실험적 자가면역성 말초신경염에서의 조직병리적 병변 및 CD_5^+ B-림프구의 발현

*서울대학교 의과대학 신경과학교실 및 병리과학교실**

조중양 · 최원준 · 김성훈 · 성정준 · 김호진 · 박경석 · 최기영* · 김현정 · 이광우

Histopathologic Features and $CD5^+$ B-lymphocyte Expression in the Experimental Allergic Neuritis

Joong-Yang Cho, Won-Jun Choi, Sung-Hun Kim, Jung-Joon Sung, Ho-Jin Kim, Kyung-Seok Park, Ki-Young Choi*, Hyun-Jung Kim, Kwang-Woo Lee

Department of Neurology and Pathology*, College of Medicine, Seoul National University

- Abstract -

Background : The pathogenesis of acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (AIDP), Guillain Barre syndrome (GBS) is not clear, but it has been known that the immune mechanisms play an important role. Authors performed this study to establish an animal model of experimental allergic neuritis (EAN) by immunizing the myelin components of peripheral nerves and to understand the electrophysiological and histopathological features as well as the CD_5^+ B-lymphocyte changes in peripheral bloods in the EAN models.

Methods : Lewis rats weighing 150-200 gm were injected subcutaneously in soles two times with total myelin, P0, P1, or P2 proteins purified from the bovine cauda eguina. The EAN induction was assessed by evaluating clinical manifestations. The electrophysiological and histopathological features were studied as routine methods. The CD_5^+ B-lymphocytes were double stained using monoclonal FITC conjugated anti-rat CD45RA and R-PE conjugated anti-rat CD_5^+ antibodies and calculated using a fluorescence activated cell sorter (FACS).

Results : The EAN animal models were established. In two out of five, in one out of two, in none out of three, and in none out of one Lewis rats injected with purified total myelin, P0, P1, P2 proteins respectively, They showed slow spontaneous motor activity and weak resistance against pulling back by tails. The typical electrophysiological and histologic findings in total protein and P0 induced EAN animal models were the decreased conduction velocity, the decreased compound muscle action potential (CMAP) amplitude and the dispersion phenomenon. The perivascular infiltrates of lymphocytes with focal demyelinating process were found in light microscopy. The CD_5^+ B-lymphocyte expression in three EANs were 2.38%, 3.50% 2.50%, which were not significantly increased, compared with those in normal controls.

Conclusion : The EAN animal models were successfully established by injecting the total myelin and P0 myelin and they showed electrophysiological and histological features typical of demyelinating process. However they did not show an increased expression of CD_5^+ B-lymphocyte in peripheral bloods which could be indirect evidence of humoral autoimmunity.

Key Words : Guillain Barre syndrome, Experimental allergic neuritis, Autoimmune disease

교신저자 : 이 광 우
서울특별시 종로구 연건동 28번지
서울대학교 의과대학 신경과학교실
TEL) 02 - 760 - 3215, FAX) 02 - 3672 - 7553, E - mail : kwoo@plaza.snu.ac.kr

* 이 연구는 1993년도 서울대학교병원 일반연구비(04 - 93 - 20) 지원에 의한 결과임.

서 론

Guillain Barre 증후군(GBS)은 수주에 걸쳐 사지의 대칭적 근력약화 (또는 마비현상)가 빠르게 진행되고 일정 기간이 지난후에는 수주 또는 수개월에 걸쳐 서서히 근력이 회복되는 임상경과를 특징으로 한다[1,2]. 진찰상 건반사가 소실되고 뇌척수액 검사상 세포의 증가는 뚜렷하지 않으며 단백이 증가되는 특이소견을 나타내므로 일찌기 GBS는 자가면역성 발병기전이 매우 중요할 것으로 생각되었다[3].

GBS의 발병기전은 아직도 명확하게 밝혀져 있지 않은 상태이다. Waksman과 Adams(1955년)는 말초신경(whole peripheral nerve)을 실험동물에 주사하여 GBS의 여러 가지 특성에 부합되는 탈수초성 신경병증 동물모델을 처음으로 유도하였다[4]. 이후 말초신경의 수초 구성물질인 P_0, P_2 단백을 주사할 경우 " 실험적 알레르기성 신경염(experimental allergic neuritis, EAN) "이 유도되었으며, 이때 관찰되는 특징적 병리소견은 탈수초현상과 염증소견으로 말초신경 부근에 위치한 혈관(venule) 주위에 림프구 및 대식세포(macrophage) 침착이 뚜렷하였다[1,5,6]. 뿐만아니라 이와같은 실험적 신경염 현상은 EAN 동물의 림프구 이식을 통해서도 EAN의 재현(passive transfer)이 가능하여, EAN의 발생기전은 항체에 연관되었기 때문 보다는 세포성 중재에 의한 과정이 매우 중요할 것으로 생각되었다[5].

반면 말초신경의 또다른 구성성분인 galactocerebroside (b-D-galactosylceramide) 물질을 동물에 주사할 경우에도 GBS의 동물모델 형태인 " 염증성 탈수초성 신경염 "의 유도가 가능하였다. Saida등의 연구에서는 galactocerebroside 유도성 말초신경염 동물모델에서 초기의 염증반응이 뚜렷하지 않았으며, 항체역가가 높게 관찰된다는 점에서 신경염의 생성에 세포성 중재보다는 항체 연관성이 매우 중요한 역할을 할 것으로 설명하였다[7,8,9].

또한 1980년대 후반에는 말초신경병증의 자가면역성 발병기전의 이론에 근거한 여러 가지 중요한 관찰이 보고되었다. Latov등은 단클론성 gammopathy을 동반한 말초신경병증의 증례를 분석한 결과 말초신경 수초의 구성성분인 myelin associated glycoprotein (MAG)에 대한 항체가 말초신경병증의 발병에 직접 작용한다는 사실을 확인하였으며,[10] Koski등은 GBS 및 이와 유사한 말초신경병증의 상당 비율의 환자 혈청내에 항-GM1 항체가 검출되었음을 보고하였다[11,12].

이와같이 말초신경 수초의 구성성분에 따라 유도되는 말초신경 동물모델의 특성이 각기 다르며, 말초신경병증에 관계되는 수초 구성물질에 대한 항체가 상이하다는 점에서 수초의 특정 단백을 주사로 유도된 동물모델에서 자가면역성 항체생성의 간접적 실험증거를 확인하는 것은 매우 중요하다. 말초신경 수초의 주요 구성물질인 P_0, P_1, P_2, total myelin 등을 주사하여 말초신경병증 실험동물모델을 유도하고, 이들 동물모델이 인간의 말초신경병증과 어느정도 일치하는지를 비교하며, 이들 실험동물의 말초혈액 림프구 중에서 CD_5^+ B-림프구의 발현이 어느 정도 증가 되었는지를 확인하는 과정도 이들을 설명하기 위한 한가지 방법이다[13]. 왜냐하면 말초신경 동물모델의 말초혈액 림프구 중에서 $CD5^+$ B-림프구의 비율이 의미있게 증가된다면 자가면역성 특성을 지닌 B-림프구의 활성이 활발하다는 것을 의미하며, 결국 이들 질환의 자가면역성 발병기전을 간접적으로 이해할수 있기 때문이다[14].

저자들은 소의 마미(cauda equina) 수초에서 분리한 P_0, P_1, P_2, total myelin등을 Lewis rats에 주사하여 인간의 말초신경병증과 유사한 동물모델을 유도하여 이들 말초신경병증 동물모델에서의 임상특성, 말초신경의 전기생리적 및 병리조직학적 소견등을 이해하며, 이들 동물모델의 말초혈액에서 $CD5^+$ B-림프구의 발현정도를 평가하고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 수초단백의 분리

먼저 말초신경으로부터 수초와 축삭을 분리하고 전기영동 방법을 통하여 수초의 단백을 분 하는 방법으로 각각의 수초 단백을 정제하였으며, 간단히 기술하면 다음과 같다. 소의 마미로부터 말초신경을 채집한 다음 액체 질소를 넣으면서 잘게 부수었다. 잘게 부순 말초신경 100gm에 0.85M sucrose, 0.1M NaCl, 0.05M NaH_2PO_4 buffer A 용액 (pH 6.0)에 넣어 homogenate를 만들고 4℃에서 10,000 x g의 속도로 10분간 원심분리 하였다. 연이어 추출물을 4℃에서 75,000 x g의 속도로 약 30분간 원심분리 한 다음 floating layer와 pellet등을 합쳐 모으고, 4ml의 0.05M NaH_2PO_4 buffer 용액(pH 6.0)에 약 12시간 동안 현탁시켰다. 다음 약 7배의medium A 용액에 희석시키고 81,000 x g 의 속도로 10분간 원심분리 한 후 pellet을 모았으며, 여기에 1% BSA-PBS 2ml을 추가하여 sonication 시켜 수초를 구성하는 물질을 제 1단계로 정제하였다.

다음 단계에서는 polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 방법을 이용하여 앞서의 정제된 수초단백으로 부터 P_0, P_1 및 P_2 들을 각각 분리하였다. PAGE는 통상적 방법으로 시행되었는데, separating gel은 증류

수 15.8ml, 30% acrylamide 13.3ml, 1.5M Tris (pH8.8) 10ml, 10% ammonium sulfate 0.4ml 및 TEMED 0.016ml을 혼합하여 만들었으며, stacking gel은 증류수 6.8ml, 30% acrylamide 1.7ml, 1.0M Tris(pH6.8) 1.25ml, 10% ammonium sulfate 0.1ml 및 TEMED 0.01ml을 혼합하여 사용하였다. 일정량의 total myelin을 sampling buffer에 혼합하여 loading 시킨 후 5-6 시간 전기영동 시키고 Coomassie brilliant blue로 염색한 후 destaining buffer에 immersion 시켰으며, 각각 분리된 P_0, P_1, P_2 단백을 따로 절단하여 모은 후 각각의 단백을 정량하였다.

2. 실험적 말초신경 동물모델의 유도

말초신경 동물모델의 유도는 다음과 같은 방법으로 시행되었다. 앞서 준비한 P_0 (1500ug), P_1(1000ug), P_2(1000ug), 및 total myelin(2500ug) 등 수초단백(항원) 각각을 Freund's adjuvant와 혼합하여 9-11주 연령의 수컷 Lewis rat (체중 150-200gm)의 발바닥에 피하주사 하였다. 처음 주사 7일 후에 각각의 실험동물에 전과 똑같은 방법으로 추가 주사한 후 약 4주 동안 임상경과를 관찰하였다. 그외 대조군 실험동물에는 분리된 수초단백 없이 Freund's adjuvant 만을 같은 방법으로 주사하는등, 항원을 제외하고는 다른 모든 조건들을 실험군과 동일하게 맞추었다[5,6,7].

실험적 말초신경 (EAN) 동물모델 발현은 이들 실험동물이 나타나는 임상양상 현상을 관찰함으로써 판단하였다. 즉 실험동물이 점차적으로 움직임이 둔화되거나, 음식물 섭취가 감소되거나, 사지의 근력약화 등이 나타나는지를 지속적으로 관찰하면서, 주기적으로 실험동물이 수직물체에 매달리는 사지의 근력을 측정하는 등 정량적 평가를 시도하였다. 임상적으로 EAN이 유도된 것으로 판단되면 하지에서 전기생리적 검사를 실시하였으며, 이어 실험동물을 희생시킨후 말초신경 및 말초혈액을 채취하였다.

3. EAN에서의 전기생리적 검사방법

실험동물에서의 말초신경병변을 평가하기 위하여 전기생리적 검사를 실시하였다. 이들 검사를 위해 Viking IV EMG 계기(Nicolet, USA)를 사용되었으며, 검사방법을 간단히 기술하면 다음과 같다. 검사를 실시하기 전 실험동물에 ketamine 80mg/kg를 복강내 주사하여 마취시켰다. 마취된 실험동물을 복와위(prone position)으로 고정판에 고정시키고 하지의 해당위치에 전기자극과 파형기록을 위한 침전극(needle electrode)을 각각 삽입하였다. 운동전도검사를 위해서는 활동전극(active recording electrode)과 기준전극(reference electrode)을 실험동물의 첫 번째와 두 번째 발가락 사이의 발바닥 및 두 번째 발가락에 각각 삽입하여 기록하였고, 전기자극은 발목부위 및 좌골패임 부위에 각각 침전극을 삽입하여 경골신경및 좌골신경을 자극하였다. 최대위(supramaximum) 자극강도로 수차례 반복 자극하여 기록된 복합근활동전위(CMAP) 파형이 중첩되는 것을 확인하고 CMAP 음정점(negative peak) 까지의 시간을 잠복기(latency)로, 양정점(positive peak)과 음정점(negative peak) 간의 수직거리를 진폭으로 측정하였다. 운동신경 전달속도는 발목부위 및 좌골 패임 부위의 거리를 각각의 두 위치를 자극하여 얻은 CMAP 잠복기의 차이로 나누는 방법으로 계산되었다.

감각전도검사를 위해서는 활동전극과 기준전극을 실험동물의 발목부위 및 상방 1.5cm 부위에 삽입하였고, 자극을 위한 침전극은 실험동물의 두 번째 발가락에 삽입하는 방법으로 시행되었다. 최대위 자극강도로 수차례 반복자극하여 얻어진 복합신경활동전위(CNAP) 파형이 중첩되는 것을 확인하고, CNAP 음정점까지의 시간을 잠복기로, 양정점과 음정점까지의 수직거리를 진폭으로 측정하였다. 감각신경 전달속도는 자극전극과 기록전극 사이의 거리를 얻어진 CNAP 음정점의 잠복기로 나누는 방법으로 계산되었다.

4. EAN 에서의 병리조직학적 검사

적당한 시기에 실험동물의 전기생리적 검사를 마친후 즉시 실험동물을 희생시켰다. 희생된 실험동물에서 마미부위(cauda equina) 부위의 신경근(nerve root) 및 좌골신경(sciatic nerve)을 채취하였으며, 채취된 신경조직들은 액화질소를 이용하여 급속히 냉장되었다. 이와같이 준비된 냉동조직들로부터 조직절편을 얻은 후 일반적인 방법에 따라 H&E 염색, Luxol-fast blue 염색 및 Massons trichrome 염색 등을 실시하였고 광학현미경 하에서 각각을 분석하였다.

5. EAN 말초혈액에서의 CD5 양성 B-림프구 측정

EAN 실험동물의 심장을 천자(puncture)하여 각각의 실험동물로부터 말초혈액을 채취하여 $CD5^+$ B-림프구의 발현빈도를 측정하였으며, 검사방법을 간단히 기술하면 다음과 같다. 먼저 채취된 말초혈액에 Histopaque-1077 (Sigma, St Louis, MO, USA)을 중첩시키고 2,000 rpm의 속도로 약 30분간 원심분리하여 단핵구를 분리하였다. 얻어진 단핵구들을 PBS용액으로 세척한 다음 세포수를 50ul당 1×10^6으로 조정하였다. 이 세포들의 면역형광염색을 위해서는 일정한 파장에서 형광을 발색하는 fluorescein isothiocyanate (FITC) 및 phycoerythrin(PE)이 부착된 단클론성 항체에 이중

Table 1. *Experimental allergic neuritis and CD_5^+ B-lymphocyte expression.*

Lewis rats	Antigens immunized	Methods	Clincal weakness	CD5+B-lmpocyte expression
Experimental group				
1	Total myelin	2500ug x2 SC	+	2.38%
2	Total myelin	2500ug x2 SC	+	3.50%
3	P0 protein	1500ug x2 SC	+	2.50%
4	Total myelin	2500ug x2 SC	none	1.25%
5	P0 protein	1500ug x2 SC	none	2.32%
Control group				
1	-	-	none	2.66%
2	-	-	none	0.82%

반응시킨후 FACScan (Beckon-Dickinson, San Jose, Ca ,USA)으로 분석하였다[15]. 모든 실험조작에는 세포가 겹쳐지는 capping 현상 또는 감염을 최소화하기 위해 0.04% sodium azide (Sigma, St Louis, MO, USA), 5% heat inactivated FCS 및 Ca^{+2}, Mg^{+2} 등이 포함된 PBS등이 사용되었다.

분리된 단핵세포구중 CD5+ B-림프구의 발현정도를 분석하기, 위해 B-림프구 및 CD5 항원에 각각 반응하는 FITC conjugated anti-rat CD45RA 항체(Pharmingen, San Diago, Ca, USA)와 R-PE conjugated anti-rat CD5 항체 (Pharmingen, San Diago, Ca, USA)로 이중 염색하였다. 염색과정후에는 air cooled argon 레이저를 투여하는 FACScan 계기를 이용하여 FITC 및 PE 형물질광에 양성반응을 보이는 림프구의 비율을 측정하였으며, 분석된 결과는 logarismic amplification을 거쳐 자동적으로 도표에 표시되었다(Figure 3)[16].

연구 결과

1. 실험적 말초신경염 (EAN)의 유도

앞서 기술한 방법에 따라 말초신경 수초의 단백을 주사한 11마리의 Lewis rat중 3마리에서 EAN 동물모델이 유도된 것으로 판단되었다(Table 1). total myelin을 주사한 5마리 중 2마리에서, P_0 단백을 주사한 2마리 중 1마리에서 대조군과 비교할 때 분명한 활동력 저하 및 근력약화 현상이 관찰되었으나, P_1 단백을 주사한 3마리와 P_2 단백을 주사한 1마리 실험동물에서는 이와 같은 임상증세가 뚜렷이 관찰되지 않았다. EAN이 유도된 실험동물의 경우 total myelin및 P_0 단백을 주사한지 4주경 부터 움직임이 둔하기 시작하였고 꼬리를 잡고 끌어당길 때 저항하는 정도가 약하였다.

Table 2. *Motor and Sensory Studies in Normal Lewis Rats*

	Mena value (n=11) (mean (SD)	Normal
Motor conduction		
Terminal latency (msec)	0.88±0.10	1.08
Distal CMAP (mv)	7.04±2.4	5.29*
Poroximal CMAP (mv)	5.93±2.29	4.42*
Motor NCV (m/sec)	32.0±3.6	24.8
Sensory conduction		
Sensory CNAP (uv)	7.96±3.0	5.20*
Sensory NCV (m/sec)	33.5±4.5	24.5

CMAP : compound muscle action potential, CNAP : compound nerve action potential, Distal CMAP : stimulated at ankle, Proximal CMAP : stimulated at sciatic notch,
* : lowest amplitude among individual data.

2. EAN에서의 전기생리적 소견

EAN 동물모델에서의 전기생리적 소견을 평가하기 위하여 먼저 정상 대조군에서의 정상치를 조사하였다. EAN 동물모델과 연령 및 체중등이 비슷한 11 마리의 정상 Lewis rats에서의 전기생리적 성적은 발목부위를 자극하였을 경우 잠복기(terminal latency, TL)는 0.88±0.10msec, CMAP 전위는 7.04±2.4mv 이었고, 좌골패임 부위를 자극하였을 경우 CMAP 전위는 5.93±2.29mv으로 이를 이용하여 계산된 발목-좌골패임 구간의 운동전도속도(motor NCV)는 32±3.6m/sec 이었다. 반면 발가락-발목 구간의 감각전도속도(sensory NCV)는 33.5±4.5m/sec, CNAP의 전위는 7.96±3.0uv 이었다(Table 2).

Total myelin 주사로 유도된 EAN 동물모델 (EAN 1) 에서는 처음 주사후 4주 시기에 실시한 신경전도 검사상 심한 이상소견을 나타내었는데, 발목부위 자극에 의해 잠복기가 2.0msec로 정상 수치에 비교할 때 뚜렷이 지연되었고, CMAP 전위 진폭이 0.37mv로 정상 하한치 5.29mv에 비교할 때 매우 낮았으며, 운동전도속도도 18.0m/sec로 다소 감소되었다(Table 3). 이때 CMAP는 Figure 1에서와 같이 발목 및 좌골패임 부위

를 각각 자극하여 기록한 CMAP duration도 20.5 msec, 22.3msec 정도로 정상치 (8 10msec)에 비교할 때 2배 정도 길어지는 등 파형의 흐트러짐 현상(dispersion phenomenon)이 뚜렷하였다(Fig. 1). 그외 감각신경검사에서는 발가락-발목 구간에서 전기자극에 의해 감각파형이 관찰되지 않았다.

P0 단백주사로 유도된 EAN 동물모델 (EAN 3)에서는 잠복기가 0.8msec, 운동전도속도 27m/sec, CMAP 진폭이 6.2mv로 정상범위내 소견을 보였으며, 감각신경검사에서는 전도속도가 15m/sec로 정상 수치에 비교할 때 감소되었으며, CNAP 진폭도 2.8uv로 정상 하한치 5.20uv에 비교할 때 낮았다(Table 3).

Table 3. *Electrophysiological Features in Experimental Allergic Neuritis Animal Model*

Motor Conduction	EAN animal model			Normal value
	EAN 1	EAN 2	EAN 3	
Terminal latencis (msec)	2.0*	1.0	0.8	1.08
Distal CMAP (mv)	0.37*†	1.02*	6.2	5.29
Proximal CMAP(mv)	0.49*†	0.74*	5.5	4.42
Motor NCV (m/sec)	18.0*	25.0	27.0	24.8
Sensory Conduction				
CNAP (uv)	NP*	1.79*	2.8*	5.20
Sensory NCV (m/sec)		33.0	15.0*	24.5

*: mean abnormal findings.

†: mean the increased CMAP duratin and dispersion phenomenon.

3. EAN에서의 병리조직학적 소견

Total myelin을 주사하여 유도된 3마리의 EAN 동물모델에서 마미신경(cauda equina) 부위의 신경근(root) 및 좌골신경(sciatic nerve)을 각각 수집하여 병리조직학적 소견을 관찰하였다. 특징적인 소견으로 H&E 염색에서 림프구의 침윤이 관찰되었으며 Luxol-fast blue 염색에서 국소적으로 신경섬유의 탈수초(demyelination) 현상이 관찰되었다 (Fig. 2). 그러나 같은 EAN 동물모델 3마리의 좌골신경 조직 모두에서는 림프구의 침윤이나 국소적 탈수초 현상 등이 관찰되지 않았다.

4. EAN 말초혈액에서의 CD_5^+ B-림프구의 발현

말초신경 수초단백을 주사한 11마리의 실험동물중 EAN 동물모델이 유도된 3마리, EAN 동물모델이 유도되지 않은 2마리, 및 대조군 2마리의 Lewis rat들을 일정시간 때에 희생시키고 이들의 말초혈액 중 $CD5^+$ B-림프구의 발현정도를 측정하였다. 결과는 Table 1에서와 같이 FITC conjugated anti-rat CD45RA 및 R-PE conjugated anti-rat CD5 항체에 이중염색을 동시에 나타내는 비율은 EAN이 유도된 3마리의 실험동물에서 각각 2.38%, 3.50%, 2.50% 였으며, 대조군 2 마리에서 각각 2.66%, 0.82%이었다(Fig. 3). 반면 EAN이 유도되지 않은 실험동물 2 마리에서 $CD5^+$ B-림프구를

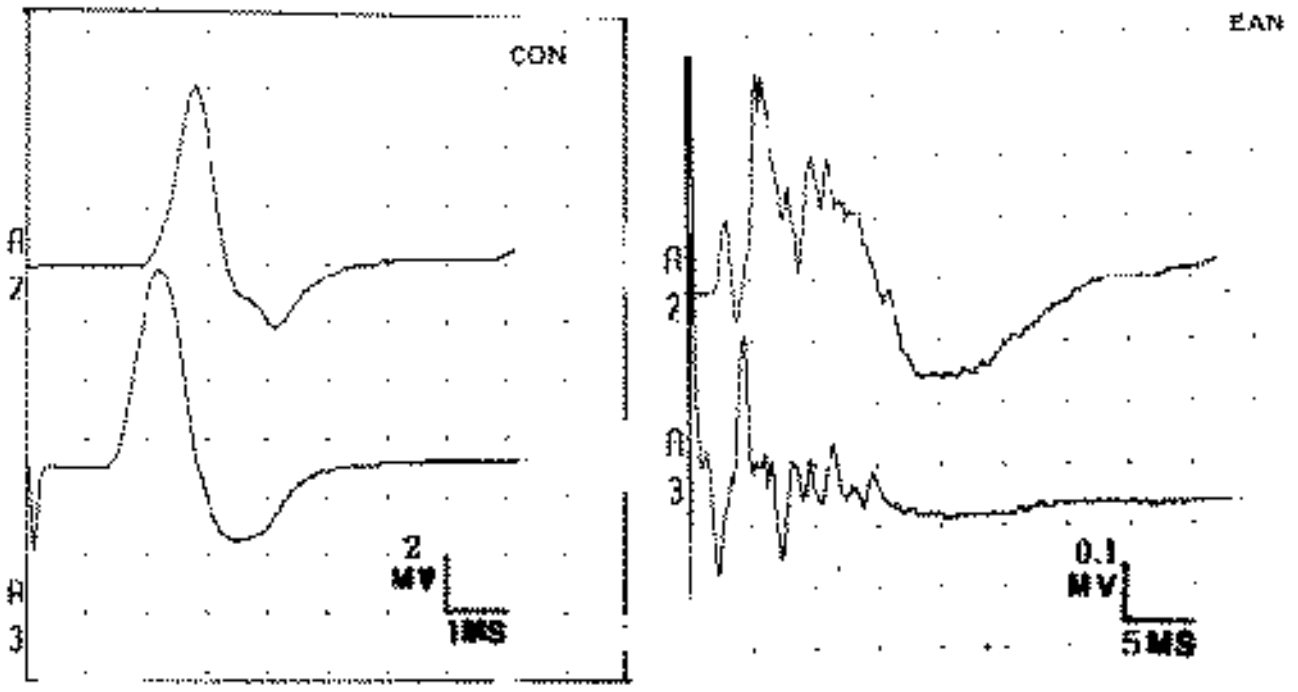

Figure 1. *Electrophysiological features in normal control and EAN 1 animal model. EAN 1 showed markedly decreased amplitude of com - pound muscle action potential (CMAP), increased duration of CMAP with dispersion phenomenon and decreased motor conduction velocity between ankle-sciatic notch (EAN), compared with those in normal control (CON).*

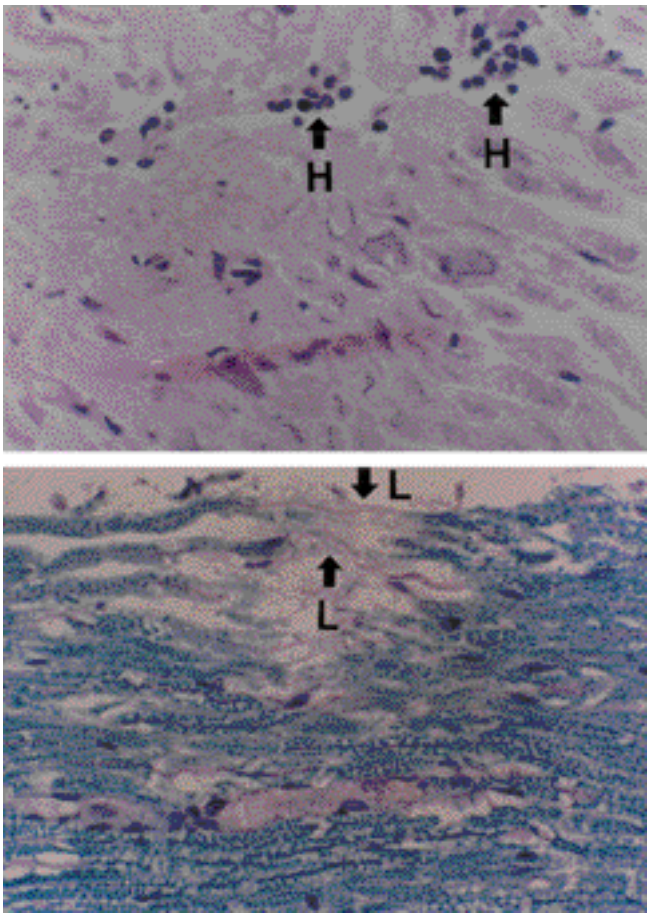

Figure 2. *Histopathological features in nerve root of EAN 1 animal model. H&E and Luxol-fast blue staining of nerve root of cauda equina showed moderate degree of lymphocyte infiltrates in endoneurim (arrow H) and focal demyelination (arrow L), respectively.(H&E x400, Luxol-fast blue x400)*

나타내는 비율은 각각 2.66%, 0.82%이었다.

고 찰

Gullain Barre 증후군(GBS)은 1주~2주, 또는 길어도 3주 이내에 전체적 임상양상의 악화 과정을 밟는 비교적 급성의 신경병증으로, 70% 정도에서는 발병이전에 신체감염, 예방주사등의 병력을 보인다는 점에서 오래전부터 면역기전과 연관된(immune mediated) 말초신경질환으로 생각되었다[17]. 이외에도 GBS의 자가면역성 발생기전을 설명하는 또 다른 근거로 말초혈액 및 뇌척수액등의 증가된 면역글로부린 수치가 임상증세의 호전과 더불어 감소되는 현상[18], cold agglutinin등의 자가항체의 검출[19], 및 혈액내에 존재하는 항원-항체 복합체등이 있었다. 그러나 아직도 신체감염과 연관하여 어떤 기전에 의해 GBS의 임상증세가 시작되는지(initiated), 이들과 관련하여 어떤 인체내 반응에 따라 탈수초성 말초신경병변이 진행되는지, 또는 어떤 말초신경의 항원이 GBS질병을 유발시키는지(triggered) 등이 아직도 명확하게 규명되지 않은 상태이다[20].

지금까지 여러 연구자들에 의해 GBS와 임상적 및 병리적 특성이 유사한 말초신경 동물모델이 말초신경의 여러가지 구성성분 즉, total myelin, P_0, P_1, P_2, galactocerebroside 등을 동물에 주사함으로서 유도되었다. 이들 항원들중 P_2 단백은 cell-mediated 기전에 관계되어 EAN을 일으키며, galactocerebroside 물질은 humoral immunity에 더 관계되는 면역기전에 의해 EAN 동물모델을 일으키는 것으로 알려져 있다[6,8,21,22].

본 연구에서는 total myelin, P_0, P_1, P_2 등을 주사한 11마리 모두에서 EAN의 임상양상을 관찰하지는 못하

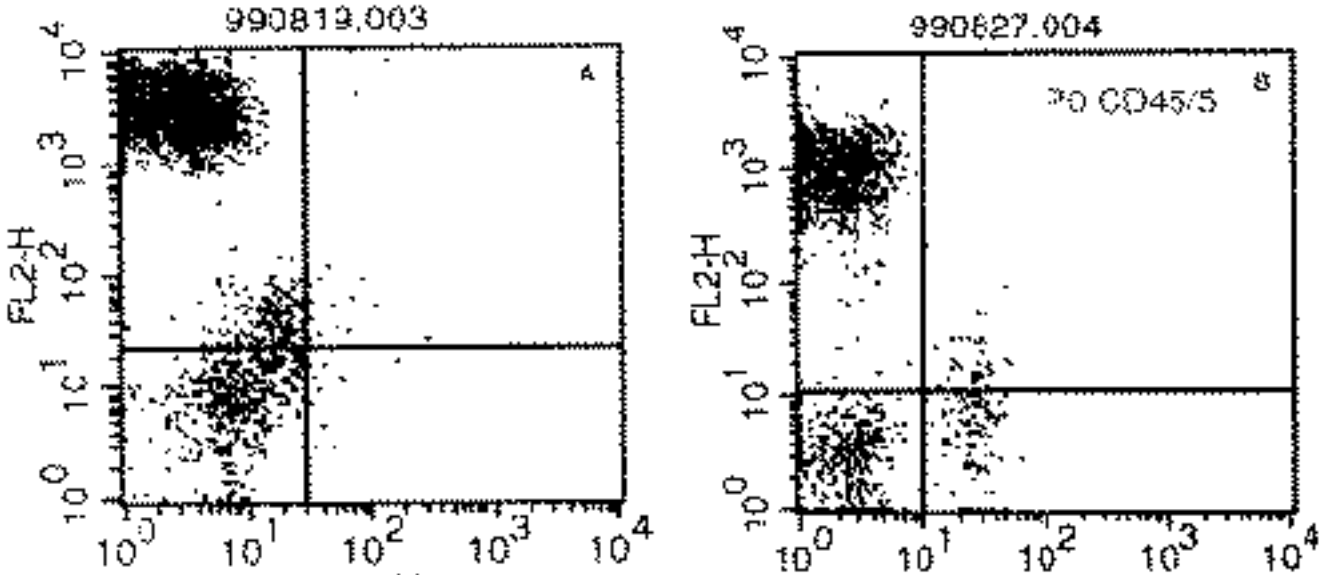

Figure 3. *CD5 B-lymphocytes expression in peripheral blood in normal control and in EAN 3 animal model. The frequency of CD5 B-lymphocyte in EAN 3 was 2.50% (A), which was not significantly high, compared with 0.82% in normal control (B).*

였고, 단지 total myelin 을 주사한 5마리중 2마리와 P_0 단백을 주사한 2마리중 1마리에서 EAN을 유도할 수 있었다. EAN 동물모델의 유도는 실험동물의 종류에 따라 차이가 있을 수 있으나 본 실험에서는 주사후 4주 정도가 지나면서 실험군 동물에서 대조군에 비교할 때 활동력의 감소가 관찰되었다. 이는 일반적으로 항원을 주사한 후 항체의 생성이 활발하게 진행되는 3-4주의 기간과 어느정도 의미있는 상관성을 보인다고 볼 수 있다.

Total myelin 및 P_0 주사에 의해 유도된 EAN 동물모델 모두에서 전기생리적 이상소견이 관찰되었다. 전체적 이상소견은 P_0 보다 total myelin 을 주사한 동물모델에서 매우 심한 소견을 나타냈으나 일괄된 현상은 아니었다(Table 3). 정상대조군 동물에서 발목부위 자극에 의해서 복합근활동전위(CMAP)의 진폭이 7.04±2.4mv, CMAP duration이 8~10msec, 음전위-양전위의 bi-phasic 형태를 나타내었으나, EAN 1에서는 CMAP 진폭이 현저히 감소되었으며 CMAP duration이 2배 이상 증가되었고 multi-phasic 형태를 보였다. 이들 신경에서의 운동전도속도의 감소는 CMAP 진폭의 감소에 비해 현저하지는 않았으나 CMAP duration의 정도가 매우 뚜렷하여 축삭변성 보다는 탈수초 현상이 중요하게 작용했을 것으로 판단되었다. 이들의 병리조직적 병변이 축삭의 퇴행(degeneration) 문제인지 또는 탈수초(demyelination) 현상 때문인지를 평가하기 위해서는 전기생리적 검사 소견을 추적관찰 하는 것이 매우 중요할 것으로 사료된다. 반면 P_0 단백을 주사하여 유도된 EAN 3에서의 전기생리적 이상은 주로 감각신경에 국한되어 관찰되는 등 비교적 경미하였다.

EAN 동물모델에서의 병리조직학적 이상 소견들은 전기생리적 이상에 비해 비교적 경미하였다. 심한 전기생리적 이상소견을 나타냈던 EAN 1의 좌골신경 조직에서는 정상 대조군의 조직과 비교할 때 특이한 이상소견을 나타내지 않았으나, 신경근 부위의 조직에서는 중정도(moderate)의 림프구 침윤과 경미한 탈수초 현상이 관찰되었다(Fig. 2). P_0 단백의 주사에 의해 유도된 EAN 3 동물모델의 좌골신경 및 마미 신경근 조직에서는 이와같은 림프구 침윤이나 탈수초 현상이 더욱 미미하였으며 혈관 주위 염증세포 침착도 뚜렷하지 않았다. 이는 P_0 단백을 이용한 Waksman 과 Adams의 EAN 동물모델에서의 탈수초 현상과 혈관 주위의 염증세포 침착 소견과 다소의 차이를 보인다고 볼 수 있다[4]. 그러나 본 연구의 두 종류 EAN 동물모델의 병리조직학적 소견은 인간의 "급성 염증성 탈수초성 다신경근병증(AIDP)"에서의 특징적인 림프구 침윤 및 탈수초 현상을 거의 대변하는 것으로 사료된다.

CD_5는 림프구에 널리 존재하는 일종의 항원성격을 지니는 표식자(surface marker)로 생쥐에서의 Ly-1와 인간에서의 Leu-1를 총칭한다[23]. CD_5 표식자는 대부분의 T-림프구와 일부의 B-림프구에 존재하는데, 일반적으로 rheumatoid arthritis, chronic B-cell leukemia등의 자가면역성 질환에서 특히 증가된 것으로 알려져 있다[24]. 이들 질환에서와 같이 특징적 자가면역성 특성을 지닌 질환들에서 CD_5^+ B-림프구의 발현빈도가 증가되었으므로 이는 자가항체를 생성하는 특성을 지닌 B-림프구의 활성이 증가된 것으로 해석되었다.

본 연구에서 생체내에 존재하는 항원을 주사하여 실험적 EAN을 유도하고자 하였으며, 따라서 유도된 EAN 실험동물의 말초혈액에는 CD_5^+ B-림프구가 증가될 것이라는 가정하에 EAN의 발생이 자가면역성 이라는 간접적 단서를 유추하고자 하였다. 그러나 연구 결과에서와 같이 유도된 EAN 동물모델에서의 성적은 정상대조군과 의미있는 차이를 나타내지 않았다. Total myelin 및 P_0 주사한 EAN 동물모델에서는 병태생리과정에서 humoral immunity와 깊은 관련을 보이지 않았기 때문으로 해석될 수도 있으며, 실제 CD_5^+ B-림프구의 활성이 증가되었으나 EAN 동물을 희생시킨 시점에 시기적으로 감소되었기 때문으로도 해석될 수 있을 것이다.

따라서 이를 더 자세히 규명하기 위해서는 각각 EAN 동물모델에서 특정 항원에 대한 항체의 증가를 확인하는 연구와 이들에서의 CD_5^+ B-림프구 발현빈도 결과를 비교하는 분석방법이 긴요할 것으로 사료된다.

결 론

저자들은 소의 마미에서 분리한 P_0, P_1, P_2, total myelin protein등의 말초신경단백을 실험동물(Lewis rat)에 주사하여 실험적 말초신경염(EAN)을 유도하였고, 이들에서 나타나는 말초신경의 전기생리적 및 병리조직학적 특성및 말초혈액에서 CD_5^+ B-림프구의 발현정도를 평가하여 다음의 결과를 얻었다.

수초단백 P_0, P_1, P_2, total myelin 을 주사한 11마리의 실험동물 중 3마리에서 실험적 말초신경염(EAN)이 유도되었으며, 이들 단백중 total myelin을 주사한 경우 가장 뚜렷한 근력약화등 EAN의 임상양상이 관찰되었다. 이들에서 보이는 특징적인 전기생리적 소견은 신경전도의 감소, 복합근활동전위(CMAP)의 흐트러짐 현상(dispersion phenomenon), CMAP 전위감소등을 나타내는 탈수초성(demyelinating) 병변 소견이였으며, 병리조직학적으로는 신경근 부위의 림프구 침윤, 신경섬유의 탈수초 현상이 뚜렷하여 탈수초성-염증성 신경병증의 소견을 보였다. 그러나 EAN 동물모델의 말초혈액에서의 CD_5^+ B-림프구의 발현비율은 정상대조군과 비교할 때 의미있게 증가된 소견을 나타내지 않았다.

따라서 저자들은 말초신경의 수초단백을 주사하여 유

도한 실험적 말초신경염 (EAN)에서 전기생리적 및 병리조직학적 특성을 분석하여 Gullain Barre 증후군등 몇몇 말초신경염이 자가면역성 기전에 의해 발생될 수 있다는 간접적 단서를 확인할수 있었으나, 이와같은 병변이 항체생성의 증가에 의한 결과라는 다른 각도에서의 단서를 확인할 수는 없었다.

REFERENCES

1. Ropper AH, Wijdicks EFM, Truax BT. *History of Landry-Guillain-Barre-Strohl syndrome.* In Guillain-Barre Syndrome F.A. Philadelphia, Davis Company, 1991 PP3-17.
2. Pleasure. DE and Schotland DL. *Acute neuropathies* : In Lowland LP ed, Merritt 's textbook of Neurology, 8th edition, Philadelphia, Leas Febiger;609-612.
3. Cook SD and Dowling PC. The role of autoantibody and immune complexes in the pathogenesis of Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol* 1981;9(suppl.):70-79.
4. Waksman BH Adams RD. Allergic neuritis. *J Exp Med* 1955; 102:213.
5. Brostoff S, Burnett P, Lampert P. and Eylar EH. Isolation and charcterization of a protein from sciatic nerve demyelination responsible for experimental allergic neuritis. *Nature(New Biol.)*1972;235:210-212.
6. Lees MB, Brostoff SW. Proteins of myelin, in : Myelin. *Morell P ed, New York Plenum Press* 1984:197-217.
7. Saida K, saida T, Brown MJ. and Silberberg DH. In vivo demyelination induced by intraneural injection of anti-galactocerebroside serum: a morphologic study. *Am J Pathol* 1979; 95:99-110.
8. Saida K, Saida T, Pleasure D and Nishitani H. P2 protein-induced experimental allergic neuritis: an ultrastuctural study. *J Neurol Sci* 1983;62:77.
9. Saida t, Saida K and Nishitani H. Galactocerebroside-induced experimental allergic neuritis: a possible model of chronic inflammatory demyelinative polyradiculoneuropathy. *Neurol* 1983;33(Suppl.2):82.
10. Latov N, Braun PE, Gross RB. Plasma cell dyscracia and peripheral neuropathy : identification of the myelin antigens that react with human paraprotein. *Proc Natl Acad Sci* 1981; 78:7139-7142.
11. Koski CL, Humphrey R, Shin ML. antiperipheral myelin antibody in patients with demyelinaing neuropathy:quantative and kinetic determination of serum antibody by complement component 1 fixation. *Proc natl Acad Sci* USA 1985;82:905-909.
12. Koski CL. characterization of complement fixing antibodies to peripheral nerve myelin in Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol* 1990;27(suppl)S44-47.
13. Pleasure D. The structural proteins of the peripheral nerve, in : Peripheral neuropathy. Dyck PJ, Thoruas PK, Lambert Ch< Bunge R, eds, Philadelphia, WB Saunders 1984:441-452.
14. Link H, Wahren B and Norrby E. Pleocytosis and immunoglobulin changes in cerebrospinal fluid and herpes virus serology in patients with Guillain-Barre syndrome. *J Clin Microbiol* 1979;9:305-316.
15. Lee KW, Lee SH, Kim HJ, Choi YM, Motomura M. Experimental autoimmune myasthenia gravis and CD5+ B-lymphocyte expression. *J Korean Med Sci.* 1999;14:75-79.
16. Lee KW, Inghirami G, spatz L, Knowles DM, Latov N. The B-cell that express anti-MAG antibodies in neuropathy and non-malignant IgM monoclonal gammopathy belong to the CD5 subpopulation. *J Neuroimmuno* 1991;31:83-89.
17. Behan PO, Lamarche JB, Feldman RG and Sherremata WA. Lymphocyte transformation in the Guillain-Barre syndrome. *Lancet* 1970;i:421.
18. Cook S, Dowling PC and Whitaker JN. The Guillain-Barre syndrome. Relationship of circulating immunocytes to disease activity. *Arch Neurol* 1970:22;470-474.
19. Dowling PC and Cook SD Whitaker JN. Cold agglutinin-positive Guillain-Barre syndrome. Trans *Am Neurol Assoc* 1970; 95:234-235.
20. Fry JM, Weissbarth S, Lehrer GM. Cerebroside antibody inhibits sulfatide synthesis and myelination and demyelination in cord tissue culture. *Science* 1974;183:540-542.
21. Astrom KE, Waksman BH. The passive transfer of experimental allergic encephalomyelitis and neuris with living lymphoid cells. *J apthol Bacteril* 1962;83:89-105.
22. Linington C., Izumo S and Suzuki M., Uyemura K., Meyermann R. & Wekerle H. A permanent rat T cell line that mediates experimental allergic neuritis in the Lewis rat in vivo. *J Immunl* 1983;133:1946-1950.
23. Ragheb S and Lisak RP. The frequency of CD5 B-lymphocytes in the peripheral blood o fpatients with myasthenia gravis. *Neurology* 1990;40:1120-4.
24. Casali P, Burastero SE, nakamura M, Inghirami G, Notkins A. Human lymphocytes making rheumatic factor and antibody to ssDNA belong to Leu-1+B-cell subset. *Science* 1987;236:77-81.