

한국재래산양태아 및 신생아 뇌에서 별아교세포의 전자현미경적 연구

송치원, 김무강*, 류시윤, 이강이¹, 박일권, 이미영, 권효정,
박미선, 이경열, 이두환, 신현국, 최윤석, 장규태²
충남대학교 수의과대학, ¹대전대학교 한의과대학, ²한국생명공학연구원

Ultramicroscopical Study on the Astrocytes in Fetal and Neonatal Brains of Korean Native Goat

Chi-Won Song, Moo-Kang Kim*, Si-Yoon Ryu, Kang-Iee Lee¹,
Il-Kwon Park, Mi-Young Lee, Hyo-Jung Kwon, Mi-Sun Park,
Kyoung-Youl Lee, Doo-Hwan Lee, Hyun-Guk Shin,
Yoon-Suk Choi and Kyu-Tae Chang²

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, ¹College of Oriental Medicine,
Taejon Univesity, ²Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology

(Received April 2, 2001)

ABSTRACT

This study, the ultrastructure of radial glial cells in the fetuses (the 60th, 90th, 105th 120th of gestation) and neonate brains of korean native goat were investigated by immunohistochemical method and transmission electron microscopy.

1. In the 60th day of gestation, mitochondria and many glycogen body were observed in the radial glial cells.
2. In the 90th day of gestation, mitochondria, many glycogen body and rough endoplasmic reticulum were observed.
3. In the 95th day of gestation, Golgi's apparatus was found.
4. In the 120th day of gestation, Endfeets of radial glial cell attached vessel wall were observed.

Key words : Development, Korean native goat, Radial glial cell, Transmission electron microscopy

서 론

Huang et al.(1995)과 Park & Lee (1996)는 별아교세포

포의 핵이 타원형이고 염색질(chromatin)은 염색이 잘 안되며 중간 중간에 이질염색질(heterochromatin)이 과립상으로 나타나 절단되는 면에 따라서는 핵이 원형으로 나타나는 경우도 있고 세포체의 세포질은

*Correspondence should be addressed to Dr. Moo-Kang Kim, Department of Histology, College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, 220 Kung-dong, Yuseong-ku, Taejon, Korea. Ph.: 042-821-6752, FAX: 042-825-6752, E-mail: mgkim@cnu.ac.kr
Copyright © 2001 Korean Society of Electron Microscopy

거의 구별할 수 없을 정도로 적고 열게 염색되며 세포체의 세포질에 나타나는 세포소기관에는 약간의 용해소체, 골지복합체, 미토콘드리아가 있고 과립형질 내세망이나 자유리보솜은 드물게 나타난다고 보고하였다. 그리고 Eng (1985)은 별아교세포의 세포질과 돌기 내에는 직경이 10 nm 정도인 수많은 아교미세섬유 (glial filament)가 있으며 이는 산성단백질로 구성된 일종의 중간미세섬유 (intermediate filament)로 별아교세포와 슈반세포에만 존재한다고 하였다.

Park & Lee (1996) 및 Doucette et al. (1994)은 별아교세포 돌기중의 일부는 종말부분이 넓고 편평하게 확장되어 다른 별아교세포 돌기의 종말부분과 함께 모세혈관을 완전히 둘러싸고 있으므로 (내측아교세포 경계막 internal glial limiting membrane), 이러한 돌기를 혈관돌기 (perivascular feet) 또는 혈관종말발 (vascular end-feet)이라고 하며, 뇌와 척수를 둘러싸고 있는 연질막 (pia mater) 바로 아래에서도 이러한 막 (외측아교세포경계막 external glial limiting membrane)이 있고 또한 축삭과 여러개의 수상돌기가 복잡한 시냅스복합체 (synaptic complex)를 이루는 부분을 돌기의 종말부분이 둘러싸주는 경우도 있다는 보고를 하였다.

별아교세포의 기능에 대해서는 혈관주위의 경계막으로 혈관 내의 물질이 신경조직으로 쉽게 들어가지 못하도록 막는 뇌혈관장벽의 역할을 할 것이라고 추측하였으나, 지금에 와서는 별아교세포의 혈관돌기 사이로 혈관내의 물질이 자유롭게 드나든다는 것을 알게되었고, 대신 모세혈관 내피세포의 외측면에 있는 폐쇄연접이 주로 뇌혈관장벽의 역할을 할 것이라는 Park & Lee (1996)의 보고가 있다. 별아교세포는 혈관 및 연질막과 같은 결합조직 구조에 붙어 있고 신경조직 사이에서 지지작용을 한다. 또한 신경원에 탈분극이 일어날 때 세포외액으로 나오는 칼륨 이온을 흡수해 세포외액에 칼륨 농도가 높아지는 것을 막고, 세포외액의 산성도를 조절하며 또한 손상된 신경조직이 있을 때 증식하여 더 이상 손상이 확산되는 것을 막아주는 역할도 한다고 하였다.

한국재래산양은 한국의 산간지역과 농촌지역에만 분포하고 있는 재래종이지만 아직까지 한국 내에서 그 실험빈도가 많지 않다. 그리고 발달단계에 있는

신경계에 대한 연구는 다른 실험동물에서도 미흡한 상태이다. 현재까지 한국재래산양을 대상으로 한 해부학적인 연구로는 Lee et al. (1996, 1995, 1993, 1992), Lee et al. (1996), Lee HS et al. (1996)이 성체를 대상으로 Choi (1984), Kim (1997), Hur et al. (1995, 1994a, b), Lee et al. (1994), Jung et al. (1995, 1994), Song et al. (1998a, b)이 태아 및 신생아를 대상으로 연구 정도만이 보고되어있지만 한국재래산양의 태아 및 신생아에서 중추신경계에 대해 연구한 보고는 거의 없고 더군다나 신경세포의 이주를 안내하는 방사아교세포와 별아교세포에 대한 연구는 아직 없다. 이러한 점에 착안하여 한국재래산양의 태아 및 신생아를 대상으로 하여 발생 과정 중 중추신경계에 분포하는 방사아교세포의 미세구조를 연구하여 앞으로의 뇌신경학 분야의 연구 및 학문에 기초적 자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험동물

건강하다고 생각되는 한국재래산양 (25~30 kg) 암컷 10마리를 이용하여 임신 60일령, 90일령, 95일령, 105일령, 120일령 재래산양으로부터 제왕절개를 통해 태아를 적출하고 신생아는 출산직후에 희생시켜 이용하였다.

2. 면역조직화학적 방법

제왕절개를 실시하여 얻어진 각 일령의 한국재래산양 태아의 흉강을 열고 심장에서 나오는 오름대동맥을 통하여 canular를 삽입하여 0.1 M PBS (pH 7.2) 로 10분간 수세하고 50분간 4% paraformaldehyde로 전고정을 실시한 후, 골점자를 사용하여 뇌를 끄집어 내어 4% paraformaldehyde (4°C)에 넣고 48시간 후고정시킨 후 빙결방지를 위해 10%, 20%의 sucrose에 각각 48시간씩 침지시킨 다음 30% sucrose에 뇌가 가라앉을 때까지 침지시켜 deep freezer에 냉동 보존하면서 필요에 따라 뇌를 끄집어 내어 실험에 이용하였다. 산양의 뇌를 정중시상면이 되게 절단한 후 그 뇌 절반씩을 40 μm 두께로 연속냉동절편을 실시

하였다. 뇌의 절편을 0.1 M PBS에 5분간 3회 수세하고, 1% H₂O₂ (in 0.1 M PBS)에 30분간 그리고 1% normal swine serum에 1시간 동안 반응시킨 다음 다시 0.1 M PBS에 5분간 3회 수세를 실시한 후, 1차항체 (rabbit anti cow GFAP)를 72시간 4°C에서 반응시키고 이어 0.1 M PBS에 5분간 3회 수세를 실시하였다. 2차항체 (biotinylated Anti rabbit IgG)로 24시간 반응시킨 다음 0.1 M PBS로 다시 5분간 3회 수세하였다. Avidin-biotin-peroxidase complex (vector kit)를 12시간 반응시킨 다음 0.1 M PBS로 5분간 3회 수세한 후 3,3' DAB 용액으로 1분간 발색시킨 다음 1차 증류수에 발색을 정지시켜 광학현미경하에서 관찰한 후 면역반응을 나타낸 세포를 확인하였다.

3. 투과전자현미경적 방법

면역염색을 마친 조직을 2.5% glutaraldehyde 용액에 24시간 전고정을 실시한 후 1% osmium tetroxide에 2시간 후고정시켰다. 고정 후 0.1 M PBS로 수세를 실시한 후 통상적인 alcohol series와 propylene oxide를 통하여 탈수를 실시하였고 Epon 812 수지에 포매하였다. 그리고 ultrathin section과 uracil acetate와 lead citrate로 염색을 실시한 후 전자현미경 (Hitachi 700)을 75 V로 조절하여 관찰하고 촬영한 다음 현상 및 인화한 사진을 이용하였다.

결 과

뇌에 있어서 anti-GFAP에 면역반응을 나타낸 방사아교세포를 관찰한 결과 핵의 형태는 원형에 가까운 타원형이었으며, 세포질에서 임신 60일령에서는 다수의 glycogen 과립과 사립체 그리고 소수의 과립형질내세망만이 관찰되었지만 일령이 점차 증가함에 따라 증가된 형질내세망과 골지체 등이 관찰되었으며 방사아교세포들이 혈관주위로 이동하는 것을 관찰할 수 있었다.

1) 임신 60일령태아

핵의 형태는 원형에 가까운 타원형을 나타내고 있었으며, 세포소기관은 타원형의 사립체들이 다수로 관찰되었고 짧은 과립형질내세망이 소수 관찰되었고

glycogen 과립이 세포질 전반에 걸쳐 분포하고 있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

2) 임신 90일령태아

핵이 원형에 가까운 타원형으로 관찰되었으며 세포질에 잘 발달된 다수의 사립체와 소수의 과립형질내세망을 관찰할 수 있었고 glycogen 과립들이 소수 관찰되었다(Figs. 2, 7).

3) 임신 95일령 태아

핵은 원형에 가까운 타원형으로 관찰되었으며 세포질에 원형의 잘 발달된 다수의 사립체와 소수의 과립형질내세망, 끝부분이 완전히 부풀어오르지 않은 골지체를 관찰할 수 있었으며, glycogen 과립들이 소수 관찰되었다(Figs. 3, 8).

4) 임신 105일령 태아

핵은 부정형으로 관찰되었으며 세포질에 다수의 사립체와 소수의 형질내세망, 골지체가 관찰되었으며 glycogen 과립들이 소수 관찰되었다(Fig. 4).

5) 임신 120일령 태아

핵은 부정형으로 관찰되었으며 세포질에는 원형의 잘 발달된 다수의 사립체와 소수의 형질내세망, 끝부분이 부풀어 오른 골지체가 관찰되었으며 glycogen 과립들이 소수 관찰되었다(Fig. 5).

6) 신생아

핵은 약간 부정형으로 관찰되었으나 거의 타원형이었으며 세포질에 다수의 사립체와 소수의 형질내세망, 골지체들이 관찰되었으며 여전히 glycogen 과립들도 관찰되었다(Fig. 6).

7) 혈관주위이동

방사아교세포가 일령이 지나감에 따라 혈관쪽으로 더 가깝게 이동하고 있었으며 120일령에서는 혈관에 부착되어 종말발을 뻗고 있는 것이 관찰되었다(Figs. 9, 10).

고 찰

Eng et al.(1971)이 다발성 경화증(Multiple sclerosis)에서 GFAP에 대해 처음으로 관찰 보고한 이래

Raine (1984)가 이러한 경화증의 병소에 별아교세포가 급격히 증가를 한다고 보고하였다.

GFAP에 대한 한국재산양 뇌의 면역반응세포를 전자현미경적으로 관찰한 결과 임신 60일령에서는 핵이 타원형이고 세포질의 세포소기관은 사립체와 당원질 그리고 과립형질내세망이 관찰되었고, 임신 90일령에서도 역시 타원형의 핵과 사립체, 형질내세망, 당원질 등이 관찰되었지만 골지복합체는 임신 95일령 이후에서 비로소 관찰되었다. 그러나 골지체의 양쪽 끝부분이 부풀어오르지 않은 형태를 나타내므로 아직 골지체의 기능이 완전하지 않음을 알 수 있었다. 골지체의 양쪽 끝부분이 부풀어오른 형태는 임신 120일에서 관찰되었다. 신생아의 별아교세포는 Park & Lee (1996)의 핵은 타원형이고 핵질(chromatin)은 염색이 잘 안되며 중간 중간에 이질염색질(heterochromatin)이 과립상으로 나타나 일반적인 염색에서는 핵의 형태가 '감자(potato)'와 유사하게 보이지만 절단되는 면에 따라서는 핵이 원형으로 나타나는 경우도 있고 세포체의 세포질은 거의 구별할 수 없을 정도로 적고 열게 염색된다고 하였으며 세포체의 세포질에 나타나는 세포소기관에는 약간의 용해소체, 골지복합체, 사립체가 있고 과립형질내세망이나 자유리보솜은 드물게 나타난다고 한 내용과 유사하였다. 또한 한국재산양의 임신 90일령 태아에서 혈관주위로 이동하는 GFAP 면역반응세포들을 관찰할 수 있었고 120일령에서는 혈관에 부착되어 종말발을 뻗고 있는 GFAP 면역반응세포들을 관찰할 수 있었는데 두꺼비방사아교세포의 돌기가 혈관과 연질막부위로 뻗어 있었으며 돌기의 염색성은 짙은 것과 옅은 것이 혼재되어 있다고 Bodega et al. (1990)이 보고하였는데 본 연구에서와 같은 결과를 나타내고 있었다.

참 고 문 헌

- Bodega G, Suarez I, Fernandez B: Radial astrocytes and ependymocytes in the spinal cord of the adult toad (*Bufo bufo* L.). An immunohistochemical and ultrastructural study. *Cell Tissue Res* 260(2): 307-14, 1990.
- Choi SY: The study of development fetuses and physiological change among pregnancy of Korean native goat. Dong A Undergraduate school, 1984.
- Doucette R, Kott J, Westrum L: The development of glial fibrillary acidic protein-positive cells and the appearance of laminin-like immunoreactivity in fetal olfactory bulb transplants. *Brain Res* 649(1-2): 334-338, 1994.
- Eng LF: Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J Neuroimmunol* 8(4-6): 203-214, 1985.
- Eng LF, Vanderhaeghen JJ, Bignami A, Gerstl B: An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res* 28: 351-354, 1971.
- Huang MC, Kubo O, Tajika Y, Takakura K: Immunohistochemical and electron microscopic study of subependymal giant cell astrocytoma. *Noshuyo Byori* 12(2): 117-23, 1995.
- Hur CK, Kim CS, Jung SH: Development on the reticulum of fetuses and neonates in Korean native goat. *Korean J Vet Res* 34(4): 695-704, 1994a.
- Hur CK, Kim CS, Jung SH, Kim MK: Development on the omasum of fetuses and neonates in Korean native goat. *Korean J Vet Res* 35(1): 1-10, 1995.
- Hur CK, Kim CS, Kwak SD: Development on the lumen of fetuses and neonates in Korean native goat. *Korean J Vet Res* 34(4): 687-694, 1994b.
- Jung SH, Kim CS, Huh CK: Development on the esophagus of fetuses and neonates in Korean native goat. *Korean J Vet Res* 34(4): 679-686, 1994.
- Jung SH, Kim CS, Kwak SD: Development on the colon of fetuses and neonates in Korean native goat. *Korean J Vet Res* 35(1): 11-18, 1995.
- Kim CS: Histochemical study of development of trachea in fetuses and newborn of Korean native goat. *Korean J Vet Res* 37(2): 235-244, 1997.
- Lee HS, Lee IS, Kang TC: Immunohistochemical localization of neurotransmitter in the tongue of Korean native goat. *Korean J Vet Res* 36(2): 265-276, 1996.
- Lee IS, Lee HS, Kang TC, Lee SJ: Immunohistochemical localization of serotonin in midbrain periaqueductal gray of Korean native goat. *Korean J Vet Res* 28(4): 413-422, 1988.
- Lee IS, Lee HS, Kang TC, Won MH: Electron microscopic studies on the gonadotropes in the hypophysis of the Korean native goat. *Korean J Vet Res* 36(4): 763-772, 1996.
- Lee IS, Lee HS, Lee SJ: Anatomical study on the branches of

- Nervous ophthalmicus of the Korean native goat. Korean J Vet Res 32(4): 457-462, 1992.
- Lee IS, Lee HS, Lee SJ: Immunohistochemical localization of neurotensin in midbrain periaqueductal gray of Korean native goat. Korean J Vet Res 33(3): 361-368, 1993.
- Lee JH, Huh CK, Kim CS, Kwak SD: Development on the abomasum of fetuses and neonates in Korean native goats. Korean J Vet Res 34(2): 219-228, 1994.
- Lee JH, Ku SK, Lee HS: Ontogeny of calcitonin immunoreactive cells in the thyroid glands of Korean native goat. Korean J Vet Res 36(3): 513-520, 1996.
- Park KA, Lee WT: Neuroanatomy. Korea med pp. 101-105, 1996.
- Raine CS: Neurons, astrocytes and ependyma, in Textbook of neuropathology (Davis RL and Robertson DM eds) pp. 468-547, Williams and Wilkins, Baltimore, 1984.
- Song CW, Kim CS, Chung HS, Kim MK: Morphological study of development on the duodenum of fetuses and neonates in Korean native goat. Korean J of Lab Anim Sci 14(1): 21-26, 1998a.
- Song CW, Kim CS, Kim MK: Electron Microscopical study of development on the duodenum of fetuses and neonates in Korean native goat. Korean J of Lab Anim Sci 14(1): 27-36, 1998b.

< 국문초록 >

한국재산양의 임신 60, 90, 105, 120일령 태아 및 신생아의 뇌를 대상으로 면역조직화학적방법을 통하여 면역반응을 나타낸 방사아교세포를 투과전자현미경적 방법을 이용하여 그 미세구조를 연구한 결과 임신 60일령 태아의 방사아교면역반응세포는 소수의 사립체와 많은 당원질 및 과립형질내세망이 관찰되었으며 임신 90일령 태아 이후에서도 소수의 사립체, 많은 당원질 그리고 소수의 형질내세망이 관찰되었으며 임신 95일령태아에서 골지체가 관찰되었다. 그리고 임신 120일령에서 혈관에 부착되어 종말발을 뻗고 있는 GFAP 면역반응세포를 관찰할 수 있었다.

FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** GFAP immunoreactive cell of 60 days of gestation. N : nucleus, G: glycogen granule, M: mitochondria. (× 6,000).
- Fig. 2.** GFAP immunoreactive cell of 90 days of gestation. N: nucleus, E: rough endoplasmic reticulum, M: mitochondria. (× 10,000)
- Fig. 3.** GFAP immunoreactive cell of 95 days of gestation. N: nucleus, GO: Golgi's apparatus, M: mitochondria. (× 10,000)
- Fig. 4.** GFAP immunoreactive cell of 105 days of gestation. N: nucleus, M: mitochondria. (× 10,000)
- Fig. 5.** GFAP immunoreactive cell of 120 days of gestation. N: nucleus, GO: Golgi's apparatus, M: mitochondria. (× 10,000)
- Fig. 6.** GFAP immunoreactive cell of newborn. N: nucleus, M : mitochondria. (× 10,000)
- Fig. 7.** Rough endoplasmic reticulum of 90 days of gestation. E: rough endoplasmic reticulum. (× 10,000)
- Fig. 8.** Mitochondria of 95 days of gestation. M: mitochondria. (× 10,000)
- Fig. 9.** radial glial cell migrated to vessel. 95 days of gestation. N: nucleus, V: vessel, C: endothelial cell. (× 3,000)
- Fig. 10.** radial glial cell migrated to vessel. 120 days of gestation. N: nucleus, V: vessel, C: endothelial cell. (× 3,000)



