

태서 중추신경계의 Heat Shock Protein 70 분포에 대한 Nicotine 영향

최병태† · 강호성*

동의대학교 한의학과
*부산대학교 분자생물학과

Immunohistochemical Localization of Heat Shock Protein 70 in the Central Nervous System of Nicotine-treated Rat Embryo

Byung-Tae Choi[†] and Ho Sung Kang^{*}

Dept. of Oriental Medicine, Dong-Eui University, Pusan 614-714, Korea
**Dept. of Molecular Biology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea*

Abstract

This study was investigated to determine whether nicotine causes the morphological changes and expression of heat shock protein(HSP) 70 in the central nervous system of rat embryo. The pregnant rats were injected s.c. twice daily with 3 mg nicotine per 100g body weight from day 0 to 14 of gestation and embryos were removed on gestation day 15. As morphological changes, retardation of cell proliferation was observed in the telencephalon of nicotine-treated groups and no changes in the other region were found. Minimal HSP 70 was expressed over whole central nervous system with no area of specific accumulation. Although the distribution of reactivity for HSP 70 in the central nervous system was similar between control and nicotine-treated group, the expression of blood cells in the meninges and chroid plexus was significantly greater in nicotine-treated group than in control.

Key words : HSP 70, nicotine, central nervous system, rat embryo

서 론

Nicotine은 다량 투여될 때 연속적인 운동신경의 활성이 저해되며 가임 중에는 모체에서 태자로 신속히 이동하여 초기 배자의 세포분열을 지연시킬 뿐 아니라 모체의 내분비계에 영향을 미쳐 착상 및 저체중, 성장지체 등 정상발생에 장애를 준다.^{1~3)}

Nicotine에 대한 영향을 성체에서 주로 호흡기, 소화기 및 심맥관계에 대한 연구가 주로 이루어져 왔으나 가임여성의 흡연이 늘어나는 등 사회적 변화와 함께 흡연에 의한 자

궁내 저산소증과 더불어 태아의 성장장애, 기형, 출생후 활동성에 대한 연구가 많이 이루어 지고 있다.^{4~7)}

특히 nicotine이 신경계에 미치는 영향을 보면 미량의 nicotine이 신경계의 작용을 증진시킨다는 보고는 있으나 다량 투여는 신경계 장애를 가져 오며,²⁾ 교감 및 부교감신경, 골격근, 중추신경계에 acetylcholine과 유사한 영향을 미친다.^{8,9)} 또한 흡연에 따른 전뇌 무게 및 후뇌 세포수 감소⁵⁾ 등으로 보아 nicotine이 신경계에 미치는 영향을 유추 할 수 있다.

[†] Corresponding author

본 실험에서는 nicotine이 고온과 같은 다양한 스트레스에 의해 유도되고 단백질의 3차구조형성과정을 조절하는 molecular shaperon으로 작용하며,^{10,11)} 특히 중추신경계에서는 국소적 빈혈 및 저산소증에 대해 발현하며 발생과정에서 신경세포의 분화 등에 관여하는 것으로 알려진 HSP 70^{12~14)}에도 영향을 줄것으로 사료되어 다량의 nicotine을 모체에 반복 주사하였을 때 태아의 중추신경계에 발현되는 HSP 70의 분포변화를 면역조직화학적으로 검색하였다.

재료 및 방법

실험재료는 250g내외의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였다. 임신경험이 없는 암컷 흰쥐를 수컷과 저녁 6시에 합사시킨 후 그 다음 날 오전 9시에 질도말표본을 만들어 정자가 발견된 날을 임신 0일로 정하였다. 임신이 확인된 흰쥐를 대조군과 실험군으로 나누어 임신 1일째부터 14일째까지 대조군은 생리식염수만을, 실험군은 0.3mg/100g body weight의 nicotine을 함유한 생리식염수 0.1ml을 매일 2회(오전 9시 및 오후 6시) 피하주사하였다. 임신 15일째 대조군과 실험군 흰쥐를 ether로 마취한 후 개복하여 태자를 얻어 10% neutral formalin에 고정하였다.

일반적인 조직제작 과정과 같이 탈수, 투명화 그리고 파라핀 포매과정을 거쳐 5 μ m 두께의 측시상단면과 횡단면 연속절편을 얻었다. 대조군과 실험군의 중추신경계 조직변화를 관찰하기 위하여 hematoxylin-eosin염색을 행하였다.

HSP 70을 면역조직화학적으로 검색하기 위하여 조직학적 관찰과 동일한 방법으로 태자를 취하여 Bouin용액에 고정한 다음 5 μ m의 연속절편을 만들었다. 파라핀을 제거한 후 0.25% methanolic hydrogen peroxide를 30분간 처리하여 조직 내에 있을 peroxidase를 산화시킨 후 phosphate buffered saline(PBS, 0.01M, pH 7.4)로 세척하고 단백질에 의한 비특이 면역반응을 막기 위하여 3.3% goat normal serum으로 실온에서 30분간 처리하였다. HSP 70에 대한 단일 항체(N 27, StressGen)를 1 : 200으로 희석하여 4 $^{\circ}$ C의 습실에서 24시간 반응시킨 후 PBS로 세척하고 이어서 2차항체로서 biotinylated anti-mouse Ig G(Vector, BA-9200)를 1 : 200으로 희석하여 실온에서 60분간 처리시키고 다시 PBS로 세척

하였다. 이어 ABC(avidin-biotin-peroxidase complex, Vector PK-4000)를 60분간 반응시켰다. 순차적으로 PBS, Tris buffer(TB, 0.05M, pH 7.6)로 수세한 후 0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride와 0.003% H₂O₂를 혼합한 용액에 약 10분간 발색시켰으며 Harri's hematoxylin으로 대조 염색한 후 polymount(polyscience, USA)로 봉입하였다.

결 과

조직학적 소견을 보면 대조군과 실험군의 임신 15일 태서의 중추신경계에서 세포사나 조직괴사 등 조직병리학적 변화는 관찰할 수 없었으며 종뇌(telencephalon)를 제외하고는 현저한 조직학적 변화가 없었다. 대조군의 종뇌는 치밀한 세포 집단의 뇌실막층(ependymal layer)에서 분열된 세포가 신경세포와 섬유로 구성된 넓은 외투층(mantle layer)을 거쳐 가장자리층(marginal layer)으로 이동하여 대뇌를 형성하기 시작하였으나 실험군에서는 세포증식 및 세포이동이 미약하여 대조군에 비해 낮은 세포층을 형성 하였다(Fig. 1a~d). 그러나 후뇌(metencephalon)와 수뇌(myelencephalon)는 대조군과 실험군 모두 유사한 뇌실막층, 외투층, 가장자리층을 형성하였으며, 척수도 회백질과 백질이 뚜렷히 구분되며 중심관, 척수신경절 등의 기본적인 구조형성에 있어 대조군과 실험군의 차이가 없었다(Fig. 2a, b).

중추신경계에서 신경세포에 대한 HSP 70의 발현은 종뇌부터 척수에 이르기까지 부분적으로 뇌실에 접한 뇌실막층에 미약한 발현을 보여 각 기관 및 조직에 따른 국소적인 변화와 차이는 보여 주지 않았다(Fig. 3a, b). 그러나 대조군 태서의 전체 시상단면과 횡단면에서 HSP 70 발현을 살펴보면 중추신경계를 싸는 뇌척수막(meninges) 그리고 맥락총(choroid plexus)에서 반응을 보이는데 혈관내 혈구세포에서 다소 현저한 반응을 나타내었다. 이 반응은 nicotine을 투여한 실험군에서 현저히 증가하여 대조군과 다른 뚜렷한 차이를 보였다(Fig. 4a~d, 5a, b).

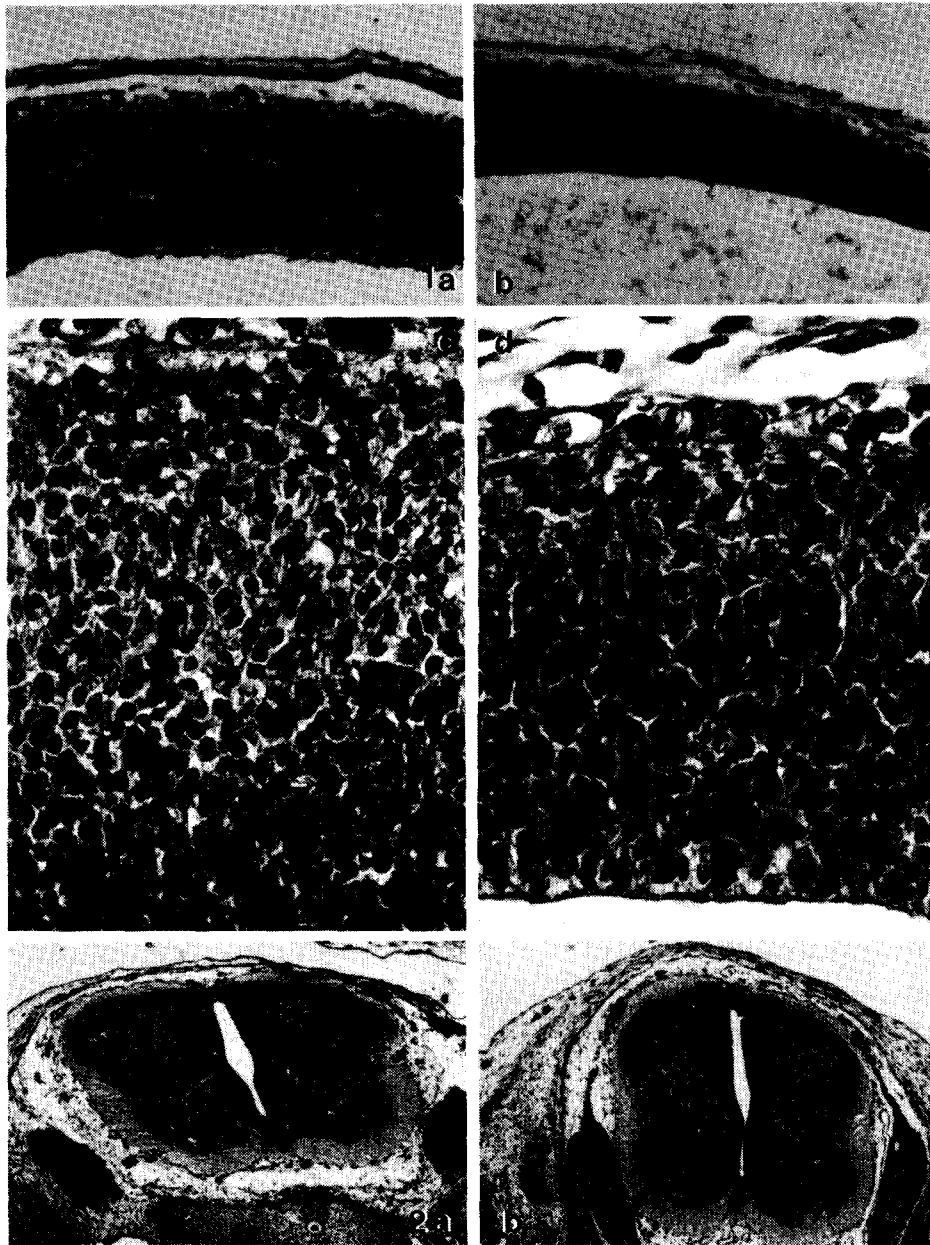


Fig. 1. Parasagittal section of telencephalon on 15-day-old fetus(a and c, control group ; b and d, nicotine-treated group). Hematoxylin-eosin stain. a and b, $\times 100$, c and d, $\times 400$.

Fig. 2. Transverse section of spinal cord through thyroid on 15-day-old fetus(a, control group ; b, nicotine-treated group). Hematoxylin-eosin stain. $\times 40$.

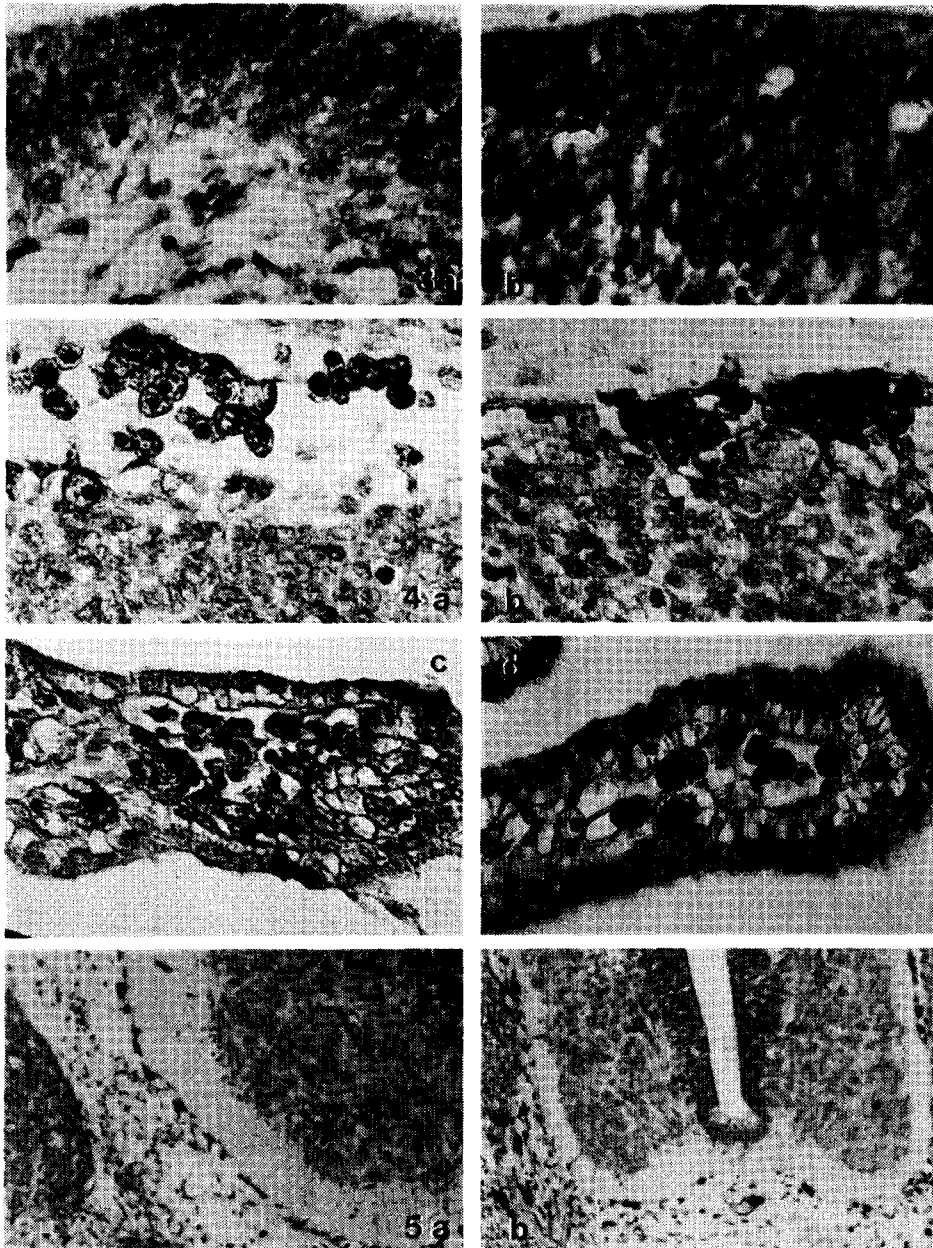


Fig. 3. HSP 70 immunoreactive staining of telencephalon on 15-day-old fetus(a, control group ; b, nicotine-treated group).
×400.

Fig. 4. HSP 70 immunoreactive staining of meninges(a and b) and choroid plexus(c and d) on 15-day-old fetus(a and
c, control group ; b and d, nicotine-treated group). ×400.

Fig. 5. HSP 70 immunoreactive staining of spinal cord on 15-day-old fetus(a, control group ; b, nicotine-treated group).
×100.

논 의

nicotine에 의한 cholinergic성 차단은 태반에서 아미노산 수송감소 및 흡수를 억제하여 총체적으로 태아의 성장장애를 초래하는 것으로 알려져 있어 임신초기 모체의 내분비계에 의한 배자 세포분열 및 착상을 지연되는 것과 함께 전 임신기 동안 태자에 영향을 미친다.^{1-3,15,16)}

본 실험에서 생리식염수를 투여한 대조군과 nicotine을 투여한 실험군의 태서 중추신경계에 미치는 영향을 조직학적으로 비교해 보면 Krous 등¹⁷⁾이 관찰한 nicotine에 의한 태서 뇌간 수질부의 많은 세포사 등의 조직병리적 변화는 관찰되지 않았으나 종뇌에서의 신경세포증식 지연으로 인한 낮은 세포층을 관찰할 수 있었다. 이는 고농도 nicotine을 모체에 투여하였을 때 상기 보고와 함께 Hudson과 Timiras¹⁾의 태자의 무게 감소, 김 등⁷⁾의 nicotine투여 양에 따라 대조군에 비해 뇌의 중량이 감소하는 결과 등으로 보아 이는 중추신경계 중 가장 현저하고 극적인 변화과정을 거치는 종뇌의 분화가 nicotine에 의해 지연됨을 알 수 있다.

HSP는 주로 HSP 90(84~94 kDa), HSP 70(68~75 kDa) 및 small HSP(20~30 kDa)의 3개군으로 구별하는데 이 중 HSP 70의 중추신경계에 대한 연구를 보면 주로 허혈 및 혈관결찰에 의한 저산소증에 대한 연구가 많은데 Kumur 등¹⁸⁾은 허혈성 체온저하시에는 조직학적 괴사는 관찰되지 않으나 HSP 72를 발현하여 이들이 신경세포 보호 기능을 가진다고 하였으며, Li 등¹⁴⁾은 국소적인 허혈에서 일반 조직학적 관찰로 보아 이상이 없는 조직이라도 장차 괴사될 조직에는 HSP 72의 발현이 사라져 이들이 세포생존능력을 반영한다고 하였다. 또한 Soriano 등¹²⁾은 뇌에서 허혈을 행하면 신경세포, 신경교세포 및 내피세포에 HSP 72가 발현한다고 하였다. Kato 등¹³⁾은 발생과정에서 HSP 73의 발현은 임신 6주 척수전각 및 후근 신경절에서 발현하며, 임신 40주에는 대뇌 추체세포에서 나타나는 등 신경세포와 신경교세포의 성숙에 따라 상이하어 신경세포 분화에 대한 HSP 73 기능을 시사하고 있다.

Nicotine과 같은 기호물질을 투여한 실험을 보면 Calabrese 등¹⁹⁾은 흰쥐에 ethanol 같은 oxidative stress를 주면 ethanol의 증가에 따라 소뇌 및 해마 등에 HSP 70 family가 발현된다고 하여 redox mechanism에 대한 가설을 검증하였다. Wilkinson와 Pollard²⁰⁾은 caffeine처리시 태서에서 HSP

90, 70, 25의 발현이 나타나지 않아 HSP 발현에는 영향을 미치지 않는다고 하였다.

본 실험에서 태서 중추신경계의 신경세포와 신경섬유에 대한 HSP 70 발현을 비교해 보면 대조군과 실험군에서 현저한 차이나 국소적인 변화를 관찰할 수 없었다. 그러나 중추신경계의 뇌척수막 및 맥락층에 존재하는 혈구세포에서 대조군에 비해 실험군이 현저히 강한 반응을 나타내고 있었다. 이러한 반응은 심장과 간장에 분포하는 혈구세포가 미약한 반응을 나타내는 것으로 보아 다른 혈구세포와 구별되는 것으로 nicotine투여에 의한 발현이라 볼 수 있다. 이러한 HSP 70의 발현은 뇌의 분화에는 현저한 변화를 미치지 않으나 뇌와 관련된 뇌막과 맥락층에 영향을 미쳐 뇌의 분화 지연과 더불어 나타나는 nicotine의 중추신경계에 미치는 영향에 대한 일련의 보호작용으로 사료된다.

요 약

임신기간 중 nicotine이 처리된 15일째되는 태서의 중추신경계에 대해 조직학적 관찰과 함께 HSP 70분포를 면역조직화학적으로 검색하였다. 조직학적으로는 종뇌에서 세포증식 및 이동이 다소 지체된 것외에는 다른 부위에서 조직학적 차이를 나타내지 않았으며, HSP 70 발현은 종뇌에서 척수에 걸쳐 미약하게 발현하여 국소적인 분포나 차이를 나타내지 않았으나 뇌척수막 및 맥락층의 혈관내 혈구세포에서 nicotine을 처리한 실험군이 대조군에 비해 강한 반응을 나타내었다.

참 고 문 헌

- Hudson, D. B. and Timiras, P. S. : Nicotine injection during gestation : Impairment of reproduction, fetal viability, and development, *Biol. Reprod.*, 7, 247 (1972).
- Hudson, D. B., Meisami, E. and Timiras, P. S. : Brain development in offspring of rats treated with nicotine during pregnancy, *Experientia*, 29, 286(1973).
- Yoshinaga, K., Krenn, C. R. J. and Pilot, R. L. : Effects of nicotine on early pregnancy in the rat, *Biol. Reprod.*, 20, 294(1979).
- Young, I. M. and Pugh, L. G. C. E. : The carbon monoxide content of foetal and maternal blood, *J. Obst. Gyna. Brit. Comm.*, 70, 681(1963).

5. Haworth, J. C. and Ford, J. D. : Comparison of the effects of maternal undernutrition and exposure to cigarette smoke on cellular growth of the rat fetus, *Am. J. Obst. Gynec.*, **112**, 653(1972).
6. Dunn, H. G., McBurney, A. K., Ingram, S. and Hunter, C. M. : Maternal cigarette smoking during pregnancy and the child's subsequent development : II. Neurological and intellectual maturation to the age of 6½ years, *Can. J. Pub. Health*, **68**, 43(1977).
7. 김무강, 김상근, 조성환, 김명철, 이근좌, 이만휘 : nicotine이 발생중인 계태의 장기성장 및 조직구조에 미치는 영향에 관한 연구. 대한해부학회지, **24**, 388(1991).
8. Suzuki, K., Horiguchi, T., Comas-Urrutia, A. C., Mueller-Heugach, E., Morishima, H. O. and Adamsons, K. : Placental effects of nicotine upon the fetus and mother in the pregnant rhesus monkey, *Am. J. Obst. Gynec.*, **111**, 1092(1971).
9. Suzuki, K., Horiguchi, T., Comas-Urrutia, A. C., Mueller-Heugach, E., Morishima, H. O. and Adamsons, K. : Placental transfer and distribution of nicotine in the pregnant rhesus monkey, *Am. J. Obst. Gynec.*, **119**, 253(1974).
10. Tomasovic, S. P. : Funtional aspects of the mammalian heat-stress protein response, *Life Chem. Rep.*, **7**, 33(1989).
11. Wilkinson, J.M. and Pollard, I. : Immunohistochemical localization of the 25 kDa heat shock protein in unstressed rats : Possible functional implications, *Anat. Rec.*, **237**, 453(1993).
12. Soriano, M. A., Planas, A. M., Rodriguezfarre, E. and Ferrer, I. : Early 72 kDa heat-shock protein induction in microglial cells following focal ischemia in the rat-brain, *Neuro. Lett.*, **182**, 205(1994).
13. Kato, M., Mizuguchi, M. and Takashima, S. : Developmental-changes of heat-shock protein-73 in human brain, *Devel. Brain Res.*, **86**, 180(1995).
14. Li, Y., Chopp, M., Zhang, Z. G. and Zhang, R. L. : Expression of glial fibrillary acidic protein in areas of focal cerebral-ischemia accompanies neuronal expression of 72-kDa heat-shock protein, *J. Neuro. Sci.*, **128**, 134(1995).
15. Sastry, B. U. R., Olubadevo J. O. and Boehm, F. H. : Effects of nicotine and cocaine on the release of acetylcholine from isolated human placental villi, *Arch. Int. Pharm. Thera.*, **229**, 23(1977).
16. Rowell, P. P. and Sastry, B. B. R. : The influence of cholinergic blockade on the uptake of amino-isobutyric acid by isolated human placental villi, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **45**, 79(1978).
17. Krous, H. F., Campbell, G. A., Fowler, M. W., Catron, A. C. and Farber, J. P. : Maternal nicotine administration and fetal stem damage : A rat model with implications for sudden infant death syndrome, *Am. J. Obst. Gynec.*, **149**, 743(1981).
18. Kumur, K., Wu, X. L., Evans, A. T. and Marcoux, F. : The effect of hypothermia on induction of heat-shock protein (HSP)-72 in ischemic brain, *Meta. Brain Disea.*, **10**, 283(1995).
19. Calabrese, V., Renis, M., Calderone, A., Russo, A., Barcellona, M. L. and Rizza, V. : Stress proteins and SH-groups in oxidant-induced cell damage after acute ethanol administration in rat, *Free Rad. Biol. Med.*, **20**, 391(1996).
20. Wilkinson, J. M. and Pollard, I. : Immunohistochemical localization of the 90, 70 and 25 kDa heat-shock proteins in control and caffeine treated rat embryos, *Ann. Ant. Anze.*, **175**, 561(1993).