

전신 고열자극이 랫트 자가면역성 뇌척수염에 미치는 영향

안 미 정

제주대학교 의학전문대학원 해부학교실

Abstract

Whole-body hyperthermia attenuates rat experimental autoimmune encephalomyelitis

Meejung Ahn

Department of Anatomy, Jeju National University School of Medicine, Jeju, Korea

Hyperthermia has been known to induce transient expression of 27 kDa heat shock protein (HSP27) in several types of cells in the central nervous system. Little is known about the effects of whole-body hyperthermia in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in the rat. The aim of this study was to examine whether wholebody hyperthermia affect the clinical symptoms of EAE in rats. EAE was induced in Lewis rats that were immunized with guinea pig myelin basic protein (MBP) and complete Freund's adjuvant. At 7 days after immunization, the immunized rats were divided into three groups including placed into a 42°C incubator for 10 minutes, for 20 minutes and room temperature. The onset, severity, and duration of EAE paralysis in the wholebody hyperthermia treated groups in the day 7 PI-treated rats were significantly delayed, suppressed, and reduced, respectively, compared with those of the EAE control group. Moreover, the clinical amelioration coincided with decreased infiltration of inflammatory cells in the EAE-affected spinal cord. Collectively, wholebody hyperthermia has shown to reduce paralysis in EAE, an animal model of human demyelinating diseases. (J Med Life Sci 2009;6:308-311)

Key Words : Hyperthermia, Heat shock protein, experimental autoimmune encephalomyelitis, Inflammation

서 론

자가면역성 뇌척수염(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)은 T세포매개성 질병으로 사람의 다발성 경화증(multiple sclerosis, MS)의 동물모델로 활용된다¹⁾. 이러한 EAE의 질병의 초기에는 중추신경계에 T세포와 다른 염증세포가 침윤되며, 염증의 과도기에는 미세아교세포(microglia)와 별아교세포(astrocytes)가 활성화 되고, 수초탈락을 특징으로 한다²⁾. EAE의 발병은 뇌의 조직 내에 침윤된 염증세포로부터 분비된 pro-inflammatory cytokine (IL-1 β , TNF- α 등)에 의해 야기되며³⁾, 심한 마비기를 지니게 되면 anti-inflammatory cytokine (IL-4, IL-10, TGF- β 등)의 작용⁴⁾과 침윤된 염증세포의 세포자멸사 (apoptosis)에 의해 자연 회복하는 것으로 알려져 있다⁵⁾. 그러나 심한 염증세포의 침윤은 오히려 질병 상태와 임상 증상을 악화시킬 수도 있다고 알려져 있다⁶⁾. 그러므로 EAE에서 염증세포의 조절은 치료의 목표가 된다.

Heat shock proteins (HSPs)는 다양한 세포자극에 의해 유도되는 단백질로 크기에 따라 다양하게 분류된다⁷⁾. HSPs는 특히 고열자극으로 강하게 유도되는데, 세포나 기관 내에서 분비되는 HSPs는 대사과정에서 생산되는 열에 대하여 세포를 보호하기 위하여 유도된다고 알려져 있다⁸⁾. Marber 등⁹⁾의 보고에 의하면, 허혈성 손상에서 고열자극을 주었을 때 HSP70의 발현이 증가하고, 증가된 HSP70에 의해 세포 보호효과가 나타난다고 하였다. 그리고 HSP27도 랫트의 중추신경계에서 여러 자극에 의해 유도되어 세포 보호효과가 있다고 알려져 있다¹⁰⁾.

그러나 아직까지 EAE에서 고열자극에 의한 HSP27의 반응과 그 효과에 대해서는 알려진바 없다.

그러므로 본 연구에서는 랫트에서 EAE를 유발시키고, 전신 고열자극에 의한 치료 효과와 HSP27의 발현을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

암수 구별 없이 160-200 g 이 되는 7-12주령의 Lewis 랫트를 Harlan (Indianapolis, IN, USA)에서 구입 후에 제주대학교 실험동물 관련 규정에 의거하여 사육 후 실험하였다.

Address for correspondence : Meejung Ahn
Department of Anatomy, Jeju National University School of
Medicine, 66 Jejudaehakno, 690-756, Jeju, Korea
E-mail : healthy@jejunu.ac.kr

2. EAE의 유발과 임상증상의 평가

EAE의 유발은 기니픽의 myelin basic protein (MBP)과 complete Freund's adjuvant (CFA; Mycobacterium tuberculosis H37Ra, 3 mg/mL; Difco)를 동량 혼합한 후 면역원으로 사용하였다²⁾. 면역원은 레트의 좌우뒷발바닥에 100 μ l씩 접종하였다. 대조군은 고열을 처리하지 않았고, 실험군은 면역원을 접종한 후 7일째에 42°C에 10분 동안 전신 노출한 군과 20분 동안 전신 노출한 군으로 나누었다. EAE가 유발된 랫트는 EAE의 특징적인 임상증상으로 구분하였다. 증상 없으면 Grade 0, 꼬리가 힘없이 늘어지면 Grade 1, 한쪽 뒷다리가 마비되면 Grade 2, 양쪽 뒷다리가 마비되면 Grade 3, 사지가 마비되면 Grade 4, 폐사한 경우 Grade 5로 구분하였다²⁾.

3. 조직표본 준비와 조직 검사

랫트를 CO₂로 마취하여 방혈하였고, 조직채취는 EAE가 유발된 랫트를 12-14일경에 임상증상이 Grade 3 시기와 21일 이후 회복기로 나누어 각각의 실험군 3마리씩 희생시켜 척수를 채취하였다. 그리고 현미경 관찰을 위한 조직은 10% 포르말린 고정하고, 에탄올과 자일렌으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 파라핀에 포매한 후 5 μ m의 두께로 조직절편을 만들어 hematoxylin-eosin 염색을 실시하였다.

4. 면역조직화학

슬라이드 준비된 조직의 파라핀을 제거하고 내재성 peroxidase를 제거하기 위해 0.3% H₂O₂가 포함된 메탄올에 20분간 반응시켰다. 비특이적 반응을 방지하기 위해 10% normal goat serum으로 1시간 반응시켰다. 1차 항체로 HSP27 (1:200)(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U. S. A), 랫트의 대식세포 표식자인 ED1 (1:200)(Serotec, London, U. K.) 그리고 rabbit anti-GFAP (1:400)(Dako, Denmark)를 실온에서 1시간 반응시킨 후 biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:200)(Vector Laboratories, Burlingame, CA) 또는 biotinylated goat anti-mouse IgG (1:200)(Vector Laboratories, Burlingame, CA)로 45분간 반응시켰다. 이어 avidin-biotin peroxidase complex Elite kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA)로 실온에서 45분간 반응시켰다. 각 단계가 끝나고 PBS (pH 7.4)로 5분간 3회 충분히 세척했으며, 면역반응이 끝난 조직절편은 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)(Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액으로 발색했다. 그리고 hematoxylin 용액으로 대조염색을 한 후, 에탄올과 자일렌으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

결과

1. 고열 자극에 의한 EAE 임상증상의 완화

EAE 유도 후에 고열에 의한 치료 효과를 확인한 결과, 실온으

로 처리한 대조군과 고열을 처리한 실험군에서 모두 마비증상을 나타내었으나, 고열을 처리한 두 실험군에서 모두 마비의 정도가 대조군에 비해 염증의 과도기인 16일째에서 유의성 있게 완화되었음을 확인하였다 (Fig. 1). 마비가 시작된 날을 기준으로 비교할 때, 대조군은 13일부터 마비가 시작되었고, 고열을 치료한 두 실험군은 약 14일부터 마비가 시작되어 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 단계별로 임상증상을 확인한 결과, 대조군은 뒷다리 한쪽 또는 뒷다리가 모두 마비가 되는 단계인 grade 2-3 정도를 나타낸 반면에 10분과 20분 동안 고열을 처리한 두 실험군에서는 각각 grade 1 이하로 유의성 있게 마비 증상이 완화되었다 ($p < 0.05$). 마비 기간을 비교한 결과, 대조군은 약 6일 동안 마비가 지속되었고, 10분 동안 고열을 처리한 실험군에서는 약 3일, 20분간 고열을 처리한 실험군에서는 약 4일로 두 실험군 모두 대조군에 비해 유의성 있게 마비 기간이 줄어들었다 ($p < 0.05$)(Table 1).

Figure 1. Clinical score of EAE induced in Lewis rats with or without hyperthermia treatment. At 7 days post-immunization, the immunized rats were divided into three groups including placed into a 42°C incubator for 10 minutes, for 20 minutes and room temperature. The values were reported as the mean \pm SE of four rats in each group. * $p < 0.05$ vs. EAE-room temperature group, respectively.

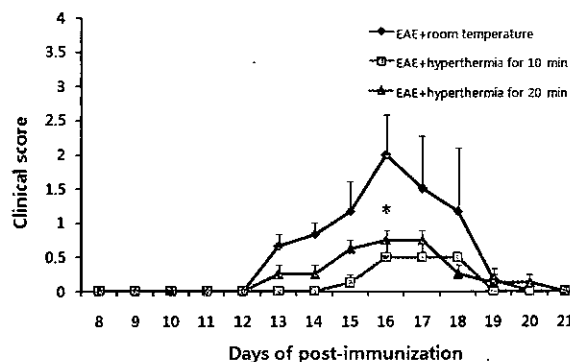


Table 1. Effect of hyperthermia on the clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).

Treatment	Incidence of EAE ^a	First onset ^b	Average of max. clinical score	Duration of paralysis ^c
Control	3/3	13.0 \pm 0	2.33 \pm 1.15	6.33 \pm 0.58
42°C, 10min	4/4	14.3 \pm 1.5	0.6 \pm 0.25*	2.8 \pm 1.26*
42°C, 20min	4/4	14.0 \pm 1.2	0.75 \pm 0.3*	4.25 \pm 1.5*

Data are expressed as the means \pm SEM

* $P < 0.05$ vs. control (Student's *t*-test)

^a Paralyzed/total animals

^b Onset of paralysis

^c In days

2. 고열자극후 척수조직내 염증의 완화

척수에 나타나는 조직학적 병변은 EAE 유도 후 9-11일경의 발병초기에는 자기면역 반응한 염증세포들이 수막주위에 나타났으며, 수막근처 실질 내로도 염증세포가 침윤되었다. 12-15일경의 EAE 대조군의 척수조직에서는 염증세포들이 주로 수막과 혈관주위에 침윤되었고, 조직 내 부종을 보였다(Fig. 2A).

그러나 10분간 고열을 처리한 실험군(Fig. 2B)과 20분간 고열을 처리한 실험군(Fig. 2C)에서 모두 대조군에 비해 염증세포의 침윤이 완화되었다(Fig. 2).

척수 조직 실질 내의 혈관주위에 침윤된 염증세포의 수를 조사한 결과, 역시 대조군에 비해 10분 동안 고열을 처리한 실험군에서 혈관주위 염증세포의 침윤이 유의성 있게 감소되었다 ($p < 0.01$) (Fig. 3).

3. HSP27의 발현

EAE 유도 후에 고열의 자극에 의해 발현할 수 있는 HSP27의 발현은 고열을 전신 조사한 실험군과 대조군에서 별아교세포, 신경원 세포체, 뇌실막 세포, 혈관내피세포 등에서 HSP27이 강하게 발현하였으나 두 그룹간의 차이는 분명하지 않았다 (Fig. 4).

Figure 2. Histopathological examination of the spinal cords of rats with EAE (Day 21PI) that were treated with either room temperature (EAE control, A) or hyperthermia (B, C) on 42°C incubator for 10 minutes, for 20 minutes and room temperature. The values were reported as the mean \pm SE of four rats in each group. * $p < 0.05$ vs. EAE-room temperature group, respectively.

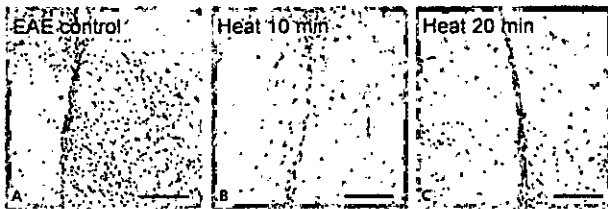
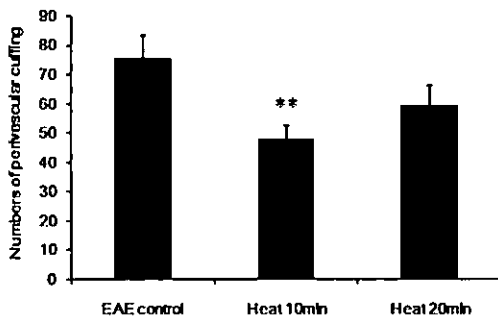


Figure 3. Number of perivascular cuffing in the spinal cords of rats with EAE (Day 21PI) that were treated with either room temperature or hyperthermia on 42°C for 10 min and for 20 min. The number of perivascular cuffing was significantly decreased in the hyperthermia for 10 min group compared with EAE control group. ** $p < 0.01$ vs EAE-room temperature group.



고찰

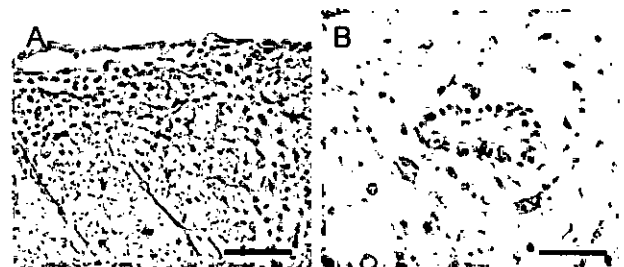
본 연구에서 EAE 유도 후 고열을 처리한 두 실험군 모두에서 대조군에 비해 임상증상이 현저히 완화되었다. 마비를 유도하는 가장 큰 원인이 되는 척수 내 염증세포의 침윤도 고열을 처리한 실험군에서 대조군에 비해 현저히 감소하였다. 그러므로 고열 자극이 염증성 질환에 효과적일 수 있고, 특히 EAE에서 고열 자극이 임상 증상의 완화에 효과적일 수 있다고 생각된다.

고열자극 후 HSP는 랫트와 마우스를 포함한 다양한 종에서 분비된다고 알려져 있다¹¹⁾. 항생제에 대해 반응할 때 마취상태에 있는 동물에서는 체온이 증가한다고 알려져 있고, 이러한 경우에는 중추신경계의 세포손상이나 조직변성이 형태학적 변화로 나타나지는 않는다¹²⁾. 그러므로 고열을 이용한 치료 시에 HSP와 같은 반응 인자들에 의해 세포 보호 효과가 있을 것으로 생각된다^{13, 14)}. EAE에서도 이러한 고열을 이용하였을 경우, HSP의 발현을 통해 신경세포의 보호 효과 및 염증세포의 침윤 완화 효과가 있을 것으로 생각된다.

정상 랫트의 중추신경계에서 HSP27은 별아교세포와 신경세포에서 발현하고, 외부적 자극에 의해 더욱 강하게 발현하여 HSP27의 발현이 이러한 세포들이 활성화되었다는 증거가 될 수 있다¹⁵⁾. 또한 HSP27의 발현의 증가는 caspase 반응으로 인해 유도된 세포자멸사를 억제한다고 알려져 있다¹⁶⁾. 본 연구에서도 고열에 의해 분비되는 HSP27의 발현은 별아교세포와 신경세포에서 강하게 발현하였다. 그러나 본 연구에서는 HSP27의 발현을 면역조직화학법으로 확인하여 정량화하지 않았기에 고열을 조사한 실험군과 대조군에서의 HSP27의 발현의 차이를 확인할 수 없었다. 고열 자극에 의한 HSP27의 신경세포 보호 효과를 확인하기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로 EAE에서 고열 자극이 염증세포의 침윤과 임상 증상의 완화를 유도하였고, 세포 보호 효과가 알려져 있는 HSP27이 고열 자극에 의해 발현되어 자가면역성 염증성 질환에서 고열 치료 효과를 매개하는 중요한 인자 중 하나일 것으로 생각된다.

Figure 4. Immunohistochemical localization of HSP27 in spinal cord of rats with EAE (day 21 PI). HSP27 was detected in the astrocytes (A), ependymal cells and neuronal body (B), but the differences of intensity between groups were not clear. Scale bar = 50 μ m



감사의 글

실험에 도움을 주신 제주대학교 수의과대학 신태균 교수님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Raine CS, Traugott U. Experimental autoimmune demyelination. Chronic relapsing models and their therapeutic implications for multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1984;436:33-51.
- 2) Shin T, Kojima T, Tanuma N, Ishihara Y, Matsumoto Y. The subarachnoid space as a site for precursor T cell proliferation and effector T cell selection in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 1995; 56:171-8.
- 3) Tanuma N, Kojima T, Shin T, Aikawa Y, Kohji T, Ishihara Y, et al. Competitive PCR quantification of pro- and anti-inflammatory cytokine mRNA in the central nervous system during autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 1997;73:197-206.
- 4) Schmied M, Breitschopf H, Gold R, Zischler H, Rothe G, Wekerle H, et al. Apoptosis of T lymphocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. Evidence for programmed cell death as a mechanism to control inflammation in the brain. *Am J Pathol* 1993;143:446-52.
- 5) Ahn M, Kang J, Lee Y, Riu K, Kim Y, Jee Y, et al. Pertussis toxin-induced hyperacute autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats is correlated with increased expression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor alpha. *Neurosci Lett* 2001;308: 41-4.
- 6) Stanislaus R, Gilg AG, Singh AK, Singh I. N-acetyl-L-cysteine ameliorates the inflammatory disease process in experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *J Autoimmun Dis* 2005;2:4.
- 7) Lindquist S. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 1986;55:1151-91.
- 8) Krueger-Naug AM, Hopkins DA, Armstrong JN, Plumier JC, Currie RW. Hyperthermic induction of the 27-kDa heat shock protein (Hsp27) in neuroglia and neurons of the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 2000; 428(3):495-510.
- 9) Marber MS, Mestral R, Chi SH, Sayen MR, Yellon DM, Dillmann WH. Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest* 1995;95:1446-56.
- 10) Landry J, Chretien P, Lambert H, Hickey E, Weber LA. Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. *J Cell Biol* 1989;109: 7-15.
- 11) Currie RW, White FP. Trauma-induced protein in rat tissues: a physiological role for a heat shock protein? *Science* 1981;214:72-3.
- 12) Krueger AM, Armstrong JN, Plumier J-CL, Robertson HA, Currie RW. Cell specific expression of hsp70 in neurons and glia of the rat hippocampus after hyperthermia and kainic acid-induced seizure activity. *Brain Res Mol Brain Res* 1999;71:265-78.
- 13) Barbe MF, Tytell M, Gower DJ, Welch WJ. Hyperthermia protects against light damage in the rat retina. *Science* 1988;241:1817-20.
- 14) Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Kuwabara M, Hata R, Handa N, et al. Hyperthermia-induced neuronal protection against ischemic injury in gerbils. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991;11:449-52.
- 15) Plumier J-CL, David JC, Robertson HA, Currie RW. Cortical application of potassium chloride induces the low-molecular weight heat shock protein (Hsp27) in astrocytes. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997;17:781-90.
- 16) Garrido C, Bruey JM, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Solary E. HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *FASEB J* 1999;13:2061-70.