

# Theiler's virus에 감염된 마우스의 척수 신경교세포 배양과 면역세포학적 관찰

신 태 균  
제주대학교 수의학과  
(1991. 2. 4 접수)

## Culture of glial cells isolated from the spinal cord of demyelinating mice infected with Theiler's virus: An immunocytochemical study

Tae-kyun Shin

Department of Veterinary Medicine, Cheju National University, Cheju 690-756

(Received Feb 4, 1991)

**Abstract:** The mechanisms of demyelination in Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)-induced chronic central nervous system(CNS) disease are still unclear and are probably multifactorial. This study was intended to culture spinal cord cells isolated from TMEV-induced demyelinating mice. By Percoll density centrifugation of enzymatically dissociated tissue, the cells were collected and then cultured on poly-L-lysine-coated plastic coverslips for 2 weeks.

Oligodendrocytes, astrocytes and macrophages were identified using cell-type specific markers. Viral antigens were not present in oligodendrocytes and in astrocytes by double immunofluorescence. Affected mouse oligodendrocytes had less capacities of sheet formation and galactocerebroside immunoreactivity than those of control cells. These findings support the hypothesis that immune mediated mechanisms play an important role in the process of demyelination in this animal model.

**Key words:** picornavirus, demyelination, mouse, oligodendrocytes, astrocytes.

### 서 론

Theiler's murine encephalomyelitis virus(TMEV)<sup>1)</sup>는 마우스 소화관에서 분리된 picornavirus로써 급성 뇌염 또는 만성 수초탈락성 뇌척수염<sup>2,3)</sup>을 일으키며 특히 만성 경과를 취하는 수초탈락성 병변은 사람의 multiple sclerosis<sup>4)</sup>와 병리학적 소견이 유사하여 본 질병의 동물 모델을 제시되고 있다.

만성으로 수초탈락을 일으키는 TMEV는 뇌내접종 시 감염초기에는 신경세포에서 증식하고 시간이 경과

함에 따라 신경교세포에서 지속적인 감염<sup>5,6)</sup>을 일으키는 것으로 알려져 있으나 수초탈락기전에는 논란이 계속되고 있다.<sup>2,6)</sup>

virus에 기인한 수초탈락성 질병의 경과중에는 각각의 신경교세포들이 상호 밀접한 관련을 가지고 있으나 그 중 수초를 산생하고 유지시켜 주는 희돌기교세포의 역할은 매우 크다.<sup>7)</sup> 그러나 척수 조직절편에서는 세포 특이항체를 적용하여도 희돌기교세포의 경우는 명확하지가 않은 실정이며 더구나 본질병은 희돌기교세포에서 조직적합성항원<sup>8,9)</sup>이 중요한 기능을 담당할 것으로 추

이 논문은 1990년도 문교부 학술 연구조성비에 의한 자유공모프로젝트로 선정되어 연구되었음.

정하고 있으나 조직절편내에서는 이에 대한 동정에 많은 어려움이 있다. 따라서 회돌기세포의 특성을 추구하기 위하여는 이환 마우스의 척수로부터 신경교세포의 배양유지가 필요한 실정이다.

본 실험에서는 TMEV에 감염된 마우스의 척수로부터 신경교세포를 분리배양하고 virus의 감염성을 검사함과 동시에 회돌기교세포 및 성상교세포를 면역세포화학적 방법으로 동정하였기에 그 결과를 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

**Virus:** TMEV의 BeAn strain을 Dr. Howard L. Lipton<sup>8)</sup>으로부터 분양받아 BHK 세포주에 배양한 후 CPE(cytopathogenic effect)를 나타내는 2일째 채취하여 접종재료로 사용하였으며 동시에 virus 감염양성 대조군으로 이용하였다.

**실험동물:** TMEV에 감수성이 큰 4주령의 SJL<sup>10)</sup> 마우스(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)에 TMEV의 BeAn strain을  $10^3 \sim 10^4$  plaque-forming units(PFU)씩 우측 대뇌반구에 뇌내접종하였다.

**조직검사:** TMEV 감염후 30일째와 150일째의 두 시점에서 마우스 3마리씩을 3% glutaraldehyde(phosphate buffer)에 관류고정하고 osmic acid에 재고정을 거쳐 Epon에 포매하였다. 포매된 조직은  $1\mu$ 의 절편을 만들어 toluidine blue에 염색하여 검경하였다.

**척수 세포배양:** 신경교세포의 분리배양은 Percoll을 이용한 Kim<sup>11)</sup>의 방법을 응용하였다. 먼저 신경증상을 나타내는 마우스의 두부를 절단한 후 척수를 수집하고, 수집된 척수는 세절편을 만든 다음 효소(0.25% trypsin 및  $20\mu\text{g/ml}$  DNase)를 처리하여 단세포로 만들었으며 수초를 제거하기 위하여 30% Percoll(Pharmacia) 상태에서 원심분리하였다. 원심분리 후 수초와 적혈구 사이의 세포괴를 얻어 수회 반복하여 배양액으로 씻은 후 대식세포와 신경교세포를 분리하기 위하여 세포부유액을 coverglass상에서 30분간 방치시켰다. 그 후 부착하지 않은 세포들을 재수집하여 poly-L-lysine이 처리된 Aclar plastic coverslip(Allied Chemical Co.)에 부착시킨 후 5% CO<sub>2</sub> 랩온기에서 2주간 배양하였다. 대조군으로는 대조군의 마우스 척수를 같은 방법으로 배양하였다. 세포배양액은 Dulbecco's modified Eagle's medium(Gibco)에 5% 우태아혈청과 gentamycin sulfate( $0.05\mu\text{g/ml}$ )를 가하여 사용하였다.

**신경교세포의 동정:** 회돌기교세포의 동정을 위하여는 배양세포가 부착된 coverslip을 5% horse serum이 첨가된 10mM HEPES buffer로 씻은 후 mouse monoclonal

anti-galactocerebroside<sup>12)</sup>를 30분간 적용하였으며 그 후 buffer로 씻고 2차 항체로는 fluorescein이 결합된 goat anti-mouse IgG(1:40) (Sigma)를 30분간 처리한 후  $-20^\circ\text{C}$ 에서 acid-alcohol(5% acetic acid-95% ethanol)에 10분간 고정하였다. 음성대조군으로는 1차 항체를 처리하지 않고 2차 항체만을 적용하였다.

성상교세포와 대식세포의 동정을 위하여는 세포가 부착된 coverslip을 acid-alcohol에 고정한 후 mouse monoclonal anti-gial fibrillary acidic protein(GFAP) (1:400) (Sigma)와 rat monoclonal anti-mouse macrophage(1:5)를 이용하였으며 2차 항체로는 fluorescein이 결합된 goat anti-mouse IgG (Sigma) 및 goat anti-Rat IgG(Cappel)를 각각 적용하였다.

**Virus감염성 검사:** acid-alcohol(5% acetic acid-95% ethanol)에 고정된 coverslip을 10% normal goat serum이 첨가된 PBS(0.05M phosphate buffered saline)로 처리한 다음 rabbit anti-TMEV(GD VII strain) (1:5)<sup>5)</sup>에 2시간 반응하였고 PBS로 3회 씻은 다음 rhodamine이 결합된 goat anti-rabbit IgG(1:40) (Cappel)에 30분간 반응시켰다. Virus감염 양성의 대조군으로는 TMEV를 감염시킨 BHK 세포주를 위와 같은 방법으로 면역반응을 실시하였다. 반응을 다친 coverslip은 형광현미경(Zeiss fluorescence microscope)으로 관찰하였다.

## 결 과

**수초탈락 부위의 형태학적 관찰:** TMEV는 감수성 마우스에 뇌내접종시 척수의 백질부에서 수초 탈락성 질병을 일으키며 수초탈락에 대한 병리학적 소견은 마우스의 strain과 virus의 종류에 따라 다각적으로 연구되었다.<sup>2,5,9,13)</sup>

TMEV(BeAn strain) 감염 후 30일째 척수 수막하염증세포의 침윤, 혈관 주위 임파구의 침윤 등이 관찰되면서 백질부에서 산발적으로 수초가 탈락되고 있었다(Fig 1). 만성경과를 취하는 150일째 회백질부는 염증반응이 거의 관찰되지 않는 반면 주변의 백질부는 배측, 복측 및 외측 등, 부위에 관계없이 수초가 결손된 병소가 관찰되었고 수초탈락 정도는 개체와 척수 부위에 따라 다소 차이가 있었다(Fig 2). 또한 수초가 탈락된 부위에서는 수막의 경계를 따라 Schwann 세포의 의해 수초가 재생되기도 하였다(Fig 2).

**배양 신경교세포의 면역세포학적 관찰:** TMEV 감염 마우스의 척수로부터 세포들을 분리하여 2주간 배양하였고 형광항체법을 이용하여 신경교세포 특이항원의 표현형태 변화와 virus의 감염성을 검사하였다.

대조군의 배양 회돌기교세포에서는 돌기와 확장된 sheet상에 GC 양성의 면역반응이 강하게 나타났으나 (Fig 3) virus 감염 마우스의 예에서는 돌기와 sheet 형성이 미약하게 나타났을 뿐만 아니라 GC의 면역반응도 대조군에 비하여 약하게 나타났다(Fig 4). Virus 감염 마우스로부터 얻은 정상교세포의 GFAP 면역반응은 대조군과 유사하게 강하게 나타났다.

배양된 척수세포에서 virus의 감염성을 검사한 파배양초기 극소수의 대식세포에서만 virus 감염으로 추정되는 과립상의 형광이 인정되었을 뿐 회돌기교세포 (Fig 6) 및 정상교세포에서는 virus 음성으로 나타났다.

## 고 찰

TMEV는 마우스의 소화관에서 분리된 picornavirus<sup>1)</sup>로써 감수성 마우스에 감염 후 만성적인 경과와 수초탈락<sup>2)</sup>, 수초의 재생과 재생된 수초의 재탈락<sup>3)</sup>, 면역억제로 인한 수초탈락의 억제<sup>4)</sup> 등 병리학적 소견이 사람의 multiple sclerosis<sup>4)</sup>와 유사하여 이에 대한 실험 모델로 활용되고 있다. TMEV 감염으로 인한 마우스의 수초탈락 기전에 대해 Rodriguez et al<sup>5)</sup>은 virus가 수초를 산생하고 유지시키는 회돌기교세포에 직접 감염됨으로써 이들 세포와 수초를 파괴한다고 하였으나, Dal Canto와 Lipton<sup>2)</sup>은 TMEV 감염중에 기인한 수초탈락의 일차적인 원인은 virus 감염 후 야기된 면역반응에 의한 것이고 회돌기교세포에 virus의 감염은 산발적이며 소수이기 때문에 수초탈락의 직접적인 원인은 될 수 없다고 하였고 virus의 지속적인 감염은 정상교세포와 대식세포에서 일어난다고 하였다. 그러나 Aubert et al<sup>7)</sup>은 TMEV의 DA strain을 이용한 감염실험에서 회돌기교세포의 감염율은 25~43%이라고 하여 서로 상반된 소견을 나타내고 있다. 그러나 이는 virus가 감염된 정상교세포와 대식세포에 인접하여 이차적인 감염 가능성도 배제할 수 없는 실정임으로 이것이 TMEV가 회돌기교세포에 직접 감염되었다는 증거로 단정하기는 곤란한 실정이다. 본 실험에서는 virus 감염 후 virus의 양이 극히 적은 만성기의 시점에서 분리배양 직후 극소수의 대식세포에서 관찰된 가성양성 반응은 지속적인 감염세포를 나타낸 것으로 추측되나 회돌기교세포와 정상교세포에서의 감염은 인정되지 않았다.

이는 세포의 분리배양 과정 중 virus 감염세포가 상당수 소실되었거나, virus의 양이 형광항체법으로는 동

정될 수 없을 만큼 적은 것이었을 가능성도 배제할 수는 없으나 면역세포학적 방법을 활용한 결과<sup>5)</sup>와 유사한 소견을 나타낸 점으로 보아 회돌기교세포에 virus의 직접적인 영향은 배제할 수 있으리라 본다. 그러나 TMEV는 DA, WW, BeAn 등의 strain에 따라 병변의 형태가 다양하게 나타나고 있어 이들 strain에 따라 virus의 신경교세포에 대한 친화성은 비교연구되어야 하리라 본다.

회돌기교세포의 특이항원으로 알려진 galactocerebroside의 표현형태에 대하여 수초탈락성 질병을 가진 마우스로부터 분리배양된 회돌기교세포는 대조군에 비해 sheet의 확장이 미약하고 형광반응도 상대적으로 약하게 나타났다. 한편 수초탈락 후 수초의 재생과정 중 병소내의 회돌기교세포에 의한 수초의 형성은 정상 회돌기교세포에 의한 것보다 두께가 얇은 것으로 나타난다<sup>13)</sup>고 하였다. 이는 영향을 받은 세포의 경우 세포의 항원발현 형태도 동시에 변하고 있음을 암시하고 있다.

본 실험에서 관찰된 신경교세포의 소견들을 종합해 볼 때 Theiler's virus에 기인한 수초탈락의 직접적인 요인은 virus가 회돌기교세포에 직접 감염된다고 보다 virus 감염 후 조직적합성항원과 cytotoxic T cell<sup>15)</sup> 등의 복합적 요소가 작용된 것으로 추정되며 이에 대한 규명은 수초탈락성 질병의 동물모델 개발에 도움이 되리라 생각된다.

## 결 론

Theiler's virus에 기인된 마우스의 수초탈락성 질병은 사람의 수초탈락성 질병인 multiple sclerosis의 동물모델로 이용되고 있으나 수초탈락 기전은 명확히 규명되어 있지 않다. 본 실험에서는 Theiler's virus 감염 후 수초탈락 기전을 규명하기 위한 한 방법으로 신경증상을 수반한 마우스의 척수로부터 신경교세포를 분리배양하고 이들 세포에 virus의 감염여부와 각 세포 특이항원의 발현상태를 형광항체법을 이용하여 관찰하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

분리배양된 회돌기교세포 및 정상교세포에서 virus의 감염은 인정되지 않았다.

Virus가 감염된 마우스의 척수로부터 분리배양된 회돌기교세포의 돌기와 sheet는 대조군에 비해 위축되어 있었고 galactocerebroside 표현상태도 대조군에 비해 약하게 나타났으나 정상교세포의 glial fibrillary acidic protein의 항원성은 대조군과 유사하게 나타났다.

### Legends for figures

Light micrographs of Epon-embedded, toluidine blue stained, one micron-thick sections of spinal cord of Theiler's virus (BeAn strain) infected mice at 30 days(Fig 1) and 150 days (Fig 2) post infection.

**Fig 1.** Numerous demyelinated axons are present in anterior column of spinal cord 30 days post infection.  $\times 200$ .

**Fig 2.** Perivascular inflammatory infiltrates and clusters of macrophages are surrounded by demyelinated and remyelinated axons, Many axons are ensheathed by Schwann cells(arrows).  $\times 380$ .

Immunofluorescence of cultured spinal cord cells isolated from control(Fig 3) and virus-induced demyelinating mice(Fig 4, 6).

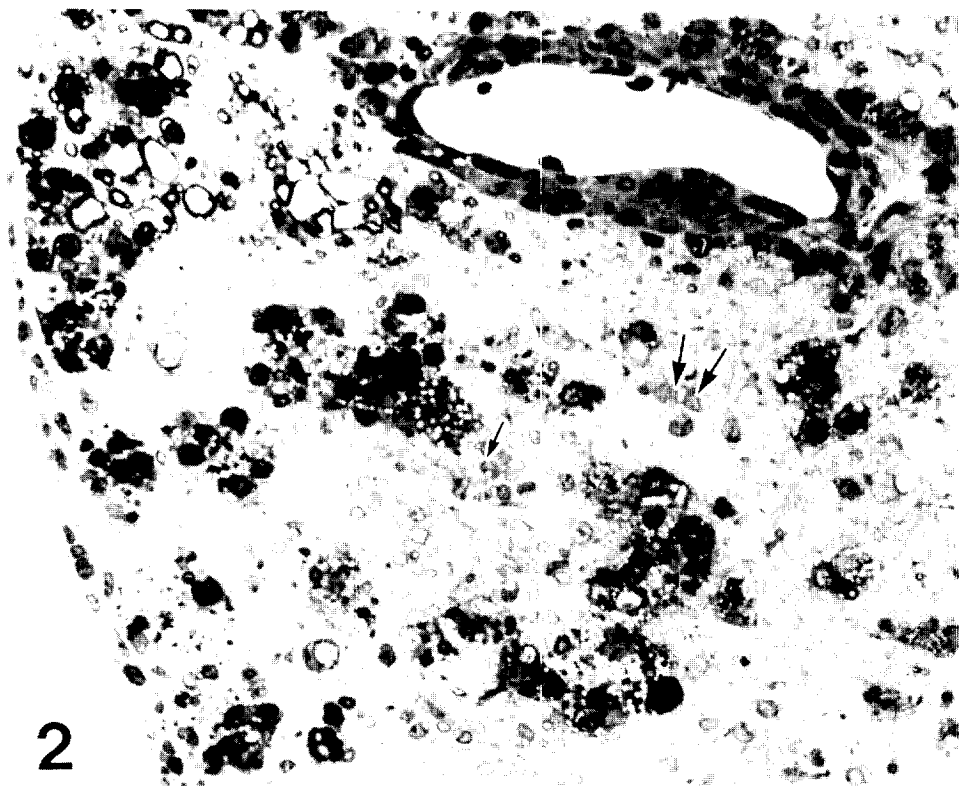
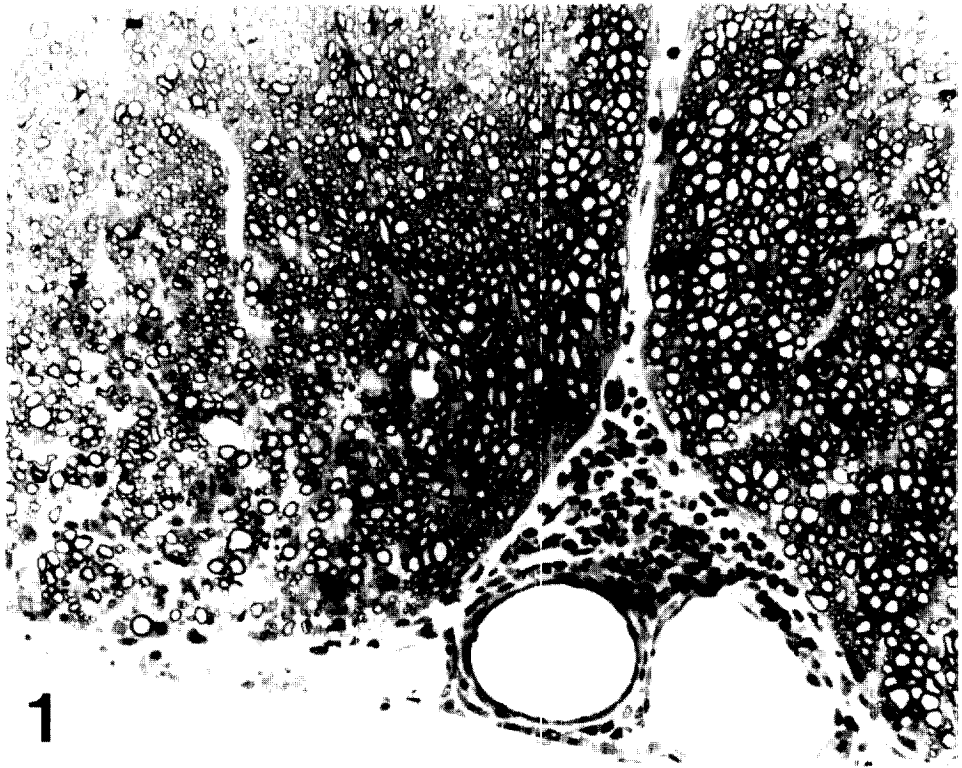
Cells were incubated with monoclonal anti-galactocerebroside, followed by FITC-labeled goat anti-mouse IgG(Fig 3, 4) and then fixed in acid-alcohol. For the identification of virus, cells were further incubated with rabbit anti-TMEV antiserum and rhodamine labeled goat anti-rabbit IgG(Fig 5, 6)  $\times 400$ .

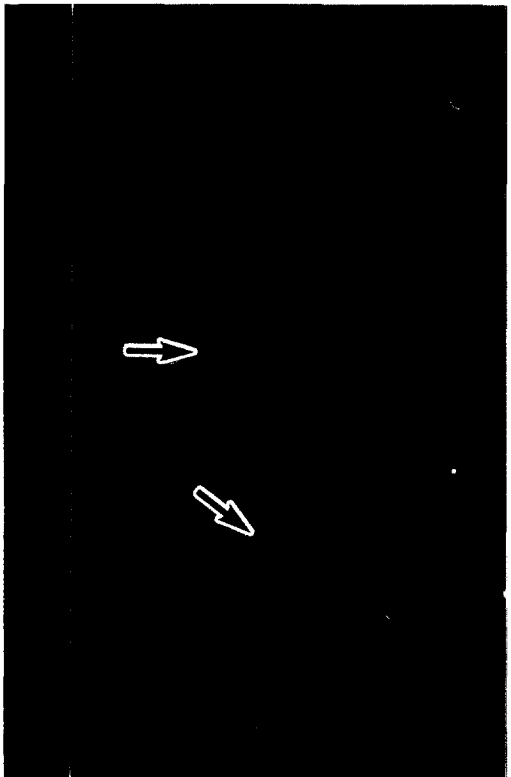
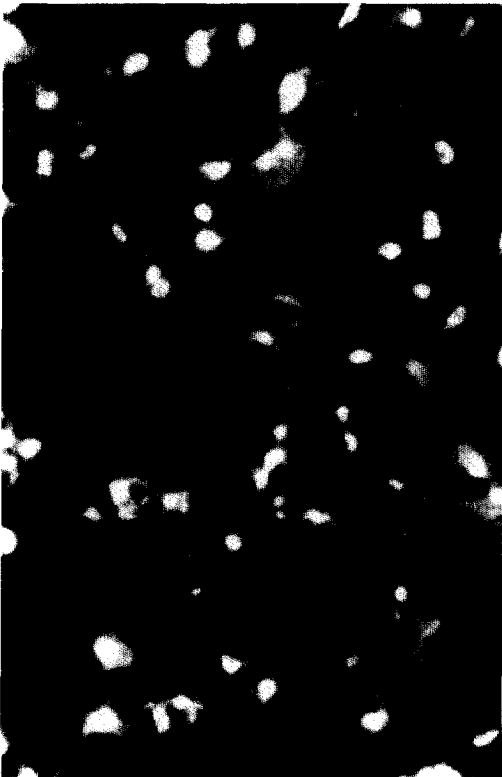
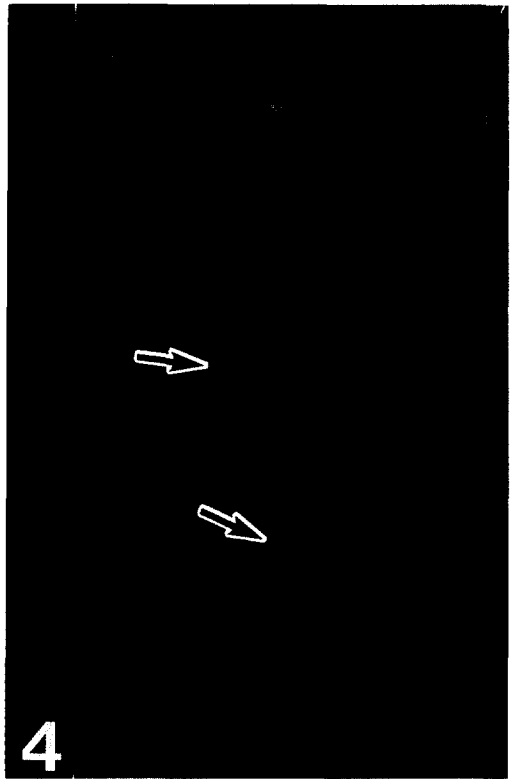
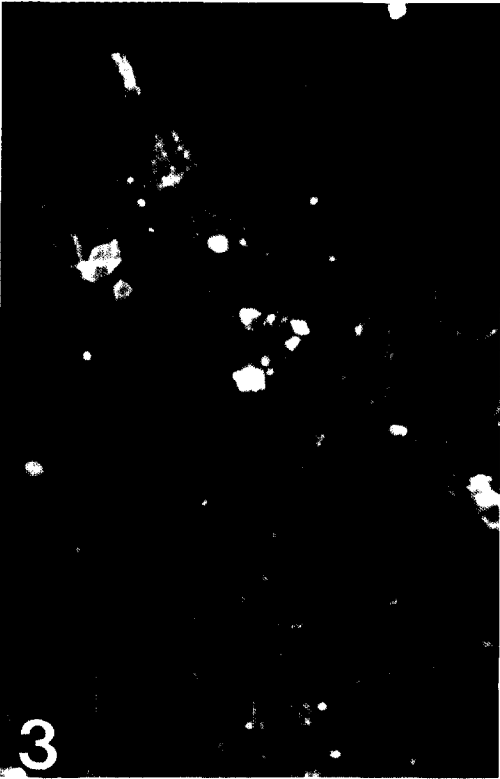
**Fig 3.** Oligodendrocytes from control mice elaborate GC-positive membranous sheets from their processes and cell bodies.

**Fig 4.** Affected oligodendrocytes showed weak immunoreactivity of GC.

**Fig 5.** TMEV-positive control of BHK cells infected with EeAn strain.

**Fig 6.** The same field of Fig 4. Viral antigens were not detected by double immunofluorescence.





## 참 고 문 헌

1. Theiler M. Spontaneous encephalomyelitis of mice: a new virus disease. *Science* 1934;80:122.
2. Dal Canto MC, Lipton HL. Primary demyelination in Theiler's virus infection: an ultrastructural study. *Lab Invest* 1975;33:626-637.
3. Lipton HL. Theiler's virus infection in mice: An unusual biphasic disease process leading to demyelination. *Infect Immun* 1975;11:1147~1155.
4. Dal Canto MC. Animal model of human disease: Multiple sclerosis, *Am J Pathol* 1977;88:497~500.
5. Dal Canto MC, Lipton HL. Ultrastructural immunohistochemical localization of virus in acute and chronic demyelinating Theiler's virus infection. *Am J Pathol* 1982;106:20~29.
6. Rodriguez M, Leibowitz J, Lampert PW. Persistent infection of oligodendrocytes in Theiler's virus induced-encephalomyelitis. *Ann Neurol* 1983;13:426~433.
7. Aubert C, Chamorro M, Brahic M. Identification of Theiler's virus infected cells in the central nervous system of the mouse during demyelinating disease, *Microbial Pathogenesis* 1987;3:319~326.
8. Clatch RJ, Melvold RW, Miller SD et al. Theiler's murine encephalomyelitis virus(TMEV) induced demyelinating disease in mice is influenced by the H-2D region: Correlation with TMEV-specific delayed-type hypersensitivity, *J. Immunol* 1985; 135:1408-1414.
9. Rodriguez M, Pierce ML, Howie EA. Immune response gene products (Ia antigens) on glial and endothelial cells in virus-induced demyelination. *J Immunol* 1987;138:3438-3442.
10. Rodriguez M, Leibowitz J, David CS. Susceptibility to Theiler's virus-induced demyelination, *J Exp Med* 1986;163:620~631.
11. Kim SU, Antigenic expression of glial cells grown in culture. *JNeuroimmunol* 1985;8:255~282.
12. Ranscht B, Clapshaw PA, Price J et al. Development of oligodendrocytes and Schwann cells studied with a monoclonal antibody against galactocerebroside. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:2709~2713.
13. Dal Canto MC, Lipton HL. Schwann cell remyelination and recurrent demyelination in the central nervous system of mice infected with attenuated Theiler's virus. *Am J Pathol* 1980; 98:101-122.
14. Lipton HL, Dal Canto Mc. Theiler's virus induced demyelination: Prevention by immunosuppression. *Science* 1976;192:62-64.
15. Fujinami Zurbriggen A. Is Theiler's murine encephalomyelitis virus infection of mice an autoimmune disease? *APMIS* 1989;97:1~8.