

흰쥐 사이뇌에서 Transforming growth factor- α 면역반응 신경세포의 생후 발달에 관한 연구

박영란, 김홍순¹, 오재욱, 김종중, 문정석, 정상봉, 정윤영
조선대학교 의과대학 해부학교실, ¹가천의과대학 마취과학교실

간추림 : 본 연구에서는 생후 발달 중인 흰쥐 사이뇌에서 TGF- α 에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 이 단백을 함유하는 신경세포의 생후 출현 시기 및 분포 위치를 조사하였다. 흰쥐 사이뇌의 생후 발달 동안 TGF- α 면역반응 신경세포의 출현 시기는 부위에 따라 차이가 있었다. 출생한 날에는 시상의 안쪽핵 (medial nuclei), 정중핵 (median nuclei) 및 섬유판속핵 (intralaminar nuclei)에 속하는 다발결핵 (parafascicular thalamic nucleus) 등에서 TGF- α 면역반응이 나타났으며 대부분의 시상하부핵에서는 출생 첫 주 이내에 양성 반응을 나타냈다. 따라서 TGF- α 면역반응은 시상의 뒤편쪽핵 (vental posterior thalamic nuclei), 시상후부 (metathalamus) 및 시상상부 (epithalamus)를 제외한 대부분의 사이뇌 핵에서 생후 7일에 양성반응을 나타냄을 알 수 있었다. TGF- α 면역반응 세포 수의 증가는 시상의 정중구조를 구성하는 핵들에서 생후 첫 주에 뚜렷하게 관찰되었으며 생후 15일까지 사이뇌 전체에 걸쳐 점차적으로 증가하는 양상이 두드러지게 나타났다. 생후 20일에는 성숙 흰쥐의 분포 양상과 유사해졌다. 이상의 결과를 볼 때, 시상에서는 TGF- α 면역반응 신경세포가 정중 구조에 속하는 핵들에서 처음으로 나타나기 시작했으며 생후 첫 2주 동안에 점차 증가하여 발현이 안쪽에서 가쪽으로 진행되었음을 알 수 있었고 사이뇌에서 TGF- α 를 함유하는 세포들은 정상적인 성숙을 하는 시간이 오래 걸린다는 것 또한 알 수 있었다. 한편, 대부분의 사이뇌 핵들에서 TGF- α 면역반응이 생후 발달 과정의 초기에 출현하였는데 이는 EGFR 면역반응 신경세포들이 뇌의 여러 부위에 발달 초기에 발현되는 것과도 관련이 있으며 TGF- α 가 사이뇌의 기능적 역할의 발달과도 연관이 있을 것이라 사료된다.

찾아보기 낱말 : Transforming growth factor- α , 사이뇌, 흰쥐, 면역조직화학

서 론

Transforming growth factor- α (TGF- α)는 분자량이 5300 Da으로서 Epidermal growth factor (EGF)와 구조적으로 유사한 아미노산으로 구성된 폴리펩타이드이다. TGF- α 는 EGF와 마찬가지로 epidermal growth factor receptor (EGFR)에 고도의 친화성을 가지고 결합하여 수용체의 tyrosine 인산화 과정을 매개하며 상피세포와 간엽세포의 유사분열작용에

관여하는 것으로 알려져 있다 (Marquardt 등 1983, Massagué 1990). 뇌에서의 EGF의 발현과 그 위치는 아직까지도 논란의 여지가 있으나, EGF가 일부 뇌 신경세포에 존재하여 in vivo에서도 어떤 생리적 역할을 수행할 것이라고 추측하고 있다 (Schaudies 등 1989, Kato 등 1995). 또한 TGF- α (Massagué 1990), heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) (Higashiyama 등 1991), amphiregulin (Shoyab 등 1989), betacellulin (Shing 등 1993) 등과 같은 EGF와 유사한 단백질이 발견됨으로서 이들 중 일부는 EGF와 마찬가지로 뇌의 성장에 중요한 인자로 작용할 것이라고 생각하게 되었다. 대표적으로 TGF- α 는 배양된 중간뇌 도파민 신경세포와 뒤뿌리신경

* 이 논문은 2002년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

교신저자 : 정윤영 (조선대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편 : yyjung@mail.chosun.ac.kr

절 세포에 영양인자로서 작용함이 밝혀졌고, 성숙한 설치류 중추신경계통에서 mRNA가 동정되었다 (Seroogy 등 1993).

TGF- α 와 EGF는 수용체와 연관된 tyrosine kinase를 활성화시켜 세포내 기질의 인산화를 초래한다 (Reynolds 등 1983). Tyrosine kinase가 활성화되어 나타나는 작용은 세포내 유리 칼슘과 pH를 변화시킬 뿐 아니라 몇몇 유전자의 전사(transcription)를 증가시키는 등 수많은 생화학적 변화 과정을 빠르게 유발시켜 몇 시간 후에는 DNA복제와 세포 분열이 최고에 도달하게 한다고 알려지고 있다(Chen 등 1987). TGF- α 는 유사분열과 같은 기능 이외에도 세포이동의 증가, 혈관발생과 형성 및 뼈의 흡수와 같은 생물학적 효과를 가지고 있다(Ibbotson 등 1985, Tsuboi 등 1992, Guise 등 1993).

상피에서 기원하는 여러 가지 종양에서 TGF- α 는 mRNA와 폴리펩타이드 모두 과다하게 발현되어 TGF- α 를 초기 종양산물(proto-oncogene product)로 정의하였으며(Derynck 등 1987, Liu와 Tsao 1993), 유전자 변이가 일어난 생쥐에서 TGF- α 의 과다발현은 상피증식, 젖샘(mammary gland)의 이상 발생, 이자종양 및 간종양 유발과도 관련이 있었다(Jhappan 등 1990). 또한 TGF- α 가 태생기의 발생 중인 일부 태아조직과 인접한 모체조직에서도 발현되며, 종양덩어리에서 이소성으로 발현된다는 이유로 인해 EGF의 태생기 형태로 생각하여 TGF- α 를 일명 “fetal EGF”라고 명명하기도 하였으나(Han 등 1987, Miettinen 1993), 뇌하수체, 난소, 각질세포 및 큰포식세포(macrophage) 등을 포함한 성숙한 정상 호흡기, 소화기, 내분비, 비뇨생식계의 여러 조직에서도 TGF- α 가 발현된다는 것이 밝혀졌다(Samsoodar 등 1986, Christensen과 Poulsen 1996). 이와 같이 여러 종류의 조직들에서 TGF- α 가 발현된 것으로 보아 TGF- α 의 기능 또한 다양하다는 것을 알 수 있으며, 이들 보고들을 토대로 TGF- α 가 정상적인 생리적 조건에 있는 여러 조직들에서도 발현되며, 세포 분화에 중요한 역할을 할 것이라고 생각하게 되었다.

중추신경계통에서 EGF는 신경아교세포의 증식 및 분화를 촉진시키고 in vitro에서 신경세포의 생존

과 발달을 증가시키는 것으로 잘 알려져 있으나(Leutz와 Schachner 1981, Casper 등 1991), 뇌에서의 EGF mRNA는 상당히 낮다고 알려져 있을 뿐(Fallon 등 1984, Lazar와 Blum 1992) 뇌에서의 EGF 면역반응을 동정하는 것은 아직까지 명확하게 밝혀진 바가 없다. 또한 배양된 별아교세포에 EGFR이 다량 존재하며(Werner 등 1988), 발달 중이거나 성숙한 중추신경계통 모두에서 EGFR이 풍부하게 존재한다는 사실을 밝혀냈음에도 불구하고(Gomez-Pinilla 등 1988, Werner 등 1988) 뇌에서의 EGF의 생리학적 기능은 아직까지 밝혀지지 않고 있다. 중추신경계통에서 EGF의 기능을 밝히는데 지장을 받는 가장 큰 원인은 뇌에 EGF가 결핍되어 있을 수도 있다는 것이다(Probstmeier와 Schachner 1986). 이에 따라 중추신경계통에서 다양한 형태의 EGF의 면역반응을 알아내고자 하는 보고도 있었으며(Schaudies 등 1989), EGF와 TGF- α mRNA 발현에 관한 보고 등으로 TGF- α mRNA가 EGF mRNA보다 15~170배 정도로 높게 발현된다는 것을 알게 되었다(Kaser 등 1992, Lazar와 Blum 1992). 이상의 보고 등에서는 EGF와 유사한 구조적 특징을 가지고 있는 비 EGF 펩타이드들이 중추신경계통에서 EGFR의 생리적 결합물질로서 작용할 것이라는 것을 의미하고 있다.

또한 출생 후의 설치류의 뇌에서 TGF- α mRNA는 신생 뇌에서나 성숙한 경우 모두 줄무늬체, 시상, 해마에서 비교적 높은 수준으로 발현되었는데(Seroogy 등 1991, 1993), EGFR mRNA는 이들 부위의 일부에서만 발현된다는 보고도 있었다(Kaser 등 1992, Seroogy 등 1994). 설치류 뇌에서 TGF- α 가 형태발생의 초기에 나타난다고는 하지만 발생 중인 뇌 세포에 발현되는 TGF- α 단백질의 분포 양상은 거의 알려지지 않았다. 현재 포유류 뇌의 발달에 관련된 TGF- α 단백질 발현에 관련된 연구는 발생이 진행 중인 뇌와 성숙한 뇌 전체를 몇 개의 부위별로 나눠 종에 따라 비교한 Ferrer 등(1995)의 보고가 있을 뿐이다. TGF- α 가 설치류 중추신경계통에서 EGFR에 가장 많이 결합하는 결합물질이며, TGF- α 가 EGFR을 통해 신경세포와 신경아교세포의 증식, 분화, 생존 및 이동 등의 기능을 나타낸다면 설치류

뇌에서는 대부분 이 기능들이 출생 전에 일어나므로 출생 직후부터 생후 연령별로 발달 과정 중에 있는 뇌에서 TGF- α 단백질의 발현을 알아보는 것도 흥미로울 것이라 생각한다.

따라서 본 연구에서는 비 EGF 펩타이드 중 가장 대표적인 TGF- α 단백질을 이용해 생후 발달 중인 흰쥐의 사이뇌와 생후 90일 이상된 성숙 흰쥐의 사이뇌를 연속 냉동절편으로 제작한 후 free-floating 방법을 이용해 면역조직화학염색을 실시하여 생후 발현 시기 및 분포 위치 등을 연령별로 조사하고 사이뇌 신경세포의 생후 발달에 따른 TGF- α 면역반응의 변화를 알아보려고 시행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

체중 200~250 gm 내외의 Sprague-Dawley계 암컷 흰쥐를 교배시켜 태어난 생후 0일, 3일, 5일, 7일, 10일, 15일, 20일, 30일의 어린 쥐 (P0, P3, P5, P7, P10, P15, P20, P30)와 생후 90일 이상된 성숙 수컷 흰쥐 (P90, 체중 250~300 gm) 각각 5마리씩을 본 실험에 사용하였다.

2. 동물 희생 및 조직 처리

성숙 흰쥐는 pentobarbital sodium (60 mg/kg)을 복막안에 주사하고, 어린 쥐는 에테르로 마취시킨 후 가슴안을 열고 원심실에 관류용 도관을 삽입한 후, heparin (250 unit/ml)을 함유한 생리식염수로 관류세척하고 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4)에 녹인 4% paraformaldehyde 용액이나 Zamboni 고정액으로 관류 고정된 다음 뇌를 적출하여 동일한 고정액에 담가 4°C에서 12시간 후고정하였다. Free-floating 방법으로 면역조직화학염색을 시행하기 위해 고정된 뇌 조직은 후고정 다음에 30% sucrose에 넣고 24시간 이상 침적시킨 후 꺼내어 동결절편기를 이용해 35 μ m 두께의 연속관상 절편을 제작하여 저장용액에 담아 4°C에 보관하였다.

3. 표본제작 및 조직염색

1) 닛슬염색

고정된 뇌조직의 일부는 에탄올 탈수과정과 크실렌 투명과정을 거쳐 파라핀에 포매하여 5~8 μ m 두께의 관상단면 연속절편을 제작하여 탈파라핀 및 함수 과정 등을 거쳐 cresyl violet 염색을 시행하였다. 또한 동결절편기를 이용하여 35 μ m 두께의 연속관상 동결절편을 제작하여 매 5장마다 1장씩을 취하여 cresyl violet 염색을 시행하여 탈파라핀한 염색절편과 비교하였다. 이들 염색 표본에서 정확한 사이뇌 핵무리를 확인하였고, 그 명칭은 Paxinos와 Watson (1997)의 뇌 도보를, 신생 뇌는 Paxinos 등 (1991)의 뇌 도보를 참고로 하였다.

2) 면역조직화학염색

저장용액에 보관한 조직절편을 매 5장마다 1장씩을 취하여 0.1 M PB로 옮겨서 수 차례 수세한 후 과산화수소 (H_2O_2)를 처리하여 내인성 과산화효소의 활성을 억제하였으며 다시 0.1 M PB로 세척한 후 면역조직화학반응을 실시하였다.

면역염색의 첫 단계로 비특이적 반응을 줄이기 위하여 3% 말혈청 (normal horse serum)을 실온에서 1시간 반응시켰다. 1차 항체는 monoclonal mouse anti-TGF- α (1 : 800, Calbiochem)를 각각 사용하였으며, 4°C에서 24~48시간 동안 진동시키면서 반응시켰다. 그 후 0.1 M PB로 10분씩 3회 수세 과정을 거쳤으며, 2차 항체는 biotinylated horse anti-mouse IgG (Vector, 1 : 200)를 실온에서 1시간 반응시킨 후, 0.1 M PB로 10분씩 3회 수세하였다. 그리고 peroxidase가 표지된 avidin-biotin complex (ABC, Vector)를 1 : 100으로 희석하여 실온에서 1시간 가량 반응시킨 후, 0.1 M PB로 10분간 다시 3회 수세하고 나서 3-3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma)를 0.1 M PB에 녹여 기질용액으로 사용하였는데 반응 직전에 H_2O_2 를 0.003%가 되도록 첨가하였으며, 실온에서 5~10분간 반응시킨 후 현미경하에서 발색 정도를 확인하였다. 그 후 0.1 M PB로 2~3회 세척한 후 염색한 조직절편들을 젤라틴이 피막된 슬라이드에 부착하여 실온에서 12시간 이상 건조한 다음, 통상의 조직처리 과정을 거쳐 poly-

mount (Polyscience)로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

결 과

TGF- α 면역반응 신경세포는 출생한 날의 사이뇌의 대부분의 핵들에서 이미 존재하였으며, 시상의 뒤배쪽핵 (ventral posterior thalamic nucleus, VP)과 시상후부 (metathalamus)에서의 발현이 생후 20일에 나타남으로서 다른 핵 무리에서보다 늦게 출현하였다. 특히 TGF- α 면역반응 신경세포는 시상의 정중구조를 구성하는 핵들에서 먼저 발현되어 연령이 증가함에 따라 배쪽, 등쪽으로 연장되어 발현되는 양상으로 발달하였고, 한편 시상하부에서는 생후 7일 이내에 대부분의 핵들에서 TGF- α 면역반응이 뚜렷하게 나타났다 (Table 1).

1. 출생한 날 (P0)

흰쥐 사이뇌의 앞 단면 중 시상에서는 등쪽앞핵 (anterodorsal thalamic nucleus, AD), 등쪽가쪽핵 (laterodorsal thalamic nucleus, LD), 정중핵 (median nuclei)을 구성하는 뇌실결핵 (paraventricular thalamic nucleus, PV), 마름핵 (rhomboid thalamic nucleus, Rh), 결합핵 (reuniens thalamic nucleus, Re) 등에서 양성 반응을 나타내는 신경세포가 관찰되었는데 뇌실결핵에서 다른 두 핵보다 더 많이 관찰되었다. 앞쪽 시상하부의 뇌실결핵 (paraventricular hypothalamic nucleus, Pa), 뇌실주위핵 (periventricular nucleus, Pe), 시각로위핵 (supraoptic nucleus, SO), 시각교차위핵 (suprachiasmatic nucleus, SCh), 시각교차뒤구역 (retrochiasmatic area, RCh)에서도 양성반응 신경세포가 존재하였다. 중간과 뒤 단면에서는 시상의 뇌실결핵, 다발결핵 (parafascicular thalamic nucleus, PF)을 포함해 안쪽핵 (medial nuclei)인 등쪽안쪽핵 (mediodorsal thalamic nucleus, MD)에도 소수의 양성반응 세포가 관찰되었다. 시상하부에서는 활꼴핵 (arcuate nucleus, Arc)과 정중융기 (median eminence, ME)를 포함해 배쪽안쪽시상하부핵 (ventromedial hypothalamic nucleus, VMH) 일부와 시상하부뒤구역

(posterior hypothalamic area, PH)에서 다수의 양성반응이 나타났다. P0에서는 시상하부에서의 면역반응이 시상에서보다 훨씬 뚜렷하게 관찰되었다 (Figs. 3a, 4).

2. 생후 3일 (P3)

시상의 안쪽앞핵 (anteromedial nucleus, AM), 띠결핵 (paratenial thalamic nucleus, PT), 그물핵 (reticular thalamic nucleus, Rt) 및 불확정구역 (zona incerta, ZI)에서 소수의 양성반응 신경세포가 출현하였으며, 안쪽중심핵 (central medial thalamic nucleus, CM)과 가쪽중심핵 (centrolateral thalamic nucleus, CL)에서 양성반응이 나타났다. 한편 앞시상하부핵 (anterior hypothalamic nucleus, AH), 시상하부가쪽구역 (lateral hypothalamic area, LH) 및 등쪽시상하부핵 (dorsal hypothalamic nucleus, Do)과 용기핵 (tuberal nucleus, Tu)에서도 양성반응을 뚜렷이 관찰할 수 있었고 이 시기에도 P0과 마찬가지로 시상보다는 시상하부에서 더 두드러진 TGF- α 면역반응을 보였다 (Figs. 1, 3b, 5).

3. 생후 5일 (P5)

시상의 배쪽앞핵 (anteroventral thalamic nucleus, AV), 중심결핵 (paracentral thalamic nucleus, PC) 및 뒤가쪽핵 (lateral posterior thalamic nucleus, LP)에서 양성반응이 나타나기 시작하였고, 안쪽배쪽핵 (ventromedial thalamic nucleus, VM)과 가쪽배쪽핵 (ventrolateral thalamic nucleus, VL)에서도 양성반응이 처음 나타났으며 시상섬유줄 (stria medullaris thalamus, sm)에서도 양성반응을 보였다. 또한 뇌실결핵을 포함해 가쪽으로 연장되어 등쪽안쪽핵, 섬유판속핵, 배쪽핵 등에서 양성반응이 증가된 양상을 보였으나 그물핵에서는 소수의 양성반응 신경세포만이 관찰되었으며 시상하부에서는 이전 시기보다 시상하부가쪽구역에서의 증가가 뚜렷하였다 (Figs. 3c, 6).

4. 생후 7일 (P7)

시상의 정중핵과 섬유판속핵 (intralaminar nuclei)

무리에서 양성반응이 뚜렷하게 증가하는 양상을 나타냈으며 또한 불확정구역에서도 강한 양성반응을 보였다. 시상하부에서는 등쪽안쪽시상하부핵 (dorsomedial hypothalamic nucleus, DM)의 양성반응이 뚜렷하게 나타났고 이 시기에는 시상하부보다는 시상의 양성반응이 두드러지게 증가하였다(Figs. 3d, 7).

나타냈다. 특히 시상하부의 앞시상하부핵에서의 양성반응이 두드러지게 증가하는 양상을 보였고 시상상부의 고삐핵 (habenular nucleus, Hb)에서는 소수의 양성반응 세포가 나타났으나, 시상의 뒤배쪽핵에서의 양성 반응은 이 시기에도 나타나지 않았다(Figs. 1, 8).

5. 생후 10일 (P10)

양성반응을 나타내는 위치는 P7과 큰 차이가 없었으나 그 수와 면역반응 강도는 증가하는 양상을

6. 생후 15일 (P15)

분포 양상은 P10과 유사하였다. 시상의 정중핵과 섬유관속핵 무리에서의 양성반응 신경세포는 이전

Table 1. Postnatal development of TGF- α immunoreactivity in the diencephalon of the rat

Area	First appearance of TGF- α immunoreactive cells	Area	First appearance of TGF- α immunoreactive cells
Thalamus		LP	P5
Anterior nuclei		Reticular nucleus	P3
AV	P5	Zona incerta	P3
AD	P0	Metathalamic nuclei	
AM	P3	LG	P20
Medial nuclei		Hypothalamus	
MD	P0	Anterior hypothalamic region	
Median nuclei		Pe	P0
PV	P0	Pa	P0
Rh	P0	SO	P0
Re	P0	SCh	P0
PT	P3	RCh	P0
Intralaminar nuclei		AH	P3
CM	P3	Tuberal region	
CL	P3	Tu	P3
PF	P0	Lateral hypothalamic region	
PC	P5	VMH	P0
Ventral nuclei		DM	P7
VM	P5	Do	P3
VL	P5	Arc	P0
VP	P20	Posterior hypothalamic area	P0
Dorsal nuclei		Epithalamus	
LD	P0	Hb	P10

Abbreviations	LH	lateral hypoth area	RCh	retrochiasmatic nu
3V	LHb	lateral habenular nu	Re	reuniens thal nu
AD	LP	lateral posterior thal nu	Rh	rhomboid thal nu
AH	MD	mediodorsal thal nu	Rt	reticular thal nu
AM	ME	median eminence	SCh	suprachiasmatic nu
Arc	MHb	medial habenular nu	sm	stria medullaris thalami
AV	opt	optic tract	SO	supraoptic nu
CL	ox	optic chiasm	Tu	tuberal nu
CM	Pa	paraventricular hypoth nu	VL	ventrolateral thal nu
DM	PC	paracentral thal nu	VM	ventromedial thal nu
Do	Pe	periventricular hypoth nu	VMH	ventromedial hypoth nu
f	PF	parafascicular thal nu	VP	ventral posterior thal nu
Hb	PH	posterior hypoth area	VPL	ventral posterolateral thal nu
LD	PT	paratenial thal nu	VPM	ventral posteromedial thal nu
LG	PV	paraventricular thal nu	ZI	zona incerta

P20

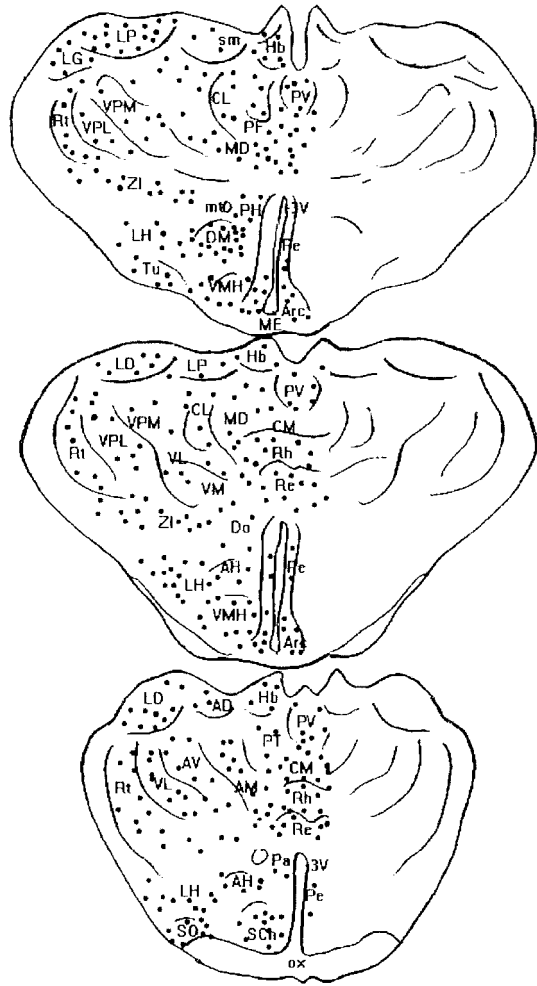


Fig. 2. Schematic representation of the distribution of TGF- α immunoreactive cells at P20, in three representative coronal sections from posterior (top) to anterior (bottom) levels of the diencephalon of the rat. In most thalamic nuclei, TGF- α underwent a pronounced increase and topographical expansion at this age.

nucleus, LG)에서도 양성반응이 나타나면서 거의 성숙 흰쥐와 유사한 분포양상을 나타냈다. 이 시기에는 시상하부에 비해 시상하부의 TGF- α 양성반응 신경세포의 증가는 뚜렷하지 않았다(Figs. 2, 9).

8. 생후 30일 (P30)과 성숙 흰쥐 (P90)

분포 위치, 면역반응 강도 등이 거의 비슷하였으며 성숙 흰쥐에서는 주로 시상 등쪽핵 및 배쪽핵 무리와 시상하부가쪽구역에서의 양성반응의 증가가 두드러졌다(Figs. 3e, 10).

특히 시상하부의 시각뒤교차구역 및 활꼴핵과 정중용기 등에서의 TGF- α 양성반응은 출생한 날부터 출현하여 생후 연령이 증가하는 동안 일정한 분포양상을 나타냈으며(Fig. 11), 시각로위핵에서도 출생한 날부터 양성반응을 보였으나 연령이 증가함에 따라 더 뚜렷한 반응을 나타냈다(Fig. 13). 시상에서는 출생초기에는 주로 정중핵 무리주변에서의 분포가 두드러졌으나 연령이 증가할수록 이 부위들에서 가쪽, 등쪽으로 연장되어 등쪽핵, 배쪽핵, 그물핵 및 불확정구역 등에서 양성반응이 뚜렷해졌다(Fig. 12).

고찰

본 연구에서는 흰쥐 사이뇌의 생후 발달 동안 TGF- α 의 발현 시기 및 분포 위치를 조사하였다. 연구 결과, TGF- α 면역반응은 사이뇌의 부위에 따라 생후 발현 시기에 차이가 있었으나 성숙해짐에 따라 P20부터는 거의 대부분의 핵들에서 양성반응을 나타냈다. 또한 사이뇌에서 TGF- α 면역반응 신경세포의 성숙은 비교적 많은 시간이 걸려 P20에 성숙 흰쥐 수준에 도달함을 알 수 있었다. 시상에서의 TGF- α 면역반응 신경세포의 생후 발달 양상이 특징적이었는데, 발생 과정 중 더 오래된 핵 무리에 해당하는 정중핵을 비롯해 섬유판속핵 등에서 먼저 발현되어 연령이 지나면서 등쪽핵, 배쪽핵 등으로 연장되어 발달이 진행되어 안쪽에서 가쪽 방향으로 성장하였고 대뇌겉질과 병행하여 발달하는 뒤배쪽핵에서 가장 늦게 발현되었다. 시상하부에서는 등쪽 안쪽시상하부핵을 제외하고는 생후 3일 이내의 어린 연령에 나타났다.

포유동물의 뇌에서 TGF- α 의 분포에 대한 연구는 꾸준히 보고되고 있다. In situ hybridization 기법을 통해 TGF- α mRNA 함유 신경세포들이 흰쥐의

앞뇌에 분포하며, 성숙 뇌보다는 발달 중인 뇌에서 TGF- α mRNA가 높게 나타난다고 하였으나(Lazar와 Blum 1992, Seroogy 등 1993), 본 실험에서 사이뇌에서의 TGF- α 단백 발현은 P20부터는 성숙 흰쥐와 큰 차이가 없었으나 어린 연령보다는 P20으로 성숙해지면서 면역반응이 뚜렷해짐으로서 TGF- α mRNA와 단백질 발현에는 차이가 있음을 알 수 있었다. Ferrer 등(1995)은 흰쥐, 고양이 및 사람 등 서로 다른 종의 뇌에서 TGF- α 면역반응이 발달이 진행중이거나 성숙한 경우 모두에서 대뇌겉질, 소뇌겉질, 시상, 편도, 중간뇌, 뇌줄기 등 뇌의 여러 부위의 신경세포에서 발현됨으로써 TGF- α 단백이 중추신경계통의 많은 신경세포에 광범위하게 존재한다고 보고하였으며, 특히 어린 고양이에서는 TGF- α 면역반응이 대뇌, 소뇌 및 뇌줄기의 백색질에서 나타났으나, 성숙한 고양이나 다른 종에서는 나타나지 않았다고 하여 개체발생과 연관하여 발현되며, 종에 따라 차이가 있다는 사실을 뒷받침하였다. 또한 성숙한 고양이 뇌보다는 발생 중인 뇌에서 면역반응성이 더 강하게 나타나서 TGF- α 가 성숙 뇌보다 발생 중인 뇌에서 더 풍부하다는 사실을 입증하였다. 그러나 면역반응의 강도는 주로 세포질의 크기와 관련이 있는데 이는 크기가 더 큰 세포가 TGF- α 항체와 반응할 수 있는 항원을 더 많이 가지고 있다는 것을 나타내 주는 것이므로 발생 중인 뇌에서의 면역반응성이 반드시 더 강하다고 할 수는 없을 것으로 생각된다. 그 이후 Ferrer 등(1996)은 냉동절편을 이용한 경우와 진동박절기(vibratome)를 이용하여 얻은 절편을 free-floating 방법으로 면역조직화학염색하여 서로 비교하여 보고했는데 TGF- α 면역반응에 큰 차이없이 유사한 양상으로 나타났다고 하였으며, TGF- α 단백이 대뇌, 뇌줄기 및 소뇌의 회색질에서 주로 발현되어 TGF- α 면역반응성이 주로 신경세포에서 발현됨을 다시 한번 증명하였다. 이는 신경계통의 거의 모든 세포들이 TGF- α 전구물질을 포함하여 TGF- α 를 합성할 것이라는 사실을 나타내 주었다.

지금까지 알려진 TGF- α 의 기능에 대한 보고에 의하면, TGF- α 가 태생기 뇌신경세포, 감각신경세포 및 망막상피세포의 생존을 증가시키고, 배양 중인 중간

뇌의 도파민 신경세포들의 발달을 증진시킨다는 것이다(Zhang 등 1990, Alexi와 Hefti 1993). 또한 TGF- α 는 별아교세포 배양에서 신경성장인자 mRNA의 합성을 촉진시킨다고도 하였다(Spranger 등, 1990).

또한 발달 중인 흰쥐와 사람 뇌에서 EGF와 TGF- α 수용체가 풍부하여 EGFR의 면역반응은 설치류를 비롯하여 사람 뇌의 신경세포 뿐 아니라 별아교세포에도 존재한다고 하였다(Gómez-Pinilla 등 1988, Werner 등 1988, Ferrer와 Tortosa 1994). Kornbum 등(1997)은 소뇌, 대뇌의 새겉질, 다리뇌 등 뇌의 여러 부위에서 TGF- α mRNA의 발현이 EGFR mRNA보다 선행되어 나타난다고 보고하였다.

본 실험에서, TGF- α 가 P0에 이미 출현하여 연령이 지날수록 여러 부위에 광범위하게 분포되며 성숙해지면서 사이뇌의 대부분에서 뚜렷한 반응을 보이는 것으로 보아 출생 전후에 처음 출현하여 점점 증가하다가 어느 정도 성장이 진행된 시기에 최고치에 도달하는 양상을 취하는 중추신경계통의 성숙에 관여하는 다른 펩타이드처럼(Björklund 등 1992) TGF- α 가 사이뇌 신경세포에서 출생 전에 이미 합성되어 출생 후 신경세포 성숙에 필요한 영양물질로 작용할 것이라고 짐작된다. 그러나 EGFR과 관련하여 그 결합물질들의 더 자세한 기능을 밝히기 위해서는 TGF- α 나 EGF 이외에 HB-EGF, amphiregulin 및 betacellulin 등과 같은 비 EGF 펩타이드 성장인자들과 관련한 더 많은 연구가 뒷받침되어야 할 것이다. 본 실험 결과, TGF- α 면역반응 신경세포는 시상의 안쪽에서 가쪽, 등쪽으로 연장되어 발현되는 양상으로 발달하였고, 또한 생후 20일 경에 뚜렷한 분포양상을 나타낸 점으로 미루어 보아, TGF- α 함유 신경세포는 정상적인 증식, 이동 및 성숙을 하는 시간이 꽤 오래 걸린다는 것을 알 수 있었다. 한편, 대부분의 사이뇌 핵들에서 TGF- α 면역반응이 생후 발달 과정의 초기에 출현하였는데 이는 EGFR 면역반응 신경세포들이 뇌의 여러 부위에 발달 초기에 발현되는 것(정 등 2002)과도 관련이 있으며 TGF- α 가 사이뇌의 기능적 역할의 발달과도 연관이 있을 것이라 사료된다.

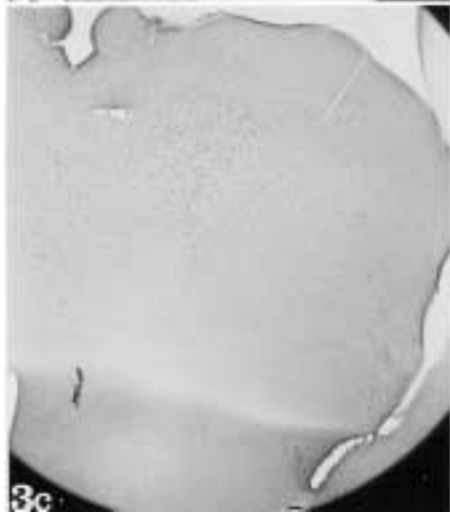
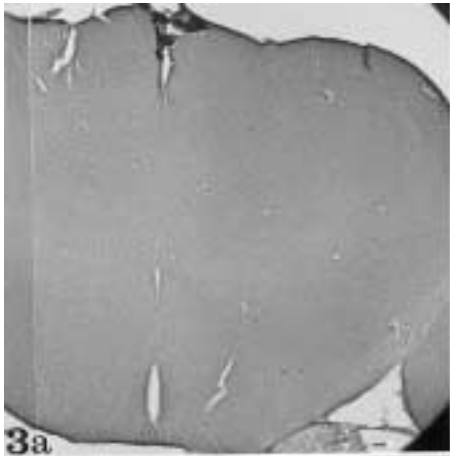
참고 문헌

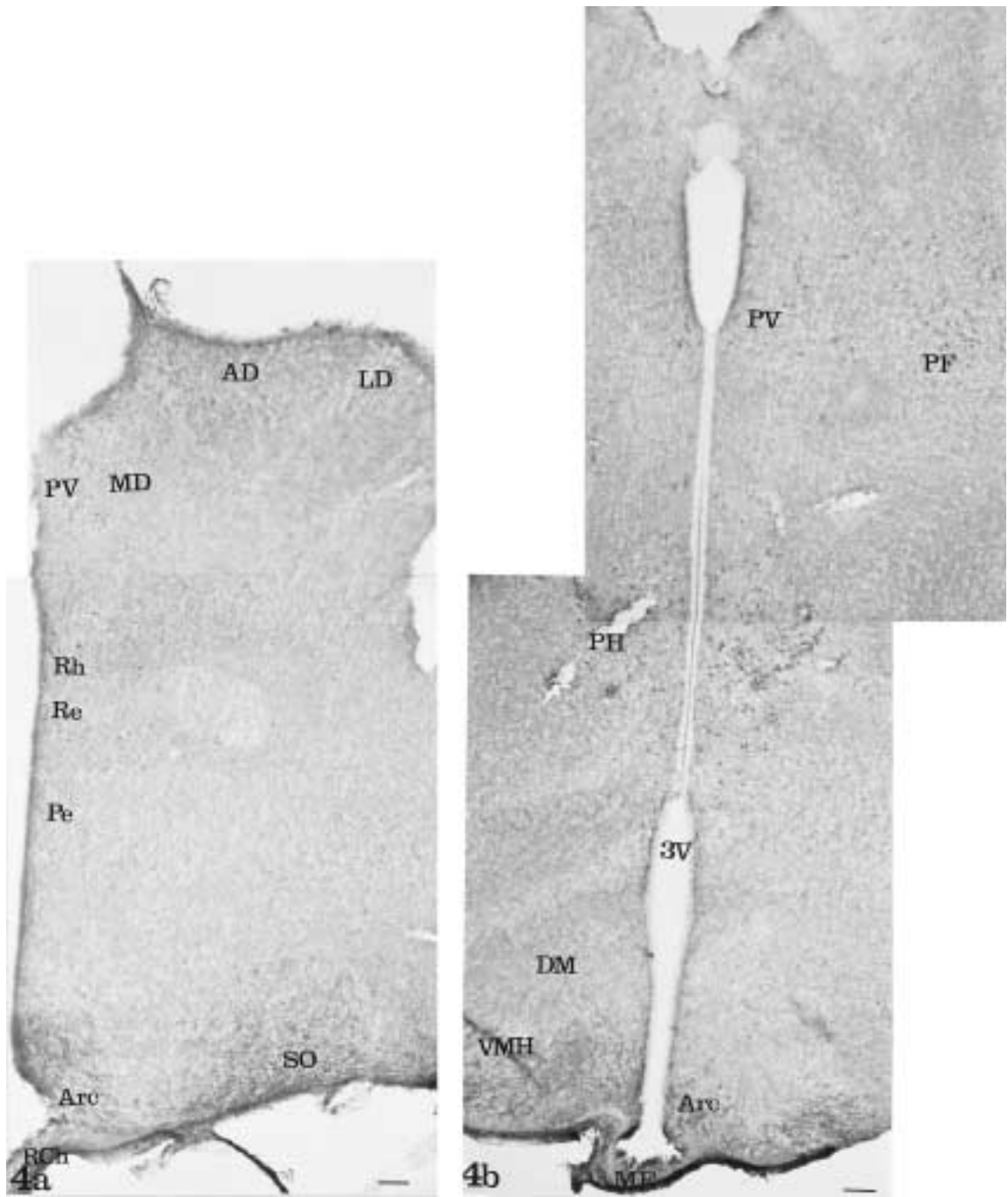
- 정윤영, 김남훈, 김종중, 문정석, 박영란, 류소연, 김현곤 : 흰 쥐 대뇌결절에서 transforming growth factor- α 와 epidermal growth factor receptor면역반응 신경 세포의 생후 발달에 관한 연구. *대한해부학회지* 35 : 269-284, 2002.
- Alexi T, Hefti F : Trophic actions of transforming growth factor- α on mesencephalic dopaminergic neurons developing in culture. *Neuroscience* 55 : 903-918, 1993.
- Björklund A, Hökfelt T, Tohyama M : Ontogeny of transmitters and peptides in the CNS. *Handbook of chemical neuroanatomy* 10 : 647-650, 1992.
- Casper D, Mytilineou C, Blum M : EGF enhances the survival of dopamine neurons in rat embryonic mesencephalon primary cell culture. *J Neurosci Res* 30 : 372-381, 1991.
- Chen WS, Lazar CS, Poenie M, Tsien RY, Gill GN, Rosenfeld MG : Requirement for intrinsic protein tyrosine kinase in the immediate and the actions of the EGF receptor. *Nature* 328 : 820-823, 1987.
- Christensen ME, Poulsen SS : Immunolocalization of transforming growth factor- α in normal human tissues. *Histochem Cell Biol* 105 : 391-400, 1996.
- Derynck R, Goeddel DV, Ullrich A, Gutterman Ju, Williams RD, Bringman TS, Berger WH : Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors α and β and the epidermal growth factor receptor by human tumours. *Cancer Res* 47 : 707-712, 1987.
- Fallon JH, Seroogy KB, Loughlin SE, Morrison RS, Bradshaw RA, Knauer DJ, Cunningham DD : Epidermal growth factor immunoreactive material in the central nervous system: Location and development. *Science* 224 : 1107-1109, 1984.
- Ferrer I, Alcántara S, Ballabriga J, Olivé M, Blanco R, Rivera R, Carmona M, Berrueto M, Pitarch S, Planas AM : Transforming growth factor- α and epidermal growth factor-receptor immunoreactivity in normal and pathologic brain. *Prog Neurobiol* 49 : 99-123, 1996.
- Ferrer I, Blanco R, Carulla M, Condom M, Alcántara S, Olivé M, Planas A : Transforming growth factor- α immunoreactivity in the developing and adult brain. *Neurosci* 66 : 189-199, 1995.
- Ferrer I, Tortosa A : Transforming growth factor- α immunoreactivity in the human cerebral cortex, Implications in Alzheimer's disease. *Brain Path* 4 : 552, 1994.
- Gómez-Pinilla F, Knauer DJ, Nieto-Sampedro M : Epidermal growth factor receptor immunoreactivity in rat brain. Development and cellular localization. *Brain Res.* 438 : 385-390, 1988.
- Guisse TA, Yoneda T, Yates AJ, Mundy GR : The combined effect of tumor-produced parathyroid hormone-related protein and transforming growth factor- α enhance hypercalcemia in vivo and bone resorption in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 77 : 40-45, 1993.
- Han VKM, Hunter ES, Pratt RM, Zendejui JC, Lee DC : Expression of rat transforming growth factor alpha mRNA during development occurs predominantly in the maternal decidua. *Mol Cell Biol* 7 : 2335-2343, 1987.
- Higashiyama S, Abraham JA, Miller J, Fiddlers JC, Klagsbrun M : A heparin binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* 251 : 936-939, 1991.
- Ibbotson KJ, Twardzik DR, Todaro GJ, Mundy GR : Stimulation of bone resorption in vitro by synthetic transforming growth factor-alpha. *Nature* 319 : 516-518, 1985.
- Jhappan C, Stahle C, Harkins RN, Fausto F, Smith GH, Merlino GT : TGF α overexpression in transgenic mice induces liver neoplasia and abnormal development of the mammary gland pancreas. *Cell* 61 : 1137-1146, 1990.
- Kaser MR, Lakshmanan J, Fisher DA : Comparison between epidermal growth factor, transforming growth factor- α and EGF receptor levels in regions of adult rat brain. *Molec Brain Res.* 16:316-322, 1992.
- Kato M, Mizuguchi M, Takashima S : Developmental changes of epidermal growth factor-like immunoreactivity in the human fetal brain. *J Neurosci Res.* 42 : 486-492, 1995.
- Kornblum HI, Hussain RJ, Bronstein JM, Gall CM, Lee DC, Seroogy KB : Prenatal ontogeny of the epidermal growth factor receptor and its ligand, transforming growth factor alpha, in the rat brain. *J Comp Neurol* 380 : 243-261, 1997.
- Lazar LM, Blum M : Regional distribution and developmental expression of epidermal growth factor and transforming growth factor- α mRNA in mouse brain by a quantitative nuclease protection assay. *J Neurosci* 12 : 1688-1697, 1992.
- Leutz A, Schachner M : Epidermal growth factor stimulates DNA-synthesis of astrocytes in primary cerebellar cul-

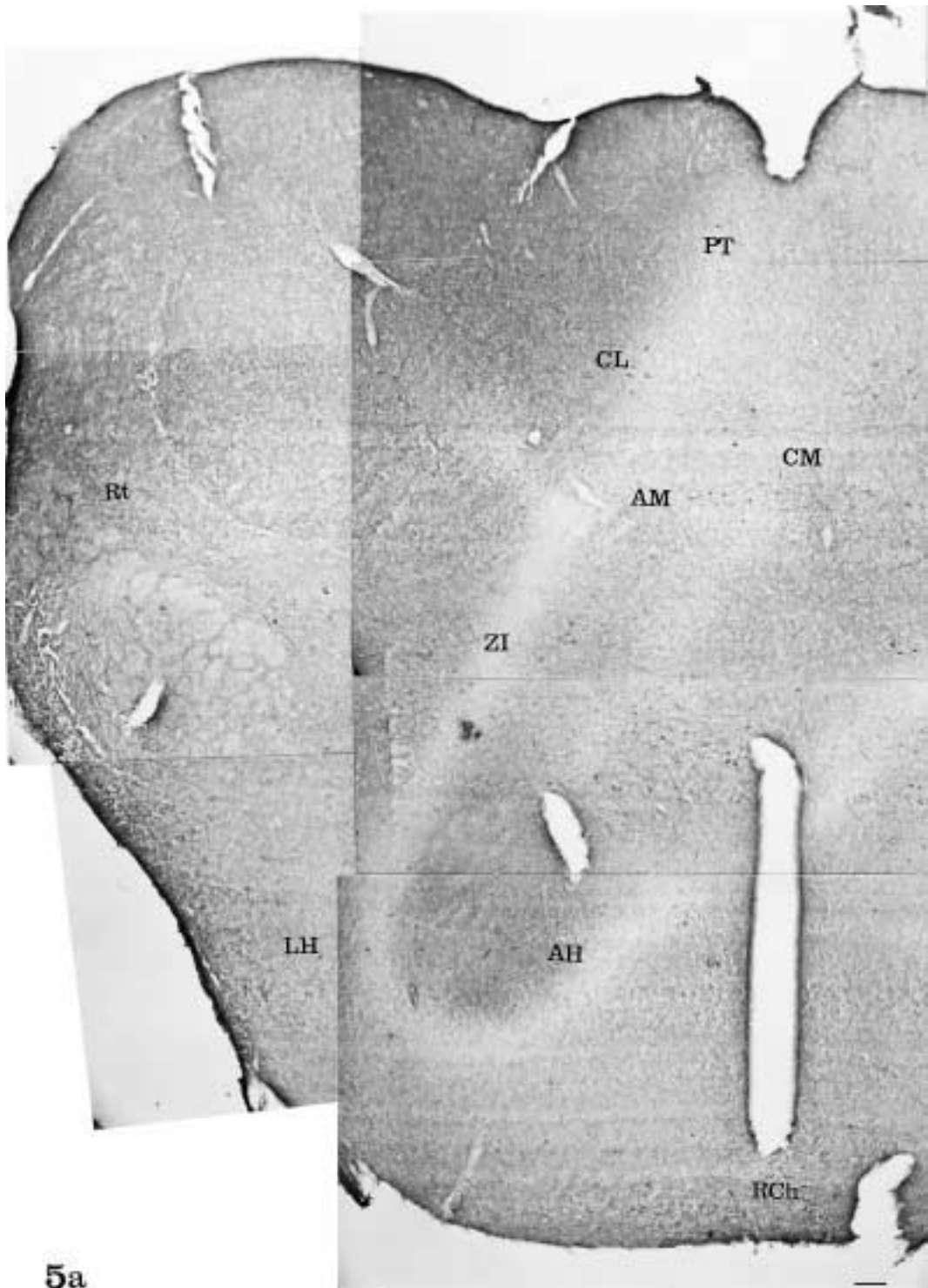
- tures. *Cell Tiss Res* 220 : 393-404, 1981.
- Liu AC, Tsao MS : In vitro and In vivo expression of transforming growth factor- α and tyrosine kinase receptors in human non-small cell carcinomas. *Am J Pathol* 142 : 1155-1162, 1993.
- Marquardt H, Hunkapiller MW, Hood LE, Twardzik DR, De Larco JR, Stephenson JR, Todaro GJ : Transforming growth factors produced by retrovirus-transformed rodent fibroblasts and human melanoma cells: amino acid sequence homology with epidermal growth factor. *Proc natl Acad Sci USA* 80 : 4684-4688, 1983.
- Massagué J : Transforming growth factor- α . A model for membrane-anchored growth factors. *J Biol Chem* 265 : 21393-21396, 1990.
- Miettinen PJ : Transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor expression in human gastrointestinal tract. *Pediatr Res* 33 : 481-486, 1993.
- Paxinos G, Toerk I, Tecott LH, Valentino KL : Atlas of the developing rat brain, San Diego, Academic press. 1991.
- Paxinos G, Watson C : The rat brain in Stereotaxic coordinates, 3rd ed. San Diego, Academic press. 1997.
- Probstmeier R, Schachner M : Epidermal growth factor is not detectable in developing and adult rodent brain by a sensitive double-site enzyme immunoassay. *Neurosci Lett* 63 : 290-294, 1986.
- Reynolds FH, Todaro GJ, Fryling C, Stephenson JR : Human transforming growth factors induce tyrosine phosphorylation of EGF receptors. *Nature* 292 : 259-262, 1983.
- Samsoodar J, Kobrin MS, Kudlow JE : Alpha-transforming growth factor secreted by untransformed bovine anterior pituitary cells in culture. I. purification from conditioned medium. *J Biol Chem* 261 : 14408-14413, 1986.
- Schaudies RP, Christian EL, Savage CR : Epidermal growth factor immunoreactive material in the rat brain. Localization and identification of multiple species. *J Biol Chem* 264 : 10447-10450, 1989.
- Seroogy KB, Han VKM, Lee DC : Regional expression of transforming growth factor- α mRNA in the rat central nervous system. *J Neurochem* 60 : 241-245, 1991.
- Seroogy KB, Lundgren KH, Lee DC, Guthrie KM, Gall CM : Cellular localization of transforming growth factor- α mRNA in rat forebrain. *J Neurochem* 60 : 1777-1782, 1993.
- Seroogy KB, Numan S, Gall CM, Lee DC, Kornblum HI : Expression of EGF-receptor mRNA in rat nigrostriatal system. *Neuro Report* 6 : 105-108, 1994.
- Shing Y, Christofori G, Hanahan D, Ono Y, Sasada R, Igarashi K, Folkman J : Betacellulin : a mitogen from pancreatic beta cell tumors. *Science* 259 : 1604-1607, 1993.
- Shoyab M, Plowman GD, McDonald VL, Bradley JG, Todaro GJ : Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family. *Science* 243 : 1074-1076, 1989.
- Spranger M, Lindholm D, Bandtlow C, Heumann R, Gnahn H, Naher-Noe M, Thoenen H : Regulation of nerve growth factor (NGF) synthesis in the rat central nervous system: comparison between the effects of interleukin-1 and various growth factors in astrocyte cultures and in vivo. *Eur J Neurosci* 2 : 69-76, 1990.
- Tsuboi R, Sato C, Shi CM, Ogawa K : Stimulation of keratinocyte migration by growth factors. *J Dermatol* 19 : 652-653, 1992.
- Werner MH, Nanney LB, Stosjcek CM, King LE : Localization of immunoreactive epidermal growth factor receptors in human nervous system. *J Histochem* 36 : 81-86, 1988.
- Zahng M, Woo DDL, Howard BD : Transforming growth factor α and PC12-derived growth factor induce neurites in PC12 cells and enhance survival of embryonic brain neurons. *Cell Regul* 1 : 511-521, 1990.

Legends for Figures

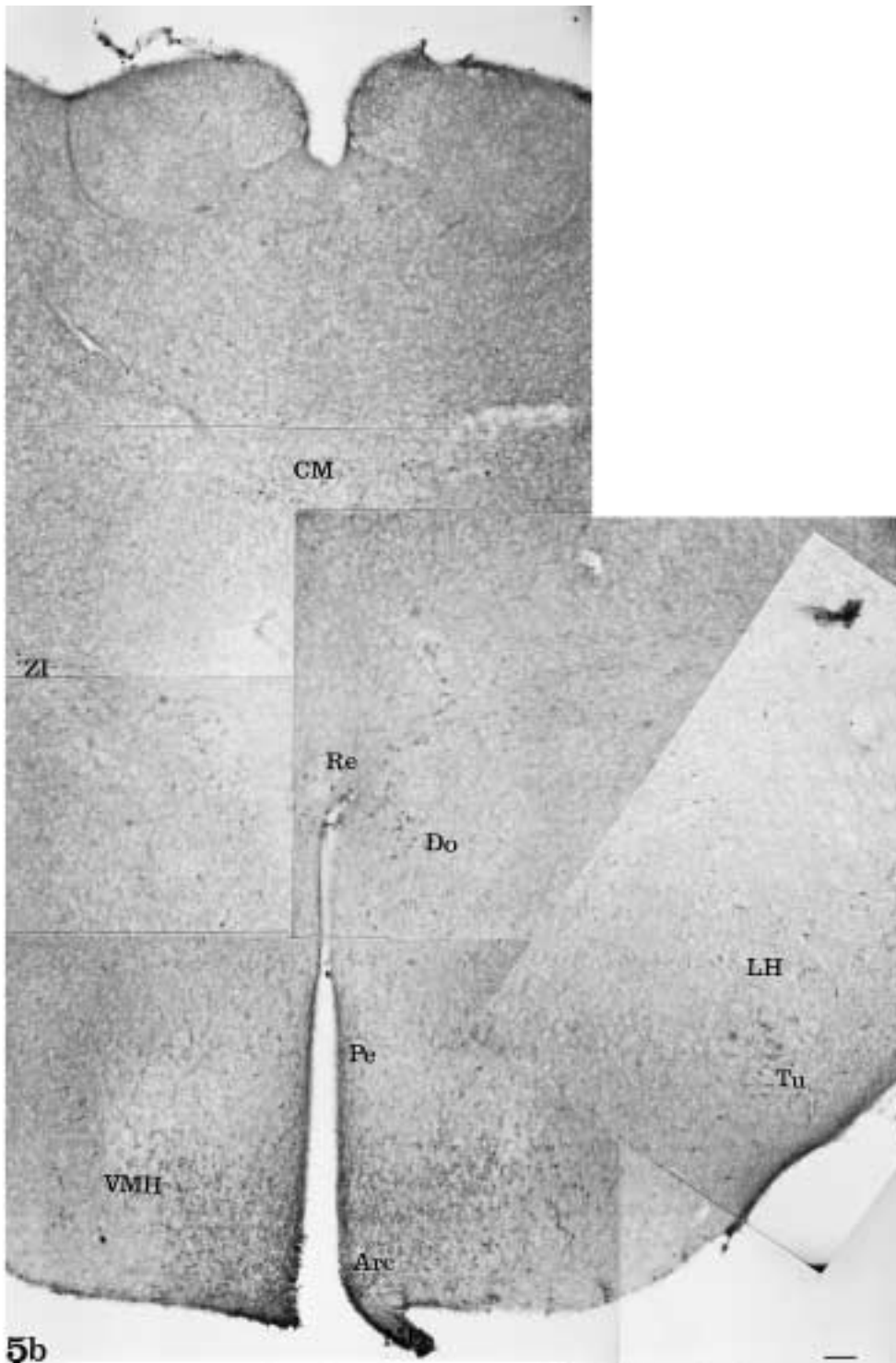
- Fig. 3.** Low-power photomicrographs of TGF- α -immunoreactivity in the rat diencephalon at different postnatal ages. Note the progressive increase in the immunoreactivity of the midline structure and extending in the lateral, dorsal and ventral portion. P0 (a), P3 (b), P5 (c), P7 (d), P90 (e). Bars = 100 μ m
- Fig. 4.** Photomicrographs of TGF- α -immunoreactive cells in the rostral (a) and caudal level (b) at P0. TGF- α -immunoreactive cells are appeared concentrated in the midline structures. Bars = 100 μ m
- Fig. 5.** Low magnification montage in middle (a) and caudal level (b) of diencephalon at P3. The intensity of TGF- α -immunoreactive cells in hypothalamus is stronger than in thalamus. Bar = 100 μ m
- Fig. 6.** Photomicrographs of TGF- α -immunoreactive cells in the thalamus (a) and hypothalamus (b) at P5. TGF- α -immunoreactive cells appears in LP, VM, VL and PC. Bar = 100 μ m
- Fig. 7.** Photomicrographs of TGF- α -immunoreactive cells in caudal level of diencephalon at P7. TGF- α -immunoreactive cells appears in DM. Bar = 100 μ m
- Fig. 8.** Photomicrographs of TGF- α -immunoreactive cells in the thalamus (a) and hypothalamus (b) at P10. The number of TGF- α -immunoreactive cells increase in the median nuclei and AH. Bar = 100 μ m
- Fig. 9.** Photomicrographs of TGF- α -immunoreactive cells in the dorsal thalamus and epithalamus (a, b) at P20. The number and intensity of TGF- α -immunoreactive cells increase throughout thalamus and epithalamus. Bar = 100 μ m
- Fig. 10.** Photomicrographs of TGF- α -immunoreactive cells in the adult diencephalon. The number of TGF- α -immunoreactive cells increase throughout diencephalon. Bar = 100 μ m
- Fig. 11.** Photomicrographs of TGF- α -immunoreactive cells in Arc, RCh and ME at P0 (a), P3 (b), P7 (c), P10 (d), P20 (e) and P30 (f). At birth, the immunoreactivity of TGF- α is well evident and it is constant during postnatal development. Bar = 100 μ m
- Fig. 12.** Photomicrographs of TGF- α -immunoreactive cells in the ventral and reticular thalamic nuclei at P7 (a), P10 (b) and P90 (c). The number of TGF- α -immunoreactive cells increase progressively in the ventral thalamus and Rt. Bar = 100 μ m
- Fig. 13.** Photomicrographs of TGF- α -immunoreactive cells in the supraoptic nucleus of hypothalamus at P0 (a) and P7 (b). The number and intensity of TGF- α -immunoreactive cells increase progressively in the SO. Bar = 100 μ m

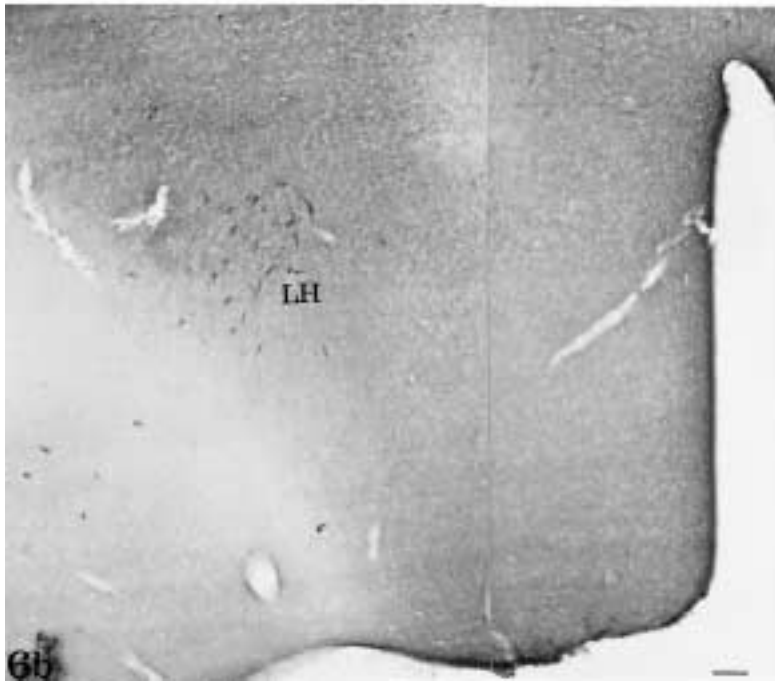
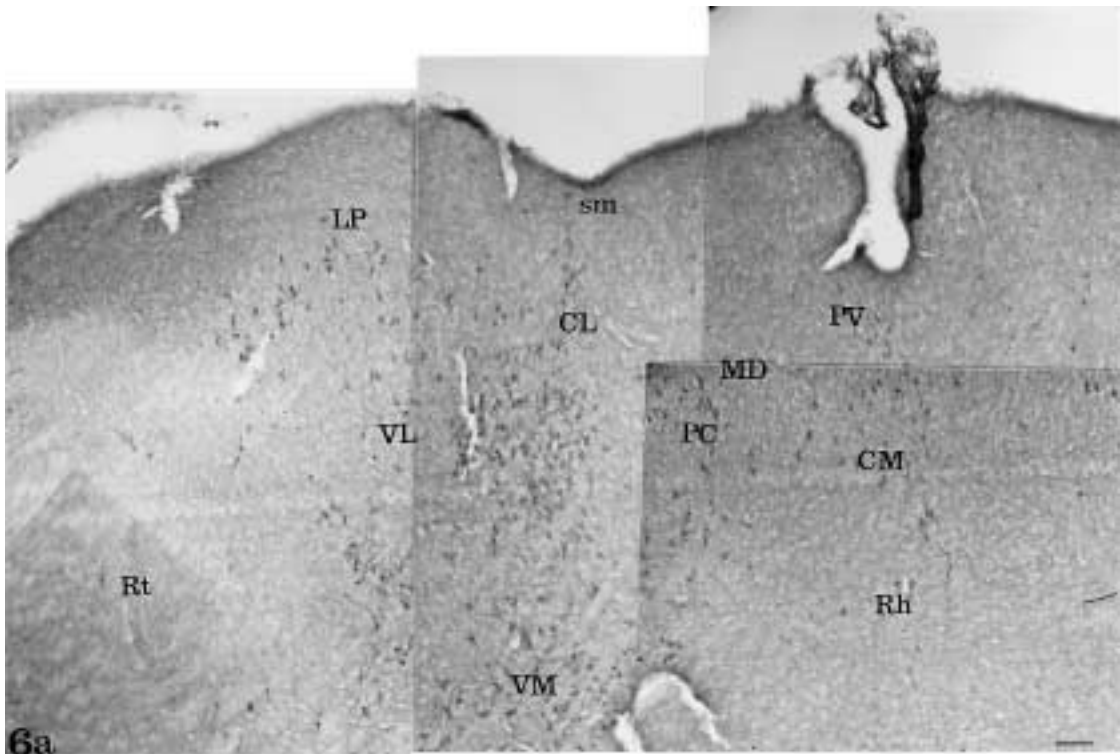


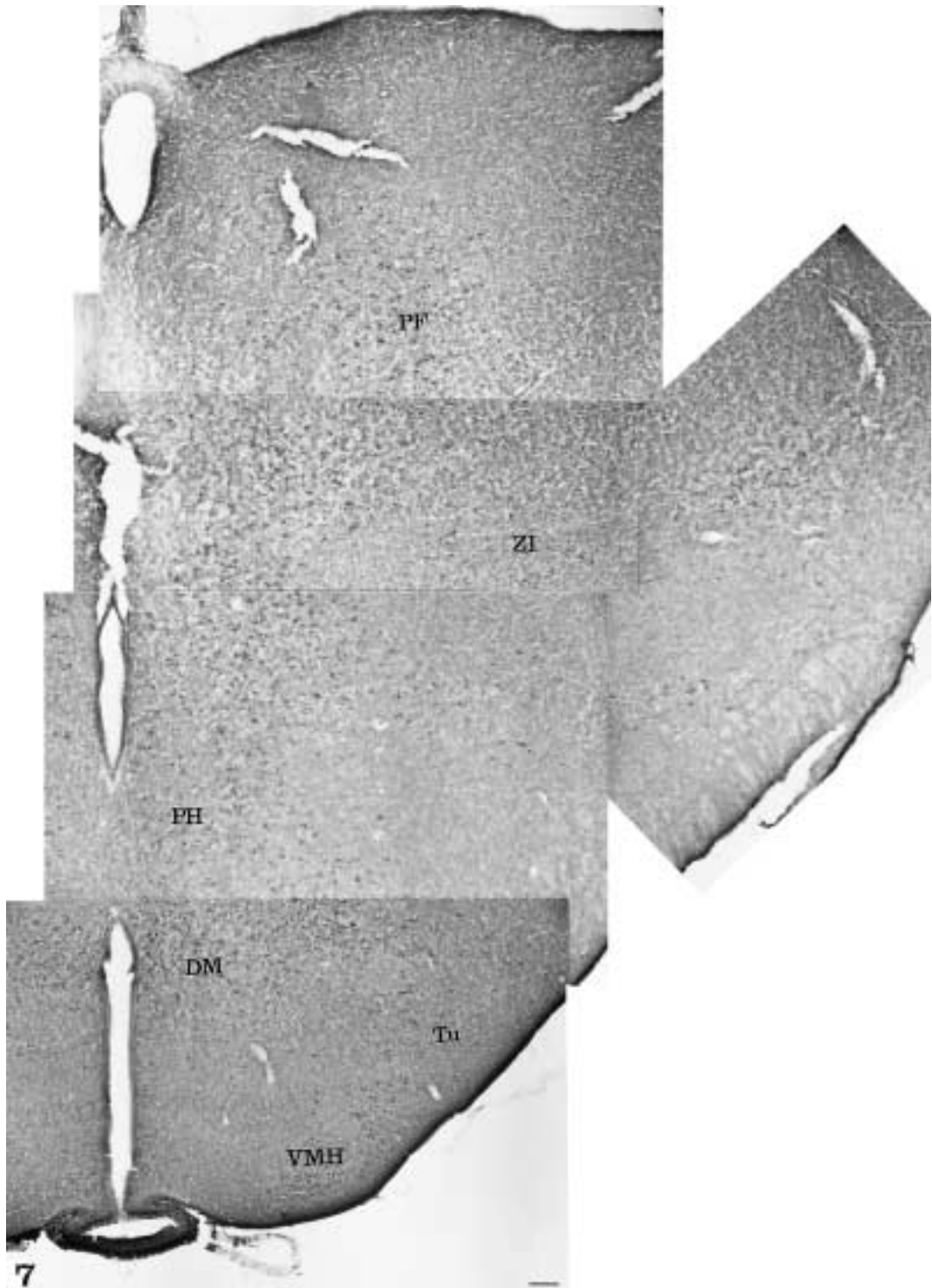


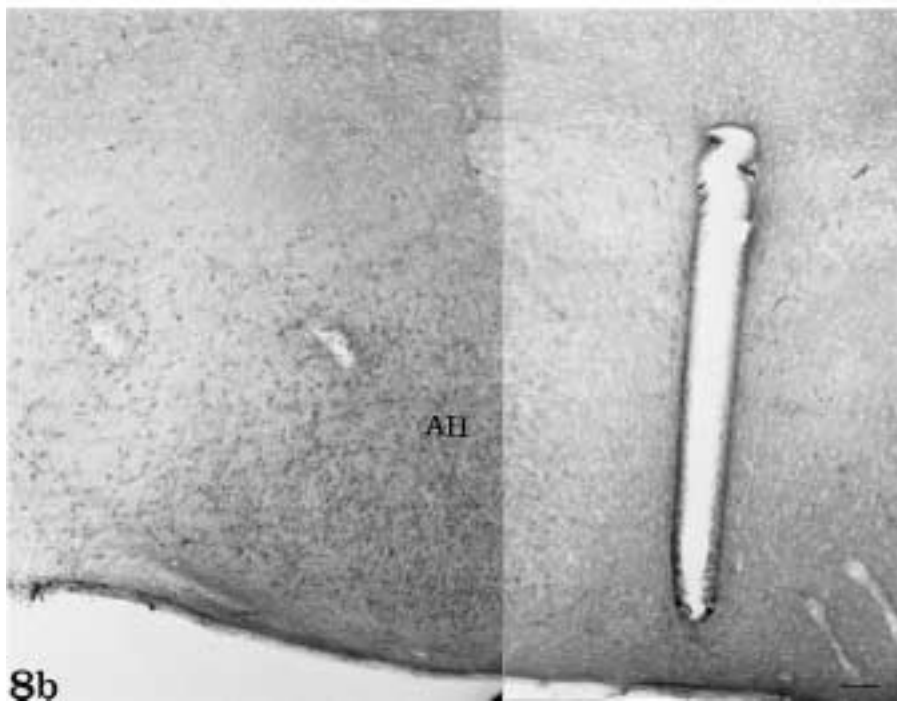
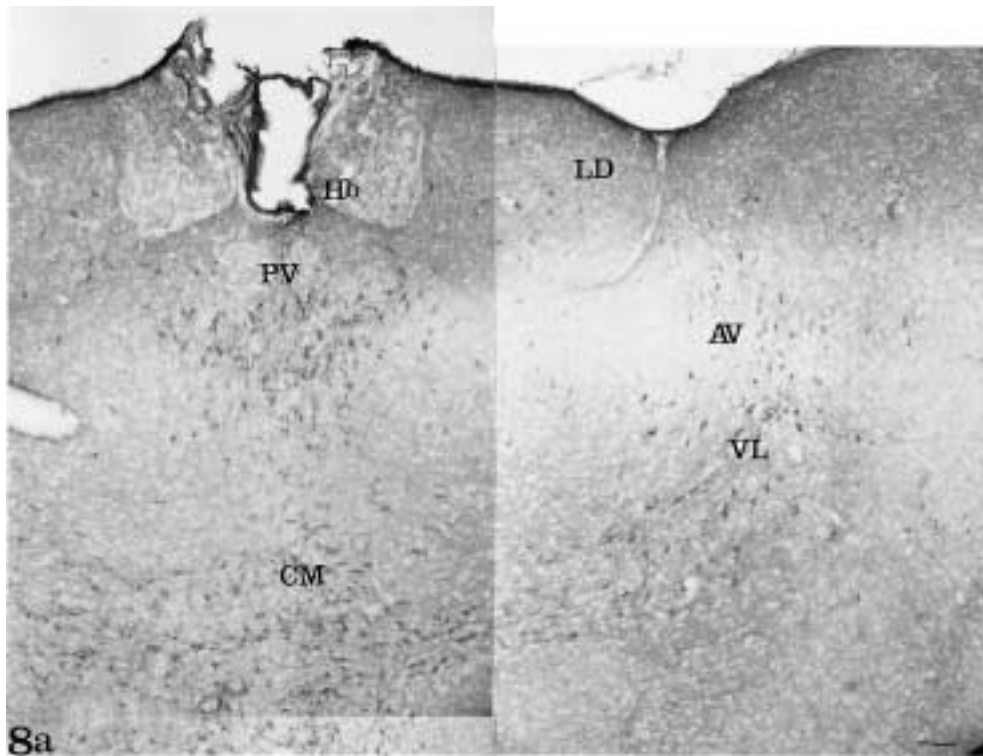


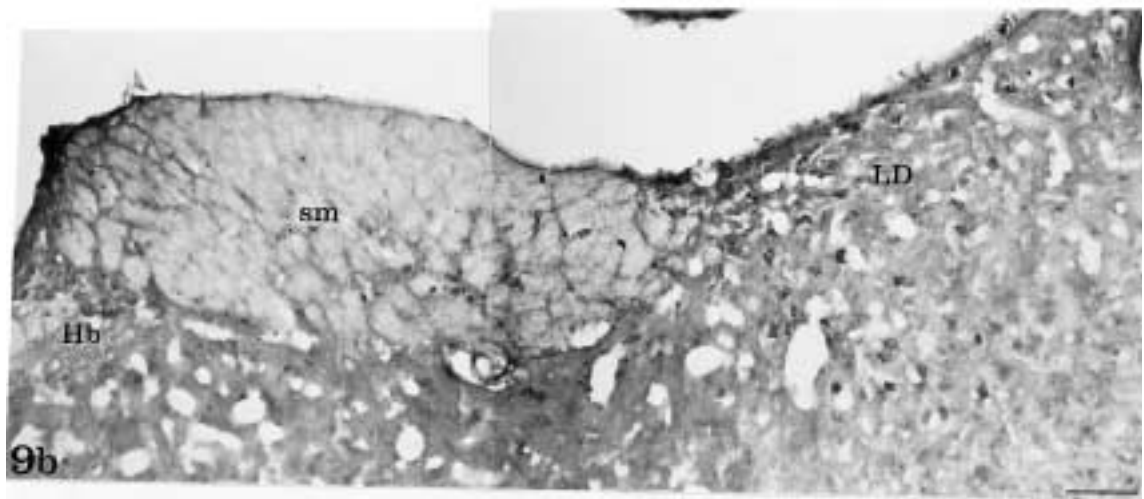
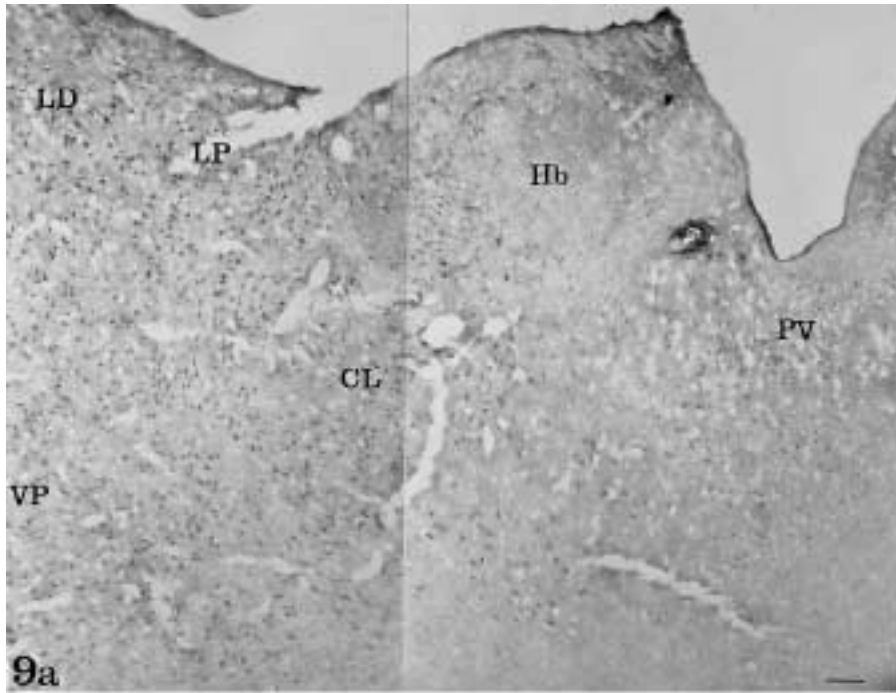
5a

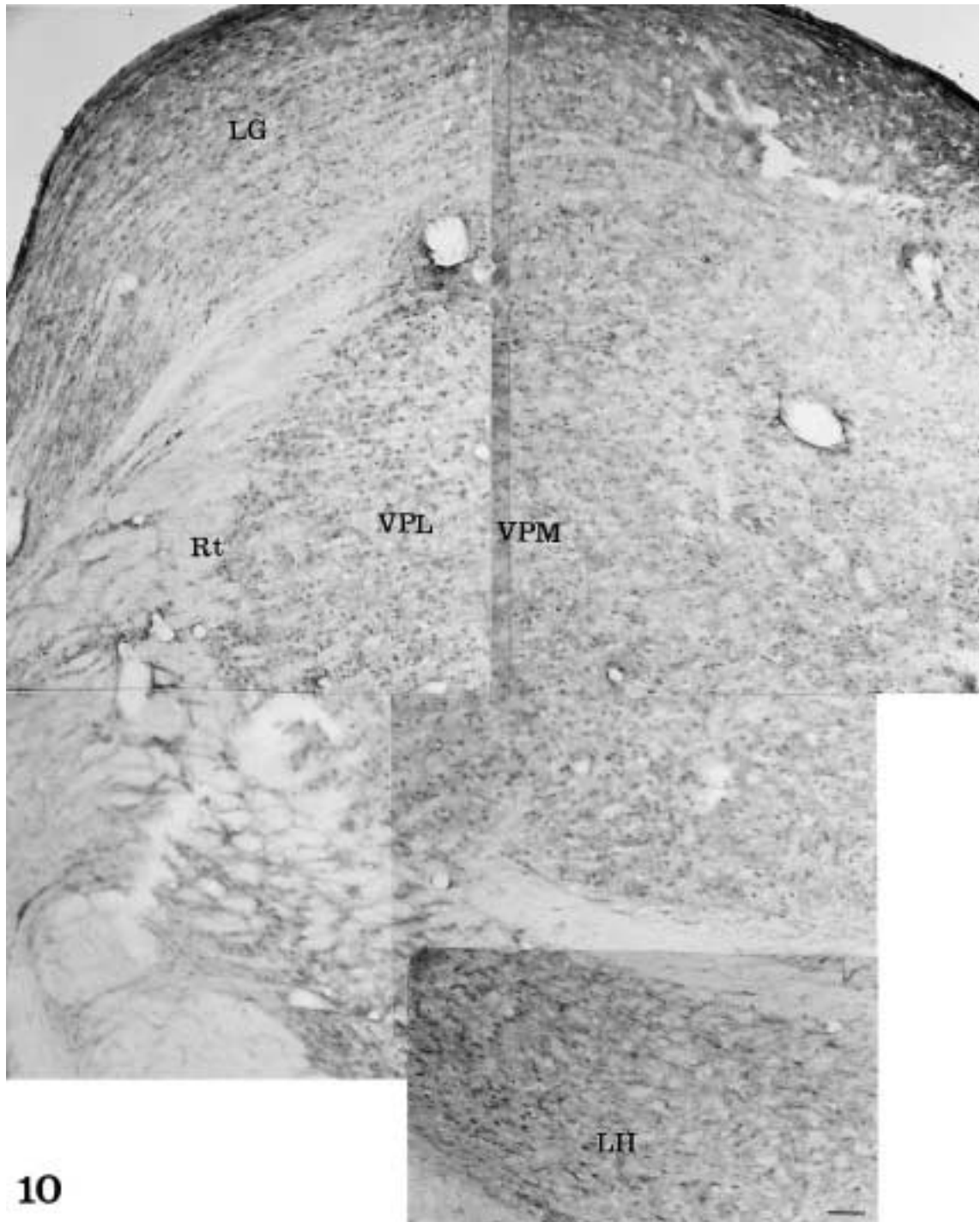






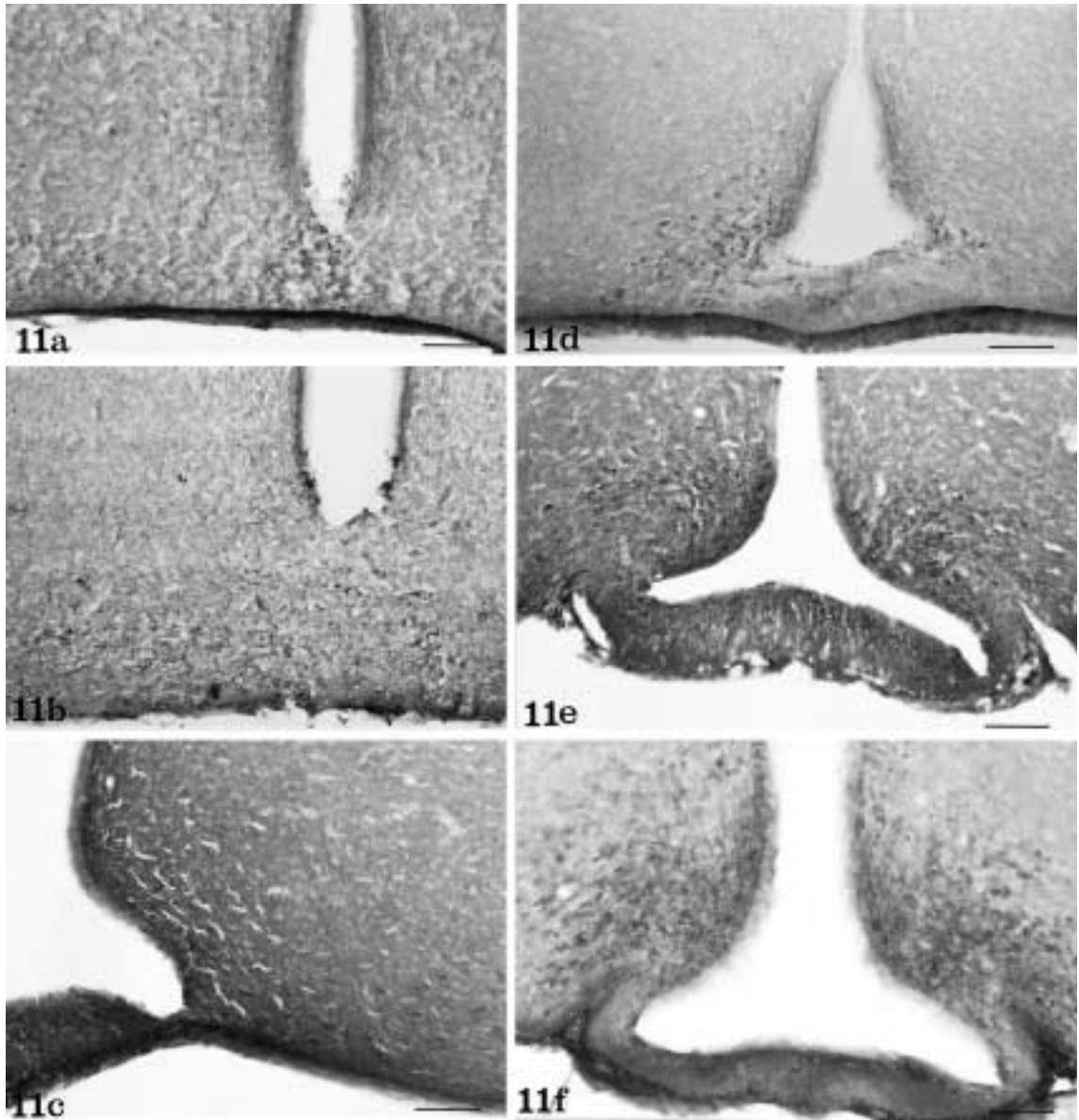


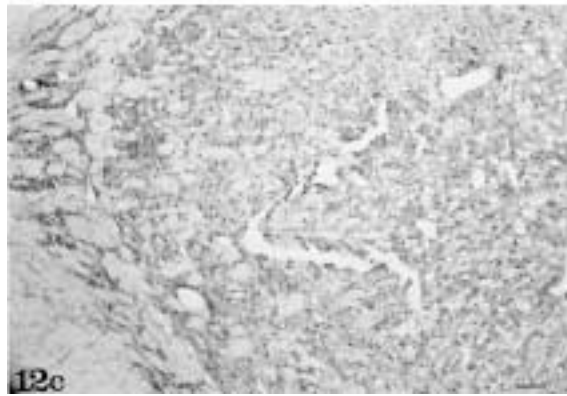
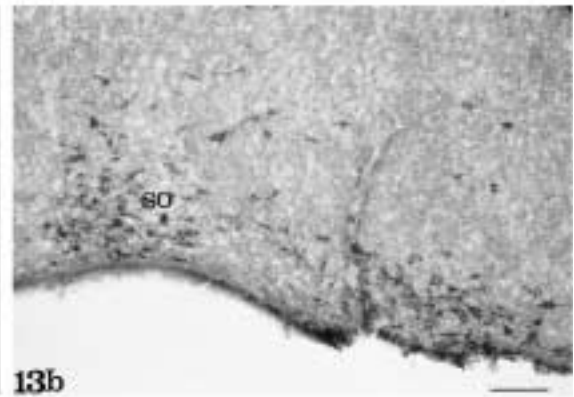
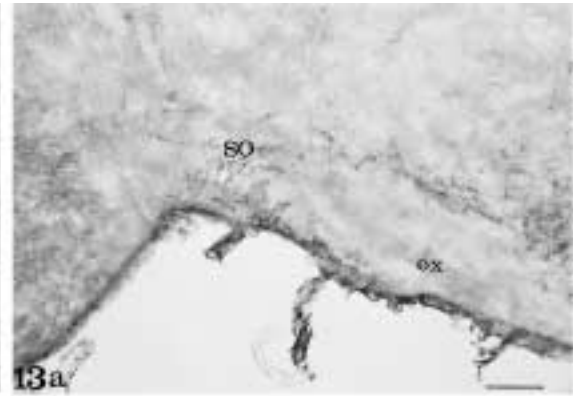




10

— 사이뇌의 생후 발달에 따른 TGF- α 면역반응성의 변화 —





Abstract

**Postnatal Development of Transforming Growth factor- α -
immunoreactive Neurons in the Diencephalon of the Rat**

Young-Lan Park, Hong-Soon Kim¹, Jae-Wook Oh, Jong-Joong Kim,
Jeong-Seok Moon, Sang-Bong Jeong, Yoon-Young Chung

Department of Anatomy, College of Medicine, Chosun University

¹Department of Anesthesiology, Gachon Medical College

Transforming growth factor- α (TGF- α) immunoreactivity during postnatal development was examined in the rat diencephalon using immunohistochemistry. The time of appearance and localization of TGF- α immunoreactivity was slightly different in many areas of diencephalon during postnatal development. At birth, TGF- α immunoreactivity was mainly evident in thalamic medial, median and parafascicular thalamic nucleus of intralaminar nuclei. In addition, TGF- α immunoreactivity was clearly evident at the first postnatal week in most hypothalamic nuclei. Therefore, TGF- α immunoreactivity was found at postnatal days 7 in most diencephalic nuclei excepting the ventral posterior thalamic nuclei, metathalamus and epithalamus. The quantitative increase of number was first apparent in the midline structures of thalamus in the first postnatal week. And then TGF- α -immunoreactive cells progressively increased throughout diencephalon by postnatal days 15. Adult patterns were reached at postnatal days 20. These results indicate that TGF- α -immunoreactive cells were first appeared in thalamic midline structures, increased progressively in the first two postnatal weeks, and followed mediolateral gradient. In addition to maturation of TGF- α -immunoreactive cells requires a relatively prolonged period of time to achieve an adult configuration. Also, the early appearance of TGF- α immunoreactivity in most diencephalic nuclei may be related to the early appearance of EGFR immunoreactivity in many other brain regions. Taken together, these findings suggest that TGF- α immunoreactivity correlated with the appearance of the related functional activity in the different regions of diencephalon.

Key words : Transforming growth factor- α , Diencephalon, Rat, Immunohistochemistry