색하였다. 발색된 조직을 젤라틴이 코팅된 슬라이드에 붙인 후, 0.1% Cresyl violet (Sigma, USA)을 이용해 대조염색하였다. 일련의 알코올 탈수과정을 거치고 xylene으로 투명화 한 후

Permount를 이용하여 봉입하여 Optiphot microscope (Nikon Inc., Japan) 하에서 100배, 400배 확대된 영상을 관찰하고 이를 Nikon digital camera (DXM1200; Nikon Inc., Japan)와 Nikon ACT-1 (version 2.20; Nikon Inc., Japan)을 이용하여 그림파일로 전환한 후, Adobe Photoshop (version 7.0; Adobe Inc., USA)을 이용하여 현미경 하에서 관찰한 영상과 일치하도록 밝기와 색상 대비를 조정하였다.

## 2.3. 이중 면역형광법

### 2.3.1. pc-Jun과 ATF3의 이중 면역형광염색

40  $\mu\text{m}$  두께의 관상절편을 0.1 M PBS로 세 차례 수세한 후, 10% normal goat serum을 1시간 처리하여 비특이 면역반응을 방지한 다음 anti-pc-Jun antibody (1:30; Cell Signaling; USA)를 12시간 반응시키고 PBS로 세 차례 수세한 후 Cy3 conjugated goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, USA)를 1:250의 비율로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. Anti-pc-jun 및 anti-ATF3 antibody의 숙주가 모두 rabbit로 동일하였으므로 이로 인한 교차반응을 방지하기 위하여 10% normal rabbit serum과 과량의 unconjugated Fab goat anti-rabbit IgG (1:20; Jackson ImmunoResearch, USA)를 차례로 1시간동안 반응시켰다. 이어서 이중 면역형광염색을 위해 anti-ATF3 antibody(1:50; Santa Cruz; USA)를 12시간 동안 반응시키고 세 차례 수세한 후, biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vector Labs, USA)를 1:200의 비율로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 0.1 M sodium bicarbonate buffered saline (pH 8.2)으로 세 차례 수세한 후 FITC conjugated Avidin D (1:50; Vector Labs, USA)를 1시간 반응시키고, 봉입하여 형광현미경 (BX51; Olympus, Japan)을 이용해 관찰하였다.

### 2.3.2. ED1과 OX-6의 이중 면역형광염색

40  $\mu\text{m}$  두께의 관상절편을 0.1 M PBS로 세 차례 수세한 후, 10% normal donkey serum을 1시간 처리하여 비특이 면역반응을 방지한 다음 ED1 (1:25; Serotec, UK)을 12시간 반응시키고 PBS로 세 차례 수세한 후 Cy3 conjugated donkey anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, USA)를 1:250의 비율로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 교차반응을 방지하기 위하여 10% normal mouse serum을 1시간 처리한 후 과량의 unconjugated Fab donkey anti-mouse IgG (1:20; Jackson ImmunoResearch, USA)를 1시간 동안 반응시켰다. 이어서 이중 면역형광염색을 위해 OX-6 (1:100; Serotec, UK)를 12시간 동안 반응시키고 세 차례 수세한 후, biotinylated horse anti-mouse IgG (Vector Labs, USA)를 1:200의 비율로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 0.1 M sodium bicarbonate buffered saline (pH 8.2)으로 세 차례 수세한 후 FITC conjugated Avidin D (1:50; Vector Labs, USA)를 1시간 반응시키고, 봉입하여 형광현미경 (BX51; Olympus, Japan)을 이용해 관찰하였다.

## 2.4. 얼굴운동신경세포의 계수

얼굴신경 절단 후 같은쪽 (ipsilateral side)과 반대쪽 (contralateral side)의 얼굴신경운동핵 내 신경세포의 수를 세었다. 각 실험동물에서 얻은 12 set의 표본 중 2 set의 조직절편을 0.1 M PB에 세 차례 수세한 뒤 젤라틴이 코팅된 슬라이드에 붙였다. 0.1% Cresyl violet (Sigma, USA)에 염색한 뒤, 알코올 탈수와 xylene 투명화 과정을 거친 후 Permount로 봉입하여 Optiphot microscope (Nikon Inc., Japan)으로 40배 확대된 영상을 얻었다. Nikon digital camera (DXM1200; Nikon Inc., Japan)와 Nikon ACT-1 (version 2.20; Nikon Inc., Japan)을 이용하여 그림 파일을 제작한 후 analySIS (Soft Imaging System, German) 영상분석 프로그램을 이용하여 얼굴신경운동핵에 존재하는 모든 신경세포의 수를 센 다음 평균을 구하였다.

## 2.5. 자료 분석

모든 결과는 평균  $\pm$  표준오차 (mean  $\pm$  S.E.M)로 표시하였다. 통계적인 분석을 위해 t-검정과 반복측정 자료에 대한 분산분석 (repeated measures ANOVA)을 실시하였다. Huynh-Feldt 방법으로 자유도 (degree of freedom)를 좀더 작게 수정한 F검정으로 일변량 분산분석을 실시하였고,  $p$ 값이 0.05 미만일 경우 유의한 차이가 있다고 간주하였다.



## 제3장 결 과

얼굴신경 절단 후 시간의 경과에 따라 얼굴신경운동핵 내 신경세포의 수와 크기가 점진적으로 감소하는 양상을 보였다 (그림 1). 각 시간대 별로 같은쪽과 반대쪽에 위치하는 얼굴운동신경세포의 수를 t-검정을 통해 비교한 결과, 절단 후 같은쪽 16주 ( $375.0 \pm 22.8$ )와 24주 ( $283.1 \pm 37.9$ )에서 반대쪽 16주 ( $474.3 \pm 14.9$ )와 24주 ( $434.2 \pm 27.4$ )에 비해 통계적으로 유의하게 감소하였고, 반대쪽에서는 시간의 경과에 따른 신경세포 수의 변화가 관찰되지 않았다 (표 1, 그림 2). 그리고 반복측정 자료에 대한 분산분석을 시행한 결과, 같은쪽과 반대쪽 간의 통계적으로 유의한 차이가 있음을 확인하였다 (표1, 그림 2).

ATF3와 pc-Jun은 축삭이 절단된 신경세포의 핵에서만 특이적으로 발현되었으며, 반대쪽에서는 전혀 발현되지 않았다. 절단 후 1주군에서 Cresyl violet으로 대조 염색된 대부분의 얼굴운동신경세포가 pc-Jun과 ATF3에 면역양성반응을 보였으며 (그림 3b, 4b), 이러한 현상은 2주군에서도 지속적으로 관찰되었다 (그림 3c, 4c). 절단 4주 이후부터는 pc-Jun과 ATF3에 면역양성반응을 보이는 세포의 수가 점진적으로 감소하여 (그림 3d, 4d), 24주군에서는 극히 일부의 얼굴운동신경세포에서만 pc-Jun과 ATF3가 발현되었다 (그림 3f, 4f). 얼굴신경 절단 후 1주와 2주에서 pc-Jun과 ATF3에 면역양성반응을 보이는 모든 신경세포들은 형태적으로 정상이었으나 (그림 3b, c, 4b 및 c), 시간의 흐름에 따라 세포체와 핵이 크게 위축된 퇴행성 신경세포들에서만 pc-Jun과 ATF3가 지속적으로 발현되었으며 (그림 3e, f, 4e 및 f의 화살표머리) 형태적으로 정상적인 세포들에서는 그 면역반응성이 사라졌다 (그림 3e, f, 4e 및 f의 화살표). 이중면역형광염색을 실시한 결과 pc-Jun과 ATF3는 대부분의 경우 동일한 신경세포에서 발현되었으나 (그림 5a~c의 화살표), pc-Jun (그림 5a, c의 이중화살표머리) 또는 ATF3 (그림 5b, c의 화살표머리) 면역양성반응만을 나타내는 신경세포도 소수 관찰되었다.

얼굴신경 절단 후 얼굴신경운동핵에서 활성화된 미세아교세포를 확인하기 위해 OX-6 면역조직화학염색을 실시하였다. 그 결과 절단 후 1주부터 미세한 OX-6 면역반응을 보이는 미세아교세포들이 관찰되기 시작하였으며 (그림 6b), 시간이 경과함에 따라 점진적으로 OX-6 면역반응성 미세아교세포의 수가 증가하여 8주에는 매우 강한 OX-6 면역반응성을 나타내는 큰 미세아교세포가 다수 관찰되었다 (그림 6d). 이후 그 수가 점진적으로 감소하여 24주군에서는 극히 일부의 OX-6 면역반응성 미세아교세포만이 존재하였다 (그림 6f). 관찰된 모든 OX-6 면역반응 세포들은 굵은 세포질돌기를 가진 분지형 미세아교세포였으며, Cresyl violet으로 대조염색된 세포체와 가지돌기를 밀접하게 둘러싸고 있었다 (그림 6c, d 및 f의 화살표). 얼굴신경 절단 반대쪽에서는 OX-6에 양성반응을 보이는 세포를 관찰할 수 없었다 (그림 6a).

얼굴신경 절단에 따라 활성화되는 미세아교세포의 포식활성은 포식세포의 용해소체를 표지하는 ED1으로 확인하였다. 얼굴신경 절단 후 1주부터 ED1에 양성반응을 보이는 세포들이 다수 관찰되었으며 그 수는 OX-6 면역반응세포의 수에 비해 훨씬 많았다 (그림 7b). 활성화된 미세아교세포의 ED1 면역반응성은 절단 후 2주에 더욱 증가하였으며 (그림 7c), 이후 시간이 경과함에 따라 점진적으로 그 수가 감소하여 24주군에서는 소수의 미세아교세포만이 ED1에 양성반응을 나타내었다 (그림 7d~f). 대체로 얼굴신경 절단 후 2주까지는 미세한 ED1 면역반응성 입자들이 미세아교세포의 세포체와 세포질돌기에 산재하였고 (그림 7b, c; 화살표), 그 후로는 이런 형태 외에도 phagosome으로 판단되는 비교적 큰 구형의 입자들이 강한 ED1 면역반응성을 나타내었다 (그림 7d~f; 화살표머리). ED1 면역반응성 미세아교세포 역시 얼굴운동신경세포의 세포체를 밀접하게 둘러싸고 있었다 (그림 7c, d 및 f의 화살표와 화살표머리). 얼굴신경 절단 반대쪽에서는 ED1에 양성반응을 보이는 미세아교세포를 관찰할 수 없었다 (그림 7a). OX-6와 ED1에 대한 이중면역형광염색을 실시한 결과, 많은 ED1 면역반응성 입자들이 OX-6에 이중표지 되었으나 (그림 8의 화살표), 일부 ED1 면역반응세포는 OX-6에 음성반응을 나타내었다 (그림 8의 화살표머리).

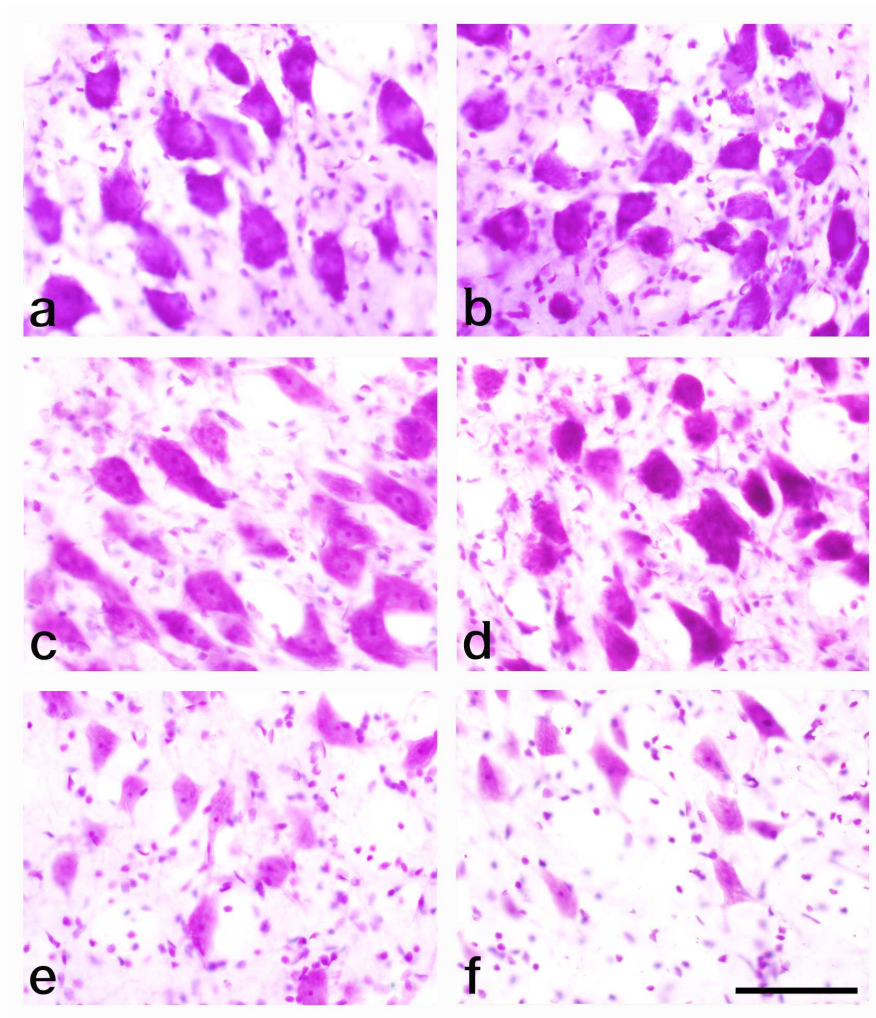


그림 1. Cresyl violet으로 염색된 얼굴신경운동핵. a, 반대쪽; b, 얼굴신경 절단 후 2주; c, 4주; d, 8주; e, 16주; f, 24주. 얼굴신경 절단으로 얼굴신경운동핵 내 신경세포의 수와 크기가 점진적으로 감소한다 (b~f). 반대쪽과 비교해 얼굴신경 절단 후 16주와 24주에서 신경세포의 수와 크기의 감소가 뚜렷하다 (e, f). Scale bar in (f) = 50  $\mu$ m (x200).

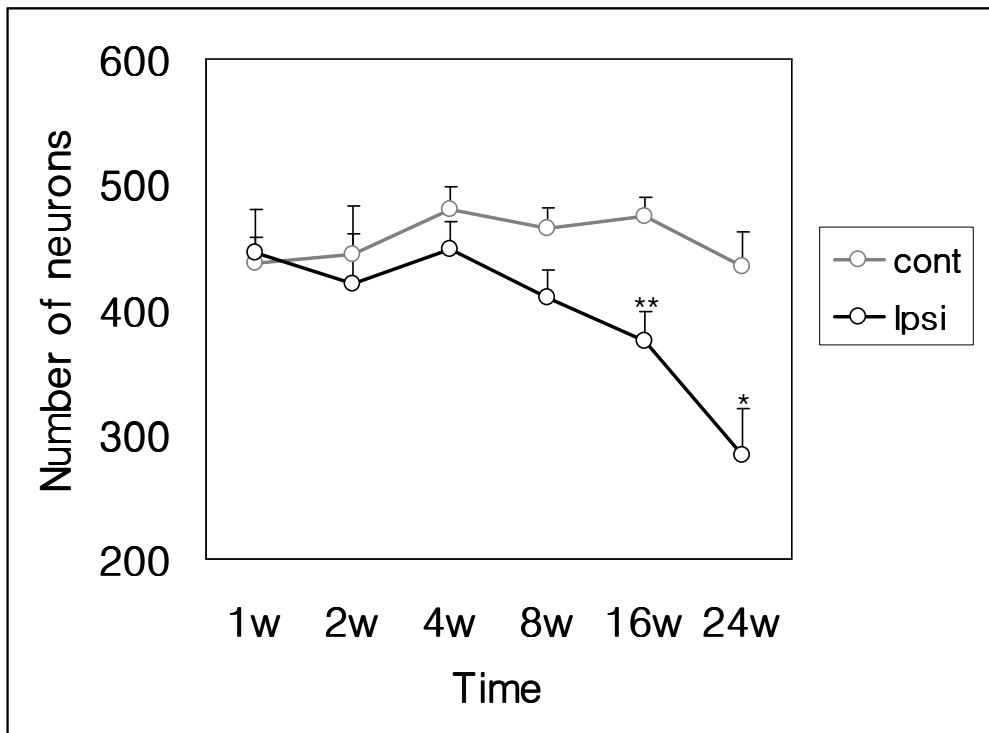


그림 2. 얼굴신경 절단 후 얼굴신경운동핵 내 신경세포 수의 변화. Cont, contralateral side; Ipsi, ipsilateral side. 얼굴신경 절단 후 얼굴운동신경세포의 수가 점진적으로 감소하지만 8주까지는 통계적으로 유의하지 않고, 8주 이후에는 신경세포의 수가 크게 감소하여 16주와 24주에서 통계적으로 유의하게 감소한다.

\* : 반대쪽에 비해  $p < 0.05$ .

\*\* : 반대쪽에 비해  $p < 0.01$ .

표 1. 얼굴신경 절단 후 얼굴신경운동핵 내 신경세포 수의 변화

실험군	개체수	신경세포수 <sup>†</sup>	t-값	유의도	
1주	반대쪽	5	436.2 ± 21.6	0.210	0.839
	같은쪽	5	445.3 ± 34.3		
2주	반대쪽	5	443.2 ± 39.4	0.419	0.686
	같은쪽	5	419.6 ± 40.2		
4주	반대쪽	5	479.1 ± 18.2	1.108	0.300
	같은쪽	5	447.6 ± 21.9		
8주	반대쪽	5	464.7 ± 15.8	2.027	0.077
	같은쪽	5	408.9 ± 22.6		
16주	반대쪽	5	474.3 ± 14.9	3.643	**
	같은쪽	5	375.0 ± 22.8		0.007
24주	반대쪽	5	434.2 ± 27.4	3.231	*
	같은쪽	5	283.1 ± 37.9		0.012

†: 평균 ± 표준오차.

\*: 반대쪽에 비해 p<0.05.

\*\* : 반대쪽에 비해 p<0.01.

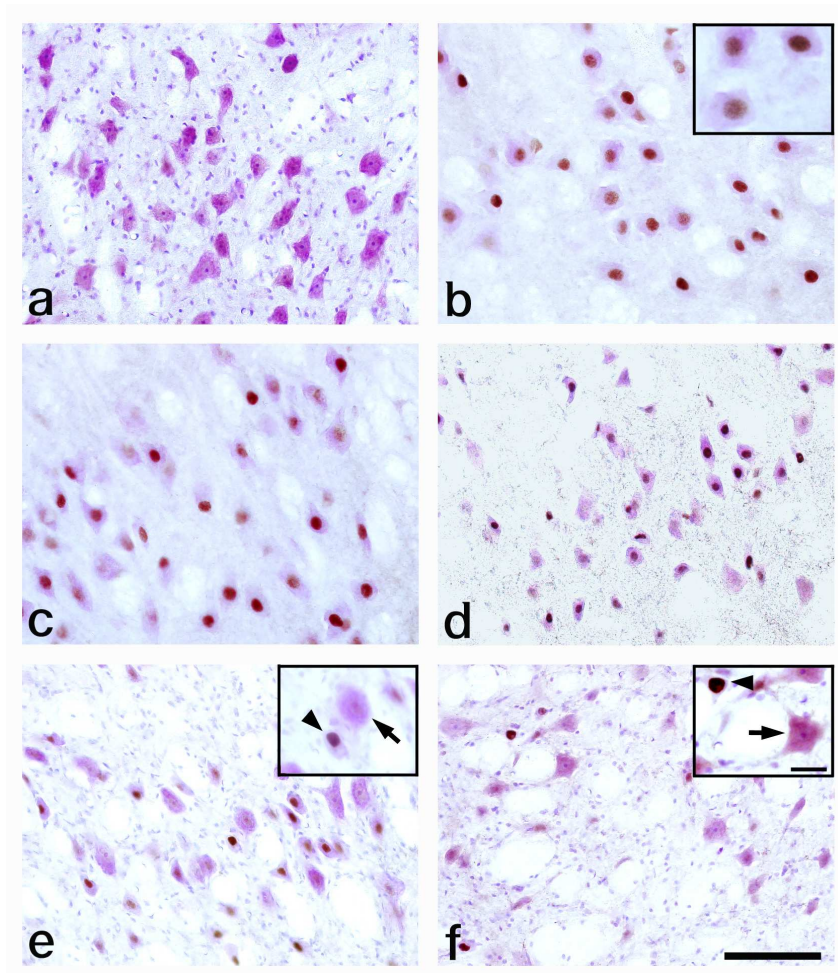


그림 3. 얼굴신경 절단 후 얼굴신경운동핵에서 pc-Jun의 발현. a, 반대쪽; b, 얼굴신경 절단 후 1주; c, 2주; d, 4주; e, 8주; f, 24주. 얼굴신경 절단 후 2주까지는 정상적인 형태와 크기를 보이는 대부분의 신경세포에서 pc-Jun이 발현되지만 (b, c), 4주 이후에는 그 수가 감소하면서 (d~f) 세포체와 핵이 크게 위축된 신경세포에서만 pc-Jun이 지속적으로 발현되고 (e, f의 화살표머리), 형태적으로 정상적인 세포에서는 발현되지 않는다 (e, f의 화살표). 반대쪽에서는 pc-Jun의 발현이 전혀 관찰되지 않는다 (a). Scale bar in (f) = 100  $\mu\text{m}$  ( $\times 100$ ); inset of (f) = 20  $\mu\text{m}$  ( $\times 400$ ).

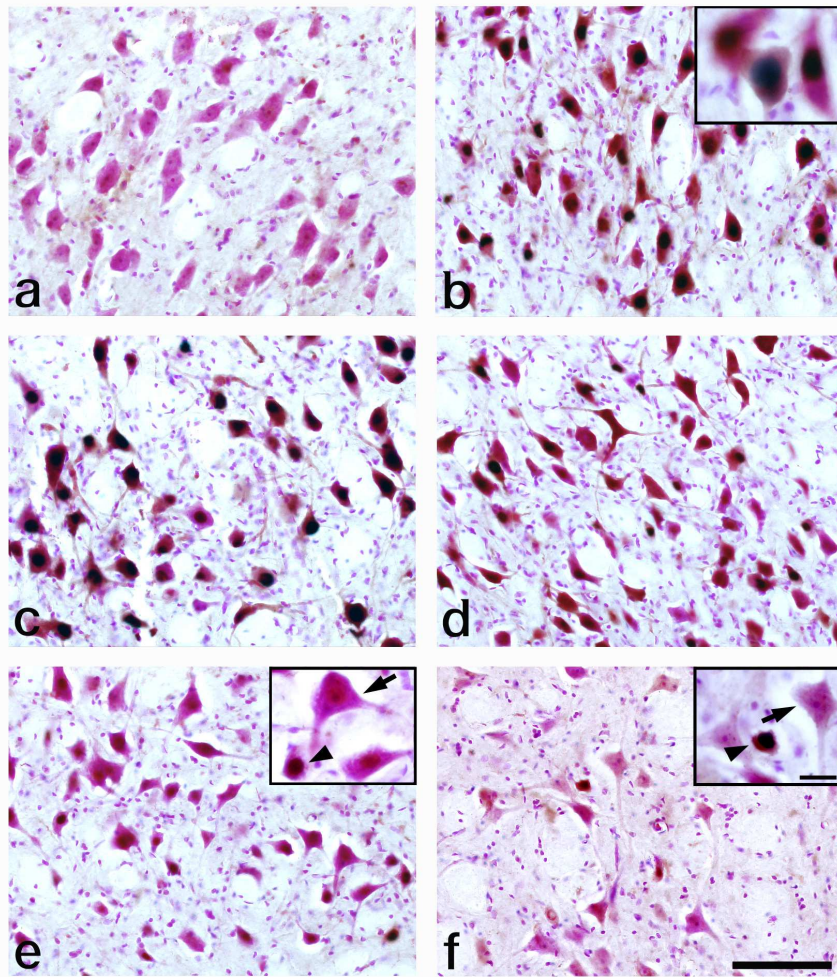


그림 4. 얼굴신경 절단 후 얼굴신경운동핵에서 ATF3의 발현. a, 반대쪽; b, 얼굴신경 절단 후 1주; c, 2주; d, 4주; e, 8주; f, 24주. 얼굴신경 절단 후 2주까지는 형태적으로 정상적인 대부분의 얼굴운동신경세포에서 ATF3가 발현된다 (b, c). 4주 이후로는 ATF3 양성반응세포의 수가 점진적으로 감소하며 (d~f), 시간이 경과함에 따라 크기가 위축된 신경세포에서만 특이적으로 ATF3가 발현되고 (e, f의 화살표머리), 형태적으로 정상적인 세포들에서는 발현되지 않는다 (e, f의 화살표). 반대쪽에서는 ATF3의 발현이 전혀 관찰되지 않는다 (a). Scale bar in (f) = 100  $\mu\text{m}$  ( $\times 100$ ); inset of (f) = 20  $\mu\text{m}$  ( $\times 400$ ).

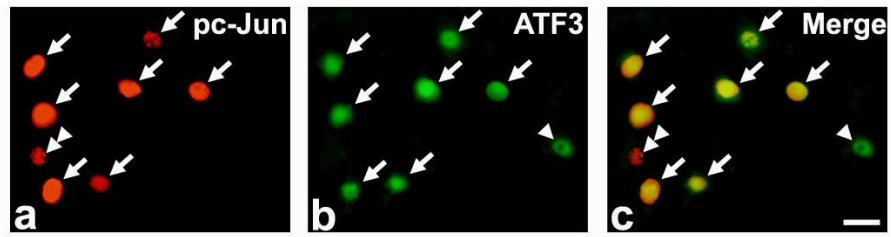


그림 5. 얼굴신경 절단 2주 후 얼굴신경운동핵에서 관찰된 pc-Jun과 ATF3의 발현. 대부분의 경우 pc-Jun (red)과 ATF3 (green)는 동일한 세포에서 발현되지만 (화살표) 소수의 신경세포에서는 pc-Jun (이중화살표머리) 또는 ATF3 (화살표머리) 만이 발현된다. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$  ( $\times 400$ ).



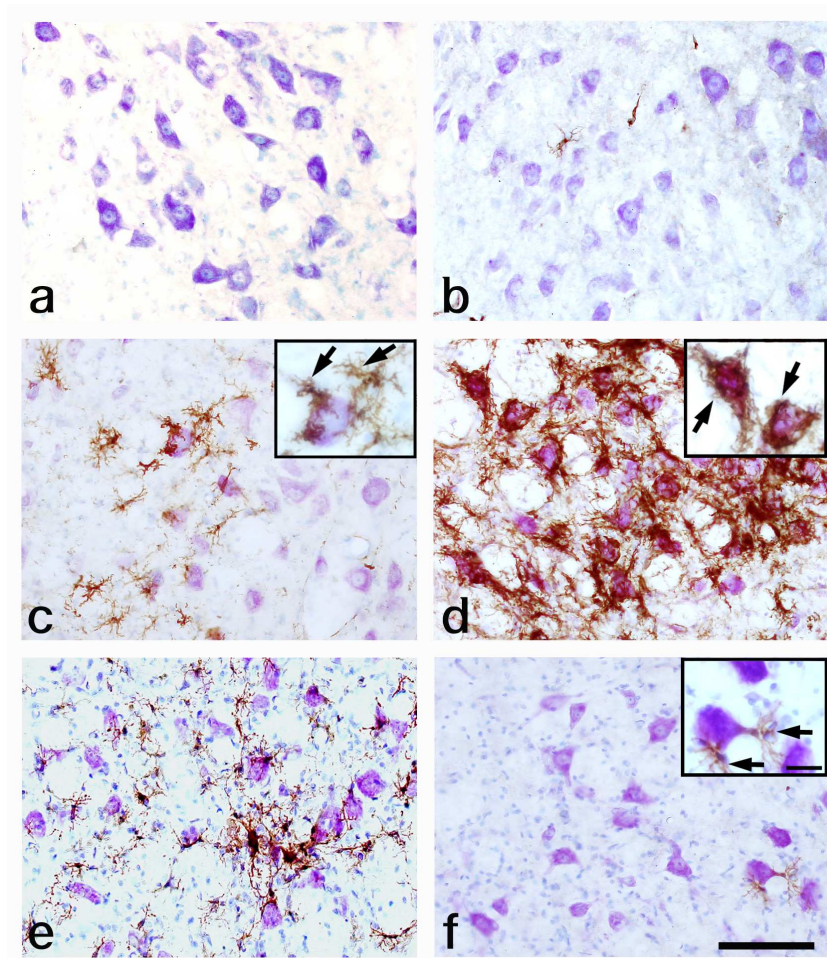


그림 6. 얼굴신경 절단 후 얼굴신경운동핵에서의 OX-6 면역조직화학염색. a, 반대쪽; b, 얼굴신경 절단 후 1주; c, 2주; d, 8주; e, 16주; f, 24주. 얼굴신경 절단 후 1주부터 OX-6에 양성반응을 보이는 활성화된 미세아교세포가 소수 관찰된다 (b). 시간이 경과함에 따라 점진적으로 그 수가 증가하여 8주에는 매우 강한 OX-6 면역반응성을 나타내는 다수의 활성화된 미세아교세포가 관찰되고 (d), 이후 점차 그 수가 감소한다 (e, f). OX-6 면역반응성을 나타내는 모든 미세아교세포는 분지형이며, 신경세포체와 가지돌기를 밀접하게 둘러싸고 있다 (화살표). 반대쪽에서는 OX-6에 양성반응을 보이는 세포를 관찰할 수 없다 (a). Scale bar in (f) = 100  $\mu\text{m}$  ( $\times 100$ ); inset of (f) = 20  $\mu\text{m}$  ( $\times 400$ ).

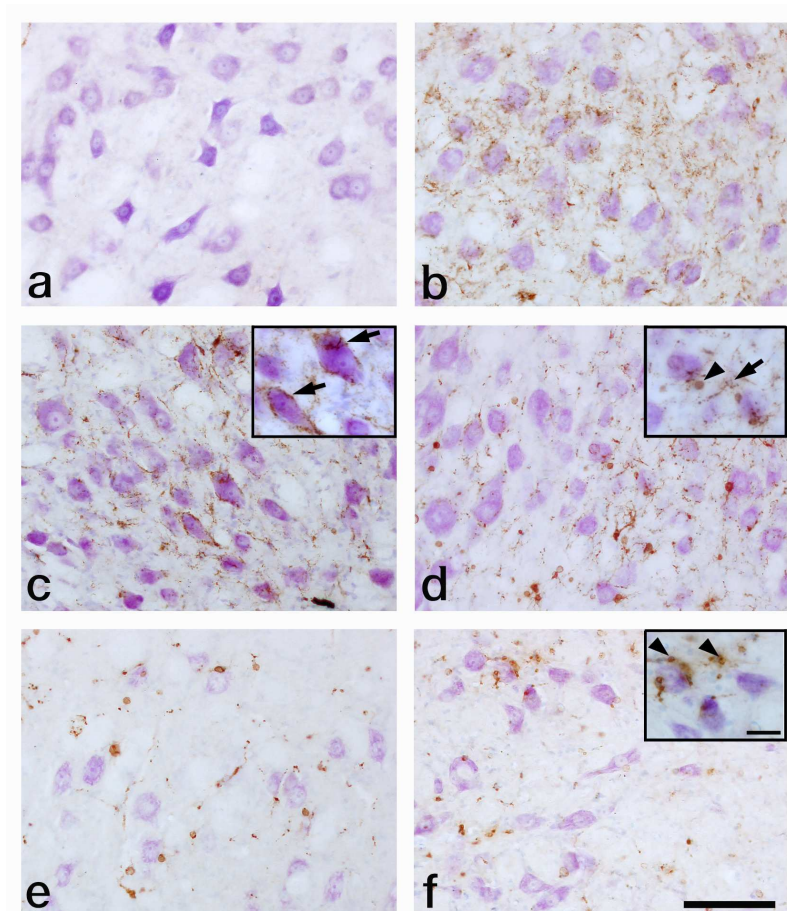


그림7. 얼굴신경 절단 후 얼굴신경운동핵에서의 ED1 면역조직화학염색. a, 반대쪽; b, 얼굴신경 절단 후 1주; c, 2주; d, 4주; e, 8주; f, 24주. 얼굴신경 절단 후 1~2 주 사이에 ED1 면역반응성 미세아교세포가 다수 관찰되며 (b, c), 이후 점차 그 수가 감소한다 (d~f). 절단 후 2주까지는 미세한 ED1 면역반응성 입자들이 미세아교세포에 산재하여 전체적으로 분지된 형태를 나타내지만 (b, c), 4주 이후에는 이들 (d의 화살표) 외에도 상당히 큰 구형의 ED1 면역반응성 입자가 관찰된다 (d~f; 화살표머리). ED1 면역반응성 세포들은 신경세포에 밀접하게 부착되어 있다 (화살표 및 화살표머리). 반대쪽에서는 ED1에 양성반응을 보이는 세포를 관찰할 수 없다 (a). Scale bar in (f) = 100  $\mu\text{m}$  ( $\times 100$ ); inset of (f) = 20  $\mu\text{m}$  ( $\times 400$ ).

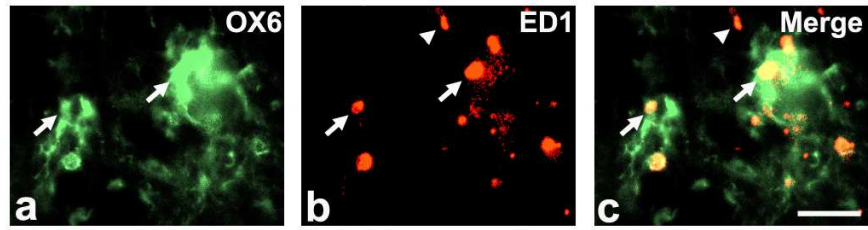


그림 8. 얼굴신경 절단 8주 후 얼굴신경운동핵에서 시행된 OX-6와 ED1에 대한 이중 면역형광염색. 대다수의 ED1 (red) 양성반응 세포들이 OX-6 (green)에 이중 표지되지만 (화살표) 일부 ED1 양성반응 세포들은 OX-6에 음성반응을 나타낸다 (화살표머리). Scale bar = 20  $\mu\text{m}$  ( $\times 400$ ).

## 제4장 고 찰

성숙한 쥐의 두개골 밖에서 얼굴신경을 절단한 후 8주부터 얼굴신경운동학 내 신경세포의 뚜렷한 감소가 나타났으며, 반대쪽과 비교해 절단 후 16주에 21.9%, 24주에 34.8%의 신경세포가 소실되었다 (표 1, 그림 1, 2). 이는 성숙 흰쥐의 두개골 밖에서 얼굴신경을 절단할 시 약 30%의 신경세포가 사멸한다는 이전의 연구와 동일한 결과였으며 (Guntinas-Lichius et al., 1994; Mattsson et al., 1998), 신경세포체로부터 가까운 거리에서 축삭절단이 이루어지는 두개내 얼굴신경 절단 (Mattsson et al., 1998)이나 신생 흰쥐에서의 얼굴신경 절단 (Graeber et al., 1998) 혹은 얼굴신경을 통하여 신경독성물질인 ricin을 역행수송 시키는 경우 (Streit and Kreutzberg, 1988)에 비해서는 적은 수의 신경세포가 사멸하는 것으로 나타났다. 이는 얼굴신경의 절단이 얼굴운동신경세포의 퇴행성 변화를 일으키며, 얼굴신경이 절단되는 지점에서 신경세포체까지의 거리와 실험동물의 연령이 신경세포의 사멸 정도에 영향을 미친다는 사실을 나타낸다 (Mattsson et al., 1998; Dai et al., 2000).

축삭절단으로 인한 신경세포 사멸의 원인에 관하여는 활성화된 미세아교세포가 활성산소 중간생성물 (reactive oxygen intermediate)이나 산화질소 (nitric oxide) 등의 신경독성인자 (neurotoxic factor)를 생산하여 사멸을 유도할 것이란 견해 (Thery et al., 1991; Boje and arora, 1992)와 축삭 절단으로 인해 말초로부터 충분한 신경영양인자 (neurotrophic factor)의 공급을 받지 못해 사멸이 유도될 것이라는 견해 (Sendtner et al., 1990)가 제시되어 있다. 그리고 Wang 등 (2002)은 세포자멸사 (apoptosis)로부터 세포를 보호하는 것으로 알려진 BCL-2의 발현감소와 염색질 응축 (chromatin condensation) 등의 증거를 들어 얼굴신경 절단에 따른 신경세포의 사멸과정은 세포자멸사 (apoptosis)라고 보고하였다.

신경 손상 등의 스트레스 자극에 의해 초기에 발현되는 immediate early genes

이며 전사인자 (transcription factor)로서 작용하는 pc-Jun 및 ATF3의 발현은 신경세포의 재생이나 보호 혹은 사멸과 관련되어 있는 것으로 보고되어 있다 (Leah et al., 1991; Haas et al., 1993; Dragunow et al., 1993; Ferrer et al., 1996; Oo et al., 1999; Mashima et al., 2001; Kawauchi et al., 2002). 이번 실험에서 얼굴신경 절단 후 초기에 대부분의 신경세포에서 관찰된 pc-Jun과 ATF3의 발현은 (그림 3b, c, 4b 및 c) 얼굴신경 절단으로 인한 초기 스트레스 반응에 의해 유도된 것으로 생각된다 (Liang et al., 1996; Chen et al., 1996; Hai et al., 1999).

한편 시간이 경과함에 따라 정상적인 형태를 유지하는 세포에서는 그 발현이 없어지고, 형태적으로 세포체가 위축되어 사멸과정에 있을 것으로 여겨지는 신경세포에서만 특이적으로 pc-Jun과 ATF3가 발현된 것에 (그림 3e, f, 4e 및 f) 대해서는 신경보호 혹은 재생과 사멸에 대한 두 가지 가능성을 모두 생각해 볼 수 있다. 우선 pc-Jun과 ATF3가 신경손상에 대한 치유 역할을 수행하여 치유가 완성된 세포에서는 발현이 사라지고, 치유가 되지 않은 세포에서는 지속적으로 발현될 가능성을 들 수 있다 (Leah et al., 1991). 그러나 본 실험에서 pc-Jun과 ATF3를 발현하는 위축된 세포들은 핵과 세포체가 강하게 응축되어 있는 것으로 보아 재생이 거의 불가능한 사멸 직전의 세포로 판단되었으며, 이와 일치하게 얼굴신경 절단 후 시간의 경과에 따라 상당수의 얼굴운동신경세포가 소실되었다. 사멸 직전의 세포에서 특이적으로 발현되는 전사인자가 재생에 관여할 것이라고 생각하기는 어려우므로 이러한 세포에서 발현되는 pc-Jun과 ATF3는 신경세포의 사멸과 관련된 역할을 수행할 것이라 추론되었다. 따라서 본 연구의 결과는 pc-Jun과 ATF3가 초기 스트레스에 의해 발현된 후, 일정 기간 이상 지속되며 여러 경로를 통해 세포의 사멸을 유도할 수 있다는 견해 (Dragunow et al., 1993; Dragunow and Preston, 1995; Oo et al., 1999)를 지지한다. Raivich 등 (2004)은 이 전사인자들이 사멸을 유도함과 동시에 신경세포의 위축을 막는 보호의 역할을 수행한다고 주장하였는데, 신경절단 초기에 발현되는 pc-Jun과 ATF3는 신경보호 효과를 나타낼 가능성도 배제할 수 없었다.

그리고 이중 면역형광염색을 통해 확인한 바와 같이, pc-Jun 혹은 ATF3만을 단독으로 발현하는 소수의 신경세포를 제외한 대부분의 신경세포 핵에서 pc-Jun

과 ATF3가 이중표지된 것은 이들이 heterodimer를 이루어 전사의 활성을 이끄는 것임을 암시한다 (Nakagomi et al., 2003; Tsujino et al., 2000). 이는 얼굴신경 절단에 의해 발현되는 pc-Jun과 ATF3가 얼굴운동신경세포의 사멸과 관련된 유전자의 발현을 활성화시킴을 나타낸다.

OX-6는 쥐의 major histocompatibility complex (MHC) class II에 대한 단일클론 항체로서 활성화 미세아교세포는 강한 MHC II를 발현한다고 알려져 있다 (Streit et al., 1989). ED1은 쥐 미세아교세포의 용해소체 막에 있는 효소를 표지하는 단일클론 항체로서 세포 내 ED1의 발현 정도는 그 세포의 포식활성과 비례하기 때문에 ED1 면역반응성의 정도는 미세아교세포의 포식능을 반영한다 (Damoiseaux et al., 1994; Bauer et al., 1994). 본 연구에 사용된 미세아교세포 표지자들은 얼굴신경 절단 후 얼굴신경운동핵에서 다양한 활성을 보이는 미세아교세포에 대해 각기 특이적인 반응을 보였다.

얼굴신경운동핵에서 얼굴신경 절단 1주 후부터 상당한 수의 미세아교세포가 ED1에 양성반응을 나타내기 시작하였으나, 같은 시간 군에서 OX-6에는 극소수의 미세아교세포만이 양성반응을 나타내었고, 2주 후부터 점차 그 수가 증가하기 시작하여 ED1의 발현이 OX-6에 비해 다소 일찍 나타나는 경향을 보였다. 따라서 미세아교세포의 포식작용이 MHC II의 발현에 선행한다는 것을 알 수 있었다. 또한 이중면역형광법으로 확인해 본 결과 거의 모든 OX-6 면역반응세포는 ED1에도 양성반응을 나타내지만, 일부 ED1면역반응세포는 OX6에 음성반응을 보였다. 이 결과 역시 새롭게 활성화되는 미세아교세포가 먼저 포식작용을 수행하고 그 후에 MHC II를 발현한다는 것을 암시한다. MHC II는 T세포에 항원제공시 필수요소로서 (Ford et al., 1996), 얼굴신경 절단에 따른 얼굴신경운동핵 내 T세포의 유입이 생쥐와 일부 품종의 쥐에서만 관찰되었다 (Raivich et al., 1998; Hurley and Coleman, 2003). 이는 T세포의 유입이 종에 따라, 그리고 같은 종이라도 품종에 따른 차이가 있는 것을 나타내며 (Hurley and Coleman, 2003), 포식활동 이후 MHC II의 발현을 증가시키는 미세아교세포가 성공적으로 항원을 제공할 수 있는가 하는 것은 보다 많은 면역학적 연구가 뒤따라야 할 것으로 사료된다.

절단 후 8주까지 많은 수를 보이던 ED1 및 OX-6 면역반응성 미세아교세포의

수는 8주 이후에는 그 수가 감소하는 경향을 나타내었고, 이들은 분지된 형태를 보이며 얼굴신경운동핵 내 신경세포들을 밀접하게 둘러싸고 있었다. 얼굴신경 절단에 의해 나타난 신경세포의 소실과 미세아교세포의 활성화 사이의 시간적 유사성은 축삭 절단에 의한 신경세포의 소실을 설명해 준다. 즉, 이러한 현상은 세포사멸의 과정에 있는 신경세포가 스스로 위축되면서 사멸해 가는 것이 아니라 주위에 존재하는 다수의 활성화된 미세아교세포에게 둘러싸인 채 포식당하면서 사멸해 가는 것임을 나타내는 것이다. Graever 등 (1998)은 성숙한 흰쥐의 얼굴신경을 두개골 밖에서 절단할 시 얼굴운동신경핵에서 포식작용이 관찰되지 않는다고 발표하였으나, 본 연구의 결과에서는 얼굴신경운동핵 내 활성화된 미세아교세포가 활발한 포식작용을 나타내며, 이는 신경세포의 사멸과 밀접한 관련이 있을 것으로 사료되었다.

일반적으로 정상 뇌에서 작은 세포체와 가는 세포질돌기를 가진 분지형 휴지 미세아교세포 (resting microglia)는, 신경손상 신호를 받아 활성화되어 세포체의 크기가 커지고 근위부 가지의 두께가 두꺼워지는 활성 미세아교세포 (activated microglia) 상태를 거쳐, 가지는 소실되고 세포체 크기가 증가하여 아메바형을 취하며 포식능을 가지는 포식성 미세아교세포 (phagocytic microglia)로 전환되는 것으로 알려져 있다 (Streit et al., 1999; Bruce-Keller, 1999; Kreutzberg, 1996). 이러한 견해에 따르면 분지형의 활성 미세아교세포는 포식성과 이동성을 나타내지 않으며 포식성 미세아교세포만이 포식능력을 보유한다. 본 연구에서는 ED1에 양성반응을 보이는 입자들이 OX-6 면역양성반응을 보이는 미세아교세포의 가지에서 관찰되었다. 이는 이전의 개념과 상당히 다른 것으로 활성 미세아교세포가 포식능력을 가질 수 있음을 시사하는 것이다.

말초신경계통에서와는 달리 중추신경계통에서는 신경세포의 재생이 거의 이루어지지 않으며, 미세아교세포는 중추신경계에서 포식작용을 수행하는 유일한 세포이기 때문에 퇴행성 신경세포에 있어 미세아교세포의 기능과 역할에 대한 연구는 매우 중요하다. 본 연구의 결과는 활성 미세아교세포가 포식능력을 가지고 있음을 증명하고 있다. 최근에는 미세아교세포의 활성을 억제함으로써 신경세포의 사멸을 억제할 수도 있다는 여러 실험동물 모델에서의 결과가 보고되고 있다 (He et al.,

2001; Dommeques et al., 2003). 얼굴신경 손상 시 얼굴신경운동핵 내 신경세포의 퇴행성 변화를 지연시키거나 줄기세포등을 이용한 치료에 있어서 본 연구의 결과는 유용한 기초자료로 이용될 수 있을 것이라 기대된다.



## 제5장 결론

두개골 밖에서 얼굴신경을 절단한 다음 얼굴신경운동핵 내 신경세포와 미세아교세포의 변화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 얼굴신경 절단 후 시간의 경과에 따라 얼굴신경운동핵 내 신경세포의 수와 크기가 점진적으로 감소하였으며, 세포 수는 반대쪽과 비교해 절단 후 16주에 21.9%, 24주에 34.8%가 소실되었다.
2. 얼굴신경 절단에 따라 얼굴신경운동핵 내 신경세포의 핵에서 pc-Jun과 ATF3가 발현되었다. ATF3와 pc-Jun은 대부분 동일한 세포에서 이중 표지되었으며, 뚜렷한 퇴행성 변화를 나타내는 신경세포에서 지속적으로 발현되었다.
3. 얼굴신경 절단으로 유도된 얼굴신경운동핵의 신경퇴행성 변화에 수반하여 강한 ED1 및 OX6 면역반응성을 나타내는 분지형 미세아교세포가 얼굴운동신경세포를 밀접하게 둘러싸고 있는 것이 관찰되었으며, 대부분의 ED1 면역반응성 입자들은 OX-6에 이중 표지되었다.

이상의 결과는 두개의 얼굴신경 절단이 얼굴신경운동핵 내 일부 신경세포의 퇴행성 변화를 일으키고, ATF3와 pc-Jun이 축삭절단으로 유도된 신경퇴행성 변화와 관련된 전사 조절을 수행하며, 활성화된 분지형 미세아교세포가 얼굴신경 절단으로 사멸하는 신경세포를 포식함을 증명한다.

## 참 고 문 헌

- Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW. Cytotoxicity of microglia. *Glia* 1993;7:111-118.
- Bauer J, Sminia T, Wouterlood D, Dijkstra CD. Phagocytic activity of macrophages and microglial cells during the course of acute and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 1994;38(4):365-75.
- Boje KM, Arora PK. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res.* 1992;587(2):250-6.
- Bruce-Keller AJ. Microglial-neuronal interactions in synaptic damage and recovery. *J Neurosci Res* 1999;1:58(1):191-201.
- Chen BP, Wolfgang CD, Hai T. Analysis of ATF3, a transcription factor induced by physiological stresses and modulated by gadd153/Chop10. *Mol Cell Biol* 1996;16(3):1157-68.
- Dai CF, Kanoh N, Li KY, Wang Z. Study on facial motoneuronal death after proximal or distal facial nerve transection. *Am J Otol* 2000;21(1):115-8.
- Damoiseaux JG, Dopp EA, Calame W, Chao D, MacPherson GG, Dijkstra CD. Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. *Immunology* 1994;83(1):140-7.

- Dommergues MA, Plaisant F, Verney C, Gressens P. Early microglial activation following neonatal excitotoxic brain damage in mice: a potential target for neuroprotection. *Neuroscience* 2003;121(3):619-28.
- Dragunow M, Preston K. The role of inducible transcription factors in apoptotic nerve cell death. *Brain Res Rev* 1995;21(1):1-28.
- Dragunow M, Young D, Hughes P, MacGibbon G, Lawlor P, Singleton K, Sirimanne E, Beilharz E, Gluckman P. Is c-Jun involved in nerve cell death following status epilepticus and hypoxic-ischaemic brain injury? *Brain Res Mol Brain Res* 1993;18(4):347-52.
- Ferrer I, Olive M, Ribera J, Planas AM. Naturally occurring (programmed) and radiation-induced apoptosis are associated with selective c-Jun expression in the developing rat brain. *Eur J Neurosci* 1996;8(6):1286-98.
- Ford AL, Foulcher E, Lemckert FA, Sedgwick JD. Microglia induce CD4 T lymphocyte final effector function and death. *J Exp Med* 1996;184(5):1737-45.
- Gilden DH. Clinical practice. Bell's Palsy. *N Engl J Med* 2004;23:351(13):1323-31.
- Giulian D, Vaca K, Corpez M. Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival. *J Neurosci* 1993;13:29-37.
- Graever MB, Lopez-rodondo F, Ikoma E, Ishikawa M, Imai Y, Nakagomy K, Kreutzberg GW, Kohsaka K. The microglia/macrophage response in the

- neonatal rat facial nucleus following axotomy. *Brain Res* 1998;813:241-253.
- Graeber MB, Streit WJ, Kreutzberg GW. Axotomy of the rat facial nerve leads to increased CR3 complement receptor expression by activated microglial cells. *J Neurosci Res* 1988;21(1):18-24
- Guntinas-Lichius O, Neiss WF, Gunkel A, Stennert E. Differences in glial, synaptic and motoneuron responses in the facial nucleus of the rat brainstem following facial nerve resection and nerve suture reanastomosis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1994;251(7):410-417.
- Haas CA, Donath C, Kreutzberg GW. Differential expression of immediate early genes after transection of the facial nerve. *Neuroscience* 1993;53(1):91-9.
- Hai T, Curran T. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(9):3720-4.
- Hai T, Wolfgang CD, Marsee DK, Allen AE, Sivaprasad U. ATF3 and stress responses. *Gene Expr* 1999;7(4-6):321-35.
- He Y, Appel S, Le W. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain Res* 2001;3:909(1-2):187-93.
- Hurley SD, Coleman PD. Facial nerve axotomy in aged and young adult rats: analysis of the glial response. *Neurobiol Aging*. 2003;24(3):511-8.

Kawauchi J, Zhang C, Nobori K, Hashimoto Y, Adachi MT, Noda A, Sunamori M, Kitajima S. Transcriptional repressor activating transcription factor 3 protects human umbilical vein endothelial cells from tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis through down-regulation of p53 transcription. *J Biol Chem* 2002;277(41):39025-34.

Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 1996;19(8):312-8.

Leah JD, Herdegen T, Bravo R. Selective expression of Jun proteins following axotomy and axonal transport block in peripheral nerves in the rat: evidence for a role in the regeneration process. *Brain Res* 1991 ;6:566(1-2):198-207.

Liang G, Wolfgang CD, Chen BP, Chen TH, Hai TJ. ATF3 gene. Genomic organization, promoter, and regulation. *Biol Chem* 1996;19;271(3):1695-701.

Mashima T, Udagawa S, Tsuruo T. Involvement of transcriptional repressor ATF3 in acceleration of caspase protease activation during DNA damaging agent-induced apoptosis. *J Cell Physiol* 2001;188(3):352-8.

Mattsson P, Meijer B, Svensson M. Extensive neuronal cell death following intracranial transection of the facial nerve in the adult rat. *Brain Res Bull* 1998;49(5):333-341.

Moran LB, Graever MB. The facial nerve axotomy model. *Brain Res Rev* 2004;44(2-3):154-178.

- Nakagomy S, Suzuki Y, Namikawa K, Kiryu-Seo S, Kiyama H. Expression of the Activating transcription factor 3 prevents c-Jun N-terminal kinase-induced neuronal death by promoting heat shock protein 27 expression and Akt activation. *J Neurosci* 2003;23(12):5187-5196.
- Oo TF, Henchcliffe C, James D, Burke RE. Expression of c-fos, c-jun, and c-jun N-terminal kinase (JNK) in a developmental model of induced apoptotic death in neurons of the substantia nigra. *J Neurochem* 1999;72(2):557-564.
- Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 4th ed. San Diego(CA): Academic press; 1998.
- Raivich G, Bohatschek M, Da Costa C, Iwata O, Galiano M, Hristova M, Nateri AS, Makwana M, Riera-Sans L, Wolfer DP, Lipp HP, Aguzzi A, Wagner EF, Behrens A. The AP-1 transcription factor c-Jun is required for efficient axonal regeneration. *Neuron* 2004;8;43(1):57-67.
- Raivich G, Jones LL, Kloss CU, Werner A, Neumann H, Kreutzberg GW. Immune surveillance in the injured nervous system: T-lymphocytes invade the axotomized mouse facial motor nucleus and aggregate around sites of neuronal degeneration. *J Neurosci* 1998;18(15):5804-16.
- Sendtner M, Kreutzberg GW, Thoenen H. Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature*. 1990;345(6274):440-1.
- Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW. Expression of Ia antigen on

- perivascular and microglial cells after sublethal and lethal motor neuron injury. *Exp Neurol* 1989;105:115-126.
- Streit WJ, Kreutzberg GW. Response of endogenous glial cells to motor neuron degeneration induced by toxic ricin. *J Comp Neurol* 1988;268: 243-263.
- Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 1999;57(6):563-8.
- They C, Chamak B, Mallat M. Cytotoxic Effect of Brain Macrophages on Developing. *Eur J Neurosci* 1991;11:1155-1164.
- Torvik A, Soreide AJ. The perineuronal glial reaction after axotomy. *Brain Res* 1975;95(2-3):519-29.
- Tsujino H, Kondo E, Fukuoka T, Dai Y, Tokunaga A, Miki K, Yonenobu K, Ochi T, Noguchi K. Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: A novel neuronal marker of nerve injury. *Mol Cell Neurosci* 2000;15(2):170-82.
- VanSwearingen JM, Cohn JF, Turnbull J, Mrzai T, Johnson PO. Psychological distress: linking impairment with disability in facial neuromotor disorders. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;118(6):790-6.
- Wang ZM, Dai CF, Kanoh N, Chi FL, Li KY. Apoptosis and expression of BCL-2 in facial motoneurons after facial nerve injury. *Otol Neurotol* 2002;23(3):397-404.

## ABSTRACT

### **Microglial Activation in Facial Motoneuron Degeneration following Facial Nerve Axotomy**

Park, Byung Gu  
Dept. of Medicine  
The Graduate School  
Yonsei University

Facial nerve injury caused by trauma, cancer, and surgery may exert degenerative effects on neurons of the facial motor nucleus. For studying nerve injury-induced changes and the underlying mechanisms in the facial motor nucleus, facial nerve axotomy model was found to be useful. One particular advantage of employing extracranial facial nerve axotomy is that one can study glial responses without damaging the blood-brain barrier. The purposes of this study were to investigate whether the extracranial axotomy produces any degenerative changes in the facial motor nucleus, and what mechanisms underlie the changes with focuses on functional roles of the immediate early genes such as activating transcriptional factor 3 (ATF3) and phospho c-Jun (p-c-Jun), and microglial responses using immunohistochemical techniques.

The extracranial facial nerve axotomy gradually decreased the number and size of neurons in the ipsilateral side of facial motor nucleus. 21.9% and 34.8% of the ipsilateral neuronal profiles were down-regulated at 16 and 24 weeks



following the axotomy, respectively. At the early degenerative stage, most ipsilateral facial motoneurons expressed ATF3 and pc-Jun in the nuclei. However, both ATF3 and pc-Jun were expressed only in degenerative neurons showing severe morphological atrophy after 8 weeks post-lesion, while their expression has been disappeared in neurons with normal morphology. Immunoreactivity of the ED1, a phagocytic marker, was observed as small particles in the soma and cytoplasmic processes of ramified microglia by 2 weeks. Thereafter, relatively large, spheroidal bodies believed to be the phagosomes showed strong ED1 immunoreactivity. Microglial phagocytic activity was thought to precede the expression of major histocompatibility complex II, since the number of ED1-positive microglia was greater than that of the OX-6-positive ones at the early stage of neurodegeneration. Later, many activated microglia were double-labeled with ED1 and OX-6, and they showed ramified form with thick processes. Importantly, the OX-6-positive microglia intimately enclosed the facial motoneurons, and they were thought to be highly phagocytic because they showed strong ED1 immunoreactivity also. There was no amoeboid microglia in the ipsilateral facial motor nucleus.

Taken together, these results suggest that the extracranial facial nerve axotomy produces degeneration of the facial motoneurons and the sustained expression of ATF3 and pc-Jun may play an important role in the neurodegenerative cascades caused by nerve injury. Also the present data demonstrates that activated but ramified microglia may phagocytose degenerating neurons.

---

Key words : microglia, facial nerve axotomy, facial motor nucleus, pc-Jun, ATF3