

RESEARCH ARTICLE

The Effect on Differentiation and Maturation of Oligodendrocyte by Age of Cerebral Palsy Modeling Using Sprague Dawley Rat

Eun-Jung Yoon, Jiwon Jeong, Yeobin Park, Dongsun Park*

Korea National University of Education

Sprague Dawley rat을 이용한 뇌성마비 동물모델에서 수술일령이 희소돌기교세포의 분화와 성숙에 미치는 영향

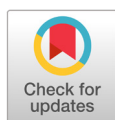
윤은정, 정지원, 박여빈, 박동선*

한국교육대학교

*Corresponding Author: Dongsun Park, dvmdpark@knue.ac.kr

ABSTRACT

Cerebral palsy induces motor, cognitive, attention, and behavioral dysfunctions caused by brain damages. It is caused by damage to oligodendrocyte induced hypoxic ischemia and injection in the perinatal period. Therefore, an animal models that performed hypoxia-ischemia-lipopolysaccharide injection (HIL) at 4-7 days of age (PND) are widely used. However, there is a difference in the brain damage due to exposure time under the hypoxic condition, gender, and ligation surgery techniques. In this paper, the optimal surgical age was found by analyzing behavioral tests, inflammatory reactions, and the differentiation and maturation of oligodendrocytes by performing HIL on rats 4, 5, 6, and 7 days old, respectively. On the 4th, 5th, 6th, and 7th days of birth (PND) of male Sprague Dawley rats, the right common carotid artery was ligated, they were incubated in an environment of 37°C, 92% N₂, and 8% O₂, and then peritoneally injected LPS (1 mg/kg) after removing the ligation. The rota-rod test were performed at PND 10, 20, 30, and 40, and memory tests such as passive avoidance and Morris water maze tests were performed on PND36-40, and then they were euthanized to analyze inflammatory indicators (NF-κB, TNF-α, IL-6, iNOS, and COX2) and indicators of the differentiation and maturation (Olig2, CNPase). In the case of the PND4 group, the limb coordination test were significantly different from that of the normal group, but there was no difference in other analyses. In the case of PND5 group, there were significantly differences in limb coordination tests, memory tests, inflammatory indicators, and differentiation and maturation of oligodendrocyte. In the case of the PND6 group, there was a significantly difference in limb coordination and memory tests, and a significantly increase in inflammatory indicators compared to other groups, but the mortality rate increased and indicators of the differentiation and maturation of oligodendrocyte were increased. In the case of the PND7 group, the limb coordination test showed significantly



OPEN ACCESS

Brain, Digital, & Learning
2023, Vol. 13, No. 3, 309-321.<https://doi.org/10.31216/BDL.20230019>**Received:** July 28, 2023**Revised:** August 21, 2023**Accepted:** August 21, 2023© 2023. Institute of Brain based Education,
Korea National University of Education

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

differences compared to normal group, but there was no difference from the normal group in other analyses. In conclusion, this study suggests that the PND5 group, where abnormal behavioral tests, an increase in appropriate inflammatory indicators, and a decrease in maturation and differentiation-related proteins of oligodendrocyte are comprehensively observed, is most suitable.

Key words: Cerebral palsy, hypoxia-ischemia-lipopolysaccharide injection (HIL), oligodendrocyte, postnatal day (PND), neurobehavioral deficit, animal model

Introduction

뇌성마비는 신생아 발달기에 뇌에 발생하는 심각한 신경질환 중의 하나로, 뇌실주위백색연화증(periventricular lesion, PVL)과 같은 손상과 함께 근육조절과 운동 협응능력, 자세 및 균형의 이상과 결함을 초래하며, 인지, 주의 행동, 사회화에서의 장애 등을 동반한다 (Grether & Nelson, 1997; Hagberg et al., 2002; Kim et al., 2018). 국내 뇌성마비 유병률은 신생아 1000명당 2-3명 정도이며, 산부인과와 신생아 중환자실 치료의 향상에 따라 신생아의 생존율이 증가함에 따라 뇌성마비 유병률 또한 증가추세를 보이고 있어 뇌성마비 기전 및 치료제 연구가 절실한 실정이다(Park et al., 2011; Wilson-Costello et al., 2005).

현재 뇌성마비의 원인은 정확히 밝혀진 바가 없지만, 저산소-허혈성 뇌병증(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)이 유발되면 산소 공급의 부족으로 인해 뇌세포가 손상받거나, 활성산소종을 생성하여 신경세포가 손상 및 사멸되어 뇌실 주변의 백질부위를 손상시키는 것으로 알려져 있어, 출산 중의 질식 등으로 인한 뇌로의 산소 공급의 부족이 뇌성마비의 원인인 것으로 추측되고 있다(Jesberger & Richardson, 1991; Michikawa et al., 1994). 특히 자궁 내 감염은 출산 중 질식에 따른 PVL의 증상을 더욱 악화시키며, 영구적인 허혈이 극복되어 재관류가 일어난다 하여도, 활성산소종이 다량 생성됨으로써 이차적인 손상을 초래하여 병변의 회복을 더욱 어렵게 만든다. 따라서, 자궁내 감염 및 출산 중의 질식에 따른 뇌성마비의 예방과 치료는 뇌성마비 연구의 중요한 주제 중의 하나가 되었다(Archer et al., 1986; Warner et al., 1998).

뇌성마비를 연구하기 위하여 허혈모델, 염증모델, 흥분성 아미노산을 이용한 모델 등 다양한 모델이 이용되어 왔다(Cai et al., 2000; Jelinski et al., 1999; Marret et al., 1995). 허혈 모델은 경동맥을 결찰하여 뇌로 가는 혈액을 감소시켜 허혈을 유발하여 뇌성마비를 유발하는 모델이며(Jelinski et al., 1999), 염증모델은 임신한 모체의 복강에 LPS를 투여하여 신생 랫드에 뇌성마비를 유발하는 모델이다(Cai et al., 2000). 흥분성 아미노산의 경우 신생 랫드의 뇌실로 흥분성 아미노산을 직접 투여하여 신경세포를 파괴하는 모델이다(Marret et al., 1995). 하지만, 최근 뇌성마비가 자궁내 감염 또는 허혈 등이 희소돌기교세포의 성숙과 분화에 영향을 미치게 되고 이로 인해 수초의 발생이 감소되어 유발된다는 이론이 주목받게 되면서 허혈과 뇌염증을 함께 이용하는 모델(hypoxia-ischemia-lipopolysaccharide, HIL)이 자주 이용되고 있다(Kim et al., 2018). 특히, HIL 모델을 이용한 선행연구에서 뇌성마비 유발의 효율성을 밝히기 위해 편측 경동맥결찰모델과 양측 경동맥결찰의 효율을 비교하는 등의 실험을 진행하여 양측 경동맥 결찰에 비해 편측 경동맥결찰모델이 더 적합하다는 것을 밝혀낸 바 있다(Park et al., 2010).

한편, 신생 랫드를 활용한 뇌성마비 연구에서 희소돌기교세포가 중요한 연구주제가 되면서 신생 랫드의 희소돌기교세포의 발달 및 분화과정을 밝히는 연구도 진행되고 있다(El Waly et al., 2014). 특히, 랫드의 일령

에 따라 희소돌기교세포의 발달 및 분화과정을 분석하여, 신생 랫드의 생후(postnatal day, PND) 4-7일 사이가 사람에서는 임신 23-32주 해당하는 시기로 뇌성마비 유발에 민감한 시기로 밝혀져 대부분의 연구에서 HIL 모델 유발시기를 PND4-7일로 권장하고 있다 (Kim et al., 2018; Kinney & Back, 1998; Rice et al., 1981).

하지만 저산소 환경 노출 시간(Rice et al., 1981), 성별(Park et al., 2010), 결찰 수술 조작 기법(Park et al., 2010) 등에 의해 뇌손상 정도에 차이가 존재한다고 밝혀졌으며, 아직까지 PND4-7일 중 어느 시기가 뇌성마비모델로서 사용하기에 가장 적합한 시기인지는 연구된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 PND4-7일의 각 일령에 뇌성마비를 유발하고, PND10, 20, 30, 40일에 행동검사를 실시하고, PND40일에 부검을 실시하여 수술시기에 따른 염증 유발 정도, 희소돌기교세포의 성숙 및 분화과정을 비교하여 분석함으로써 예방 및 치료제 개발에 적합한 뇌성마비 모델을 구축하고자 하였다.

Materials and Methods

Animals

본 실험에서는 9주령의 임신한 암컷 Sprague-Dawley 랫드를 대한바이오링크(Eumseong, Korea)에서 구입하였다. 랫드는 온도 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 조도 $150 \sim 300\text{lux}$, 환기횟수 12회/시간, 조명시간 12시간 (07:00~19:00)으로 설정하여 사육관리 하였다. 태어난 신생 랫드는 일령(PND4, 5, 6 및 7일)에 맞춰 수컷($n=6/\text{군}$)만 이용하여 수술을 진행하였으며 수술 후 이유기까지는 어미와 함께 사육하였고, 이유 후에는 어미와 분리하여 케이지당 3마리씩 사육하였다. 사료는 실험동물용 고형사료를 대한바이오링크(Eumseong, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 사료 및 음수는 자유 섭취시켰다. 본 연구는 한국교원대학교 동물실험 윤리위원회에서 승인받아 진행하였다(KNUE-202302-003-02).

Cerebral Palsy Induction by HIL

PND4, 5, 6, 및 7일 째, diethyl ether를 흡입마취시킨 후 목의 정중선을 수직 절개하여 좌측 총경동맥만을 노출시킨 다음 봉합사(nylon, 9-0)를 활용해 결찰하였다. 피부를 봉합하고, 30분의 회복 시간을 준 후, 37°C , 8% O_2 , 92% N_2 가 유지되는 저산소배양기(H85 hypoxia workstation; Don Whitley Scientific, UK)에 랫드를 120분간 노출시켰다. 저산소 노출 후 랫드의 결찰을 제거하여 재관류시킨 후 LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 1 mg/kg 용량으로 복강 내 주사하였다. 15분의 회복 시간을 준 후, 어미 랫드에게 되돌려 주었다. 실험 계획은 Fig. 1과 같다.

Neurobehavioral Test

Rota-rod Test

사지협응력 능력은 rotarod test 방법(Panlab Technology, Barcelona, Spain)으로 PND10, 20, 30, 40일에 각각 평가하였다. 4-80 rpm까지의 가속이 되는 봉(rotarod) 위에 랫드를 올려두고, 랫드가 막대에서 떨어지는 시간을 측정하였다. 평가시간은 연속 3회 측정을 하여 평균으로 나타내었다.

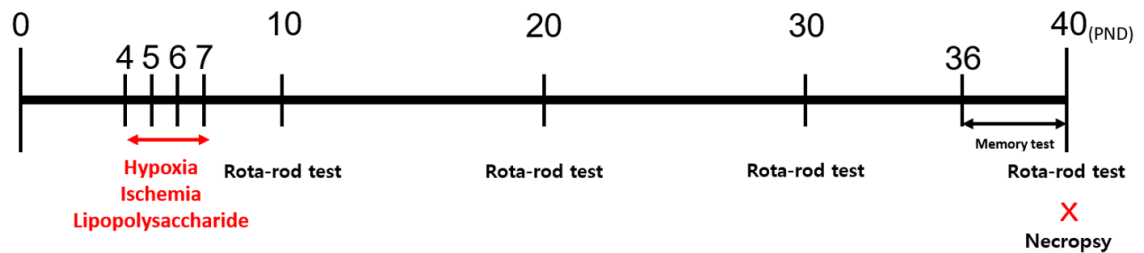


Fig. 1. Experimental schedules. The male pups of post-natal day (PND) 4, 5, 6, and 7 underwent hypoxia-ischemia-lipopolysaccharide injection (HIL). And, rota-rod test was performed at PND10, 20, 30 and 40. The memory tests (passive avoidance test and Morris-water maze test) were performed once a day for PND 36-40. Then the pups were sacrificed for analysis

Passive Avoidance Test

랫드의 working memory ability를 측정하기 위해 shuttle box (width (610 mm) x depth (300 mm) x height (400 mm))를 이용해 수동회피반응(passive avoidance)을 평가하였다. Box는 램프와 감전을 위한 강철 격자바닥이 장착된 밝은 방과 어두운 방으로 나뉜 두 개의 방으로 구성된다. 실험에서는 랫드가 문을 통해 밝은 방에서 어두운 칸으로 들어갔을 때 전기충격(3초, 0.3 mA)을 받았다(Hermans et al., 1992). 대기시간은 조명실의 조명이 켜지고 나서 밝은 방으로 들어가는 시간으로 설정하였으며, 180초가 넘어가면 기억력이 회복되었다고 판단하여 실험을 종료하였다. 수동회피실험은 PND36-40일에 1회/일, 5일간 측정하였다.

Morris Water Maze Test

공간 기억의 평가를 위해 Morris 수중 미로 실험을 진행하였다. 수중 미로 실험은 물이 27 cm의 깊이로 채워진 직경 180 cm의 수조에서 진행하였으며 물의 온도는 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 로 유지되었다. 수조는 가상의 4개의 사분면으로 나누어 한쪽 사분면 중앙에 escape platform을 수면 2 cm 깊이 아래에 위치시켰다. 이후 먹물을 풀어 platform이 보이지 않도록 하였고 Rat는 미로 바깥에 놓인 여러 단서에 근거하여 platform을 찾는 훈련을 받았다. 단서의 위치는 실험 내내 일정하게 유지되었다. 사분면 중 platform이 없는 3개의 사분면 중 한 지점에서 출발하게 하여 platform을 찾기까지 걸린 시간을 측정하였다(Morris, 1984). 수중 미로 실험은 PND36-40일에 1회/일, 5일간 측정하였다.

Real-time PCR Analysis

뇌 조직의 total RNA는 Trizol 시약 (Invitrogen, CA, USA)을 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 추출하였다. Total RNA 1 μg 은 WizScriptTM RT Master (Wizbio, Seongnam, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하기 위한 역전사에 활용되었고, 생성된 cDNA는 PCR을 위한 template로 이용하였다. Real time PCR은 Brilliant III Ultra-Fast SYBR[®] Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였으며, 반응은 60°C , 40 cycle로 AriaMx Real-Time PCR system (Agilent Technologies)에서 수행하였다. 내부 기준 물질로는 GAPDH를 이용하였고, comparative Ct method를 사용하여 2회 반복하여 데이터를 분석하였다(Yon, Kim, & Park, 2018). PCR에 사용된 primer의 sequence는 Table 1에 표기하였다

Table 1. Primer sequences used for PCR analysis in this study

Gene	Primer Sequences		Accession No.
	Forward	Reverse	
NF- κ B	AGAGGCCATTGAAGTGATCCA	CTTGTGGAGGAGGACGAGAGA	NM_001276711
TNF- α	ATCGGTCCCAACAAGGAGGA	TTGCTACGACGTGGGCTAC	NM_012675
IL-6	ACCCCAACTTCCAATGCTCTC	ATGGTCTTGGTCCTTAGCCAC	NM_012589
iNOS	AGGCTGGAAGCCGTAACAAA	ACCACTGAATCCTGCCGATG	NM_012611
COX2	TGATCTACCCTCCCCACGTC	CACTCTGTTGTGCTCCCGAA	NM_017232
GAPDH	GTCGGTGTGAACGGATTGG	CCACTTTGTCACAAGAGAAGGCA	NM_017008

Western Blot Analysis

뇌조직은 proteinase inhibitor (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 및 phosphatase inhibitor (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 함유한 RIPA cell lysis buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 균질화하였다. 단백질을 균질액을 4°C, 15,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 추출하였으며 BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 정량하였다. 단백질은 10% SDS가 함유된 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 6.8)에서 95°C에서 5분간 가열하여 변성시킨 후 SDS-PAGE gel에서 전기 영동 하여 분리시킨 후, 20% methanol, 1% SDS 및 192 mM glycine이 함유된 25 mM Tris buffer를 사용하여 PVDF membrane으로 이동시켰다. TBS-Tween (TBS-T 20mM Tris, 137mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.6) 용액을 이용하여 5% skim milk를 제조하여 1시간 blocking 한 후 Table 2에 있는 항체를 이용하여 4°C에서 overnight하여 반응시켰다. TBS-T로 세척한 후, membrane에 Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit 2차 항체를 이용하여 실온에서 2시간 반응시켰다. Membrane은 ECL solution (Pierce, Rockford, IL, USA)을 이용하여 현상하였다. Actin을 내부 기준 물질로 하여 ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, USA)를 이용하여 정량하였다.

Table 2. List of antibodies used in the current study

Epitope	Company	Catalog Number	Dilution	2° Ab (IgG)
Olig2	Abcam	ab109186	1:2000	Rb
CNPase	Abcam	ab6319	1:1000	Ms
MBP	Abcam	ab218011	1:1000	Rb
Actin	Cell Signal	#5125	1:1000	Rb

Luxol fast blue (LFB) Stain

수초의 발현을 분석하기 위해 수초 특수염색방법인 LFB 염색을 실시하였다. 랫드를 10% neutral buffer formalin (NBF)으로 심장을 이용하여 관류고정하였다. 이후 신속하게 뇌를 적출하여 10% NBF에 48시간동안 후고정한 뒤, 30% sucrose 용액에 72시간 동안 고정하였다. 이후 조직을 10 μ M 두께로 잘라 동결절편 슬라이드를 제작하여 염색을 실시하였다. 동결절편을 luxol fast blue 용액에 넣어 56°C에서 overnight하였다. 이후 95% 에틸알코올로 수세하여 과도한 얼룩을 제거하고, lithium carbonate 용액에 슬라이드를 30초간 담근 후 70% 에틸알코올로 세척하였다. 이후 증류수로 세척한 후, cresyl violet 용액으로 30초 동안 염색한 후 증류수를 이용하여 세척하였다. 이후 에틸 알코올을 이용하여 탈수과정을 거치고 xylene을 이용하여 알코올 성분을 제거한 후 봉입하여 광학현미경을 이용하여 조직을 관찰하였다.

Statistical Analysis

그룹 간의 통계 비교는 정규성 및 분산의 동질성을 확인하고, 일원 분산분석을 수행한 후 Tukey의 다중 비교 테스트를 통해 사후 검증하였다. 윈도우용 소프트웨어인 Statistical Package for Social Sciences version 12.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 이용해 모든 분석을 수행하였다. 데이터는 평균의 평균 $\pm$ 표준 편차로 표시하였고, $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의미한 것으로 간주하였다.

Results

Neurobehavioral Deficits by Age of HIL

Rota-rod Test

PND4, 5, 6 및 7일에 각각 HIL 수술을 실시하고, 행동검사에 미치는 영향을 알아보기 위해 뇌성마비의 대표적인 행동검사 중의 하나인 rota-rod test를 진행하였다. Rota-rod test는 균형감각 및 사지협응성을 측정하는 대표적인 검사로 PND10, 20, 30 및 40일에 각각 측정하였다. Fig. 2에서 보이는 바와 같이 HIL을 실시하여 뇌성마비를 유발하였을 때, 회전봉 위에 있는 시간이 감소하는 경향을 보였다. 특히 PND10에는 정상동물과 비교하였을 때 PND5에 수술한 그룹에서만 유의미한 감소를 보여주었지만, PND20, 30 및 40에는 정도의 차이는 있었지만 모두 유의미한 감소를 보여주는 것이 확인되었다.

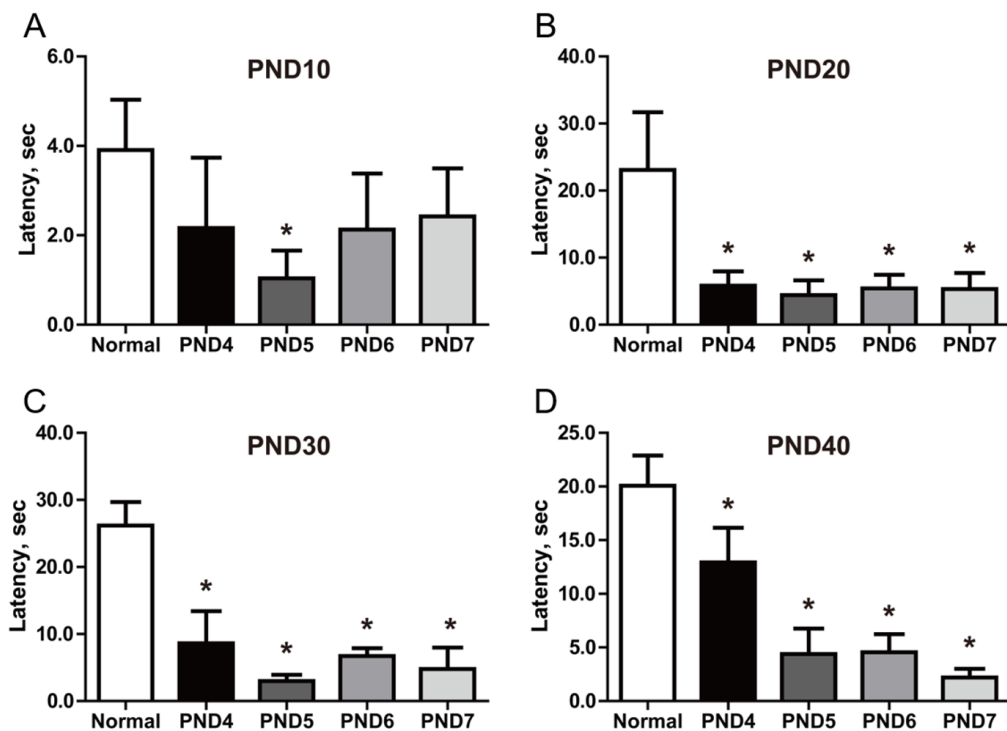


Fig. 2. Latency time (sec) on rota-rod test of rats by age of HIL. The rota-rod test performed at PND10 (A), 20 (B), 30 (C) and 40 (D). Rats (N=6/group) were subjected to hypoxia-ischemia-lipopolysaccharide injection (HIL) at PND4, 5, 6, and 7. Data are presented as mean $\pm$ SD. *Significantly different from normal control ($p < 0.05$)

Passive Avoidance Test

해마의 조건화 된 기억과 변연계와 연관 있는 기억력을 측정하는 방법으로 알려진 수동회피실험에서 정상군은 어두운 방의 전기 충격을 기억해 훈련이 진행될수록 점차 밝은 방에 머무는 시간이 길어졌으며, 4회차에는 기억력이 완전히 생성되어 어두운 방으로 넘어가지 않았다(Fig. 3A). PND4일과 7일에 뇌성마비를 유도한 동물에서는 비록 기억력이 정상군 만큼 형성되지는 않았지만, 유의미한 차이를 보여주지 못하였다. PND5일과 6일에 뇌성마비를 유도한 동물에서는 어두운 방에 머무르는 시간이 짧게 관찰되었으며, 정상군과 비교하였을 때 유의미한 차이를 보여주었다. 비록 PND6에서는 5회차에는 유의미한 결과를 보여주지 못했지만 전체적으로 기억력이 형성되지 않는 모습을 나타냈으며, PND5에서는 전 회차에 걸쳐 유의미한 차이가 관찰되었다.

Morris Water Maze Test

수동회피반응 검사 실시 후, 공간지각 학습능력을 측정할 수 있는 수중 미로 실험을 진행하였다(Fig. 3B). 결과에서 정상군은 플랫폼을 찾는데 걸리는 평균 시간이 회차가 반복될수록 현저하게 감소하여 장기 기억이 형성되었다고 할 수 있었다. 수동회피반응검사와 마찬가지로 PND4일과 7일에 뇌성마비를 유도한 동물에서는 회차가 반복될수록 플랫폼을 찾는 시간이 감소하여 정상군과 유의미한 차이를 보이지 못했지만, PND5일과 6일에서는 회차가 반복되어도 시간이 감소하지 않고 정상군과 유의미한 차이가 관찰되었다.

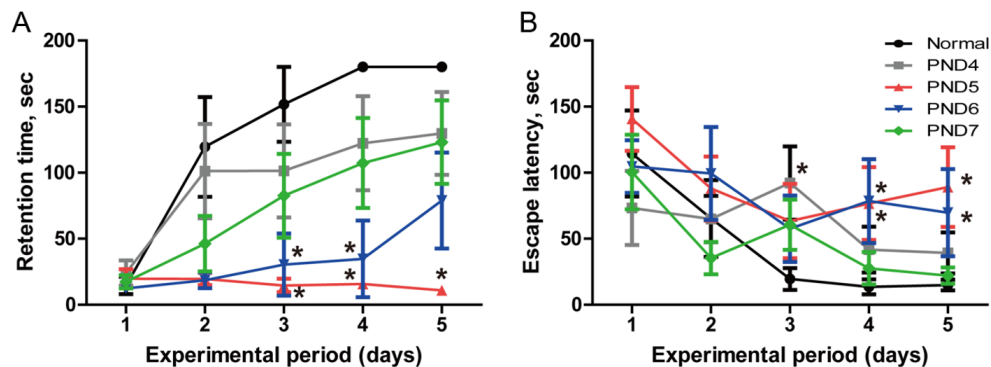


Fig. 3. Cognitive function of rats by age of HIL. Passive avoidance test (A) and Morris water maze test (B) were measured once a day for 5 days. The endpoint was set 180s in passive avoidance test and Morris water maze test. ●; Normal, ■; PND4, ▲; PND5, ▼; PND6, ◆; PND7. Data are presented as mean $\pm$ SD. *Significantly different from normal control ($p < 0.05$)

mRNA Expression of Inflammatory Mediators by Age of HIL

수술일령에 따른 뇌조직 내의 염증 반응 정도를 비교하기 위해, 뇌조직으로부터 mRNA를 추출하여 cDNA를 합성한 후 real-time PCR을 실시하여 염증반응 발생에 중요한 신호전달물질인 nuclear factor kappa B (NF- κ B), 염증 매개성 사이토카인인 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 및 interLeukin-6 (IL-6), 그리고, 염증매개 효소인 inducible nitric oxide synthase (iNOS), 및 cyclooxygenase2 (COX2)의 발현량을 확인하였다(Fig. 4). PND4 군에서는 정상군과 비교하였을 때 IL-6, COX2에서 유의미한 차이가 관찰되었다. PND7 군에서는 정상군과 비교하였을 때 증가한 경향을 보이기는 했지만, 유의미한 차이가 관찰되지는 않았다. PND6 군에서는 모든 지표 상

에서 정상군 대비 10배 이상 발현량이 증가하였고, PND5 군에서도 정상군 대 3-5배 정도 발현량이 증가한 것을 관찰할 수 있었다.

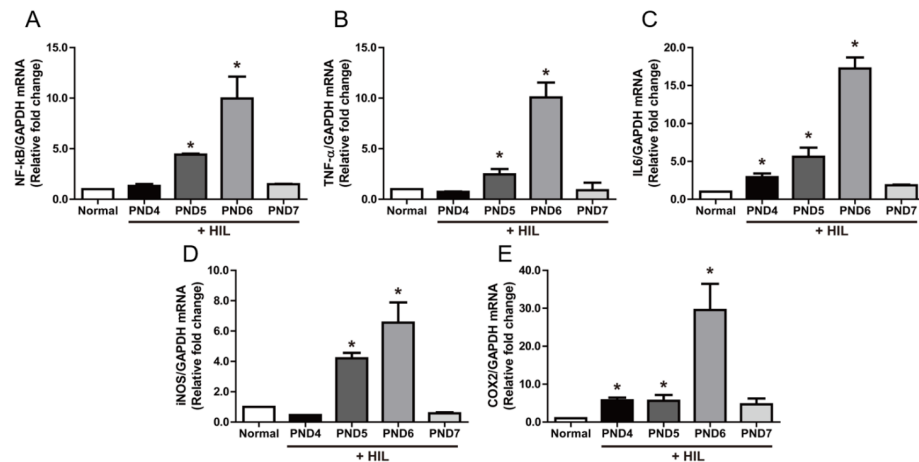


Fig. 4. mRNA expression of inflammatory mediators by age of HIL. Real-time PCR performed for checking the mRNA expression of nuclear factor kappa B (NF-κB, A), tumor necrosis factor-α (TNF-α, B), interLeukin-6 (IL-6, C), inducible nitric oxide synthase (iNOS, D), and cyclooxygenase2 (COX2, E), normalized to GAPDH. *Significantly different from normal control (p<0.05)

Protein Expression Related with Differentiation and Maturation of Oligodendrocyte by Age of HIL

수술일령이 희소돌기교세포의 분화와 성숙에 미치는 영향을 알아보기 위해 CNPase, MBP 및 Olig2의 단백질 발현을 western blot을 통해 비교하였다 (Fig. 5). PND4군에서는 정상군과 비교했을 때 3가지 지표 모두가 발현이 증가하였다. PND5군에서는 PND4군과는 반대로 정상군과 비교했을 때 3가지 지표 모두가 유의미하게 감소하였다. PND6군에서는 CNPase의 발현이 유의미한 차이를 보이며 감소하였지만, MBP 및 olig2의 발현에서는 오히려 증가하는 경향을 보여주었다. PND7군에서도 역시 CNPase의 발현에서만 유의미한 차이를 보였다.

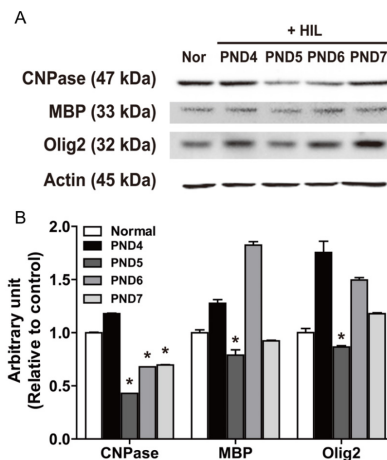


Fig. 5. Protein expression of related with differentiation and maturation of oligodendrocyte by age of HIL. (A) Representative band for CNPase, MBP and Olig2 in brain tissue. (B) Band densities normalized to actin. *Significantly different from normal control (p<0.05)

마지막으로, PND5 군에서 얻은 뇌조직을 이용하여 수초의 발현량을 확인하기 위해 LFB 염색을 실시하고 정상군과 비교하였다(Fig. 6). 정상군과 비교하였을 때, 해마주위의 LFB 양성 신호가 감소하였으며, 특히 뇌량(corpus callosum)의 염색성이 감소하였으며, 뇌실주변부(periventricular region)는 그 두께가 감소된 것이 관찰되었다.

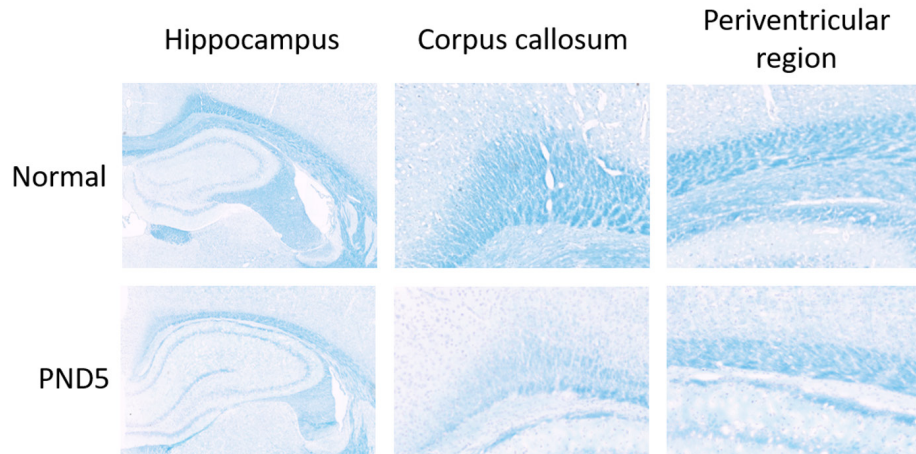


Fig. 6. Representative photomicrograph of luxol fast blue staining in the hippocampus, corpus callosum and periventricular region. The LFB-positive signal compared the normal group and the PND5 group.

Discussion

본 실험은 HIL 수술을 통해 유도한 뇌성마비 동물 모델에서 효과적인 수술일령을 설정하기 위해 PND4, 5, 6, 및 7일에 HIL 수술을 실시하고, PND10, 20, 30 및 40일에 사지협응성 검사, 기억 및 학습능력 평가, 염증지표 발현, OL 분화 및 성숙 지표의 발현을 비교하는 실험이었다.

뇌성마비는 조산, 저산소성 허혈 및 주산기 감염에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다(Delivoria-Papadopoulos & Mishra, 1998; Jesberger & Richardson, 1991; Mosmann, 1983; Palmer et al., 1990). 특히, 미숙아의 경우 대뇌 백질의 원위부 동맥이 완전히 발달하지 않아 상대적으로 미완성된 혈관으로 인해 대뇌 백질로의 혈액의 흐름이 감소하여 허혈이 발생한다(Volpe et al., 2011). 또한, 감염이나 염증의 요인은 저산소성 허혈을 악화시키고, 뇌의 미세아교세포를 활성화시켜 희소돌기교세포의 전구세포를 손상시키는 원인으로 작용한다(Haynes et al., 2003). 뿐만 아니라 뇌성마비가 발생하는 시기에는 희소돌기교세포의 전구세포가 취약하여(Dammann & Leviton, 1997; Volpe, 1998), 소교세포의 활성화 및 흥분성 독성과 자유 라디칼의 생성등으로 인해 더 많은 희소돌기교세포의 손상을 유발한다(Back et al., 1998; Oka et al., 1993; Yonezawa et al., 1996). 이러한 희소돌기교세포의 손상은 결국 수초 형성의 이상을 초래하고 이로 인해 신경전달의 불균형으로 인한 신경 발달 장애, 정신지체 장애 등과 같은 뇌성마비의 대표적인 임상증상이 나타나게 된다(Kim et al., 2018; Park et al., 2010). 결국, 효과적인 뇌성마비 예방 및 치료제 개발을 위해서는 사람의 병태생리학 기전과 비슷한 기전을 가진 동물모델이 필요하며, 이를 활용한 분석지표가 필요하다.

이에 따라 본 논문에서는 사람과 병태생리학적인 기전이 가장 유사한 HIL 모델을 이용하여, 랫드를 저산소성 허혈 및 감염 및 염증의 상태로 만들어 뇌성마비를 유발하였다. 나아가, 사람과 랫드의 중추신경계 발달을 비교하여, 사람의 희소돌기교세포의 발달시기인 임신 24-32주차와 비슷한 시기인 랫드의 PND4-7일령을 대상으로 실험을 진행하였다(Kim et al., 2018; Kinney & Back, 1998; Rice et al., 1981). 또한, 실제로 많은

논문에서 뇌성마비 유발시기를 PND4-7일 사이를 추천하지만, 저산소 환경 노출 시간(Rice et al., 1981), 성별(Park et al., 2010), 결찰 수술 조작 기법(Park et al., 2010) 등에 의해 뇌손상 정도에 차이가 존재하기 때문에, 수술일령에 따른 차이가 발생하는 지를 분석하고 효율적인 유발 시기를 추천하기 위해 본 실험을 진행하였다. 또한, 뇌성마비의 분석지표로 수초가 손상되어 발생하는 대표적인 임상 증상 중의 하나인 사지협응성 검사 및 기억력 검사를 이용하였으며, 분자생물학적 지표로 희소돌기교세포의 손상을 유도하는 염증 지표 및 희소돌기교세포의 성숙과 분화지표를 이용하였다(Kim et al., 2018, Park et al., 2010).

PND4 군의 경우, 뇌성마비의 주요 행동 증상증의 하나인 사지 협응성 평가 결과 정상 랫드와 비교하였을 때 유의미하게 감소한 것을 확인할 수 있지만, 그 외의 행동 검사인 기억력 검사에서는 정상군과는 큰 차이가 발견되지 않았다. 뿐만 아니라 염증지표 역시 크게 차이가 나지 않은 것을 관찰할 수 있다. 반면 희소돌기교세포의 성숙 및 분화지표에서는 정상군에 비해 발현량이 많이 관찰되는 것을 확인할 수 있는 바, 이는 발생초기 단계인 PND4일 차에 저산소 자극 및 염증으로 발생한 손상에 대해 희소돌기교세포 전구세포와 관여하는 재수초화가 활발히 일어났기 때문으로 생각되어진다(Kessaris et al., 2006; Vigano et al., 2016). 재수초화에 주로 기여하는 것은 병변 부위의 국소 희소돌기교세포 전구세포로, 이 세포는 빠르게 재수초성 희소돌기교세포로 분화하는 것으로 생각되며, 뇌실하영역의 신경줄기세포는 일정 시간 후 이 영역의 희소돌기교세포 전구세포를 증가시켜 뇌성마비유발로 인한 탈수초화 후 고갈된 희소돌기교세포를 다시 채우는 것으로 여겨진다(Serwanski et al., 2018). 실제로 PND3 일차에 수술한 동물모델에서는 손상부위가 관찰되지 않았다는 보고도 있다(Choi et al., 2011).

PND5 군의 경우, 정상 랫드에 비해 사지협응성 검사 및 기억력 검사에서 모두 유의미한 감소를 관찰할 수 있다. 염증지표에서도 모든 항목에서 유의미하게 염증이 증가한 것을 확인할 수 있으며, 희소돌기교세포의 성숙 및 분화지표에서도 정상군에 비해 발현량이 현저하게 감소한 것을 관찰할 수 있었다. 이는 이 시기에 실시한 HIL 수술로 인해 극적인 희소돌기교세포 전구세포의 손상을 유발하였으며, 이로 인한 탈수초화가 진행되어 뇌성마비가 유발된 것으로 생각할 수 있다.

PND6 군의 경우, PND5 군과 비슷하게 행동검사에서 모두 유의미한 차이를 보였다. 특히, 염증지표에서는 다른 군과 비교하여도 모든 항목에서 현저히 증가한 것을 확인할 수 있다. 희소돌기교세포의 성숙 및 분화지표에서는 CNPase의 발현은 감소하였지만, olig2 및 MBP 단백질의 발현이 증가한 것을 확인할 수 있다. 이는 막대한 염증성 손상으로 인해 희소돌기교세포 및 줄기세포가 손상되고 이를 회복시키기 위한 보상성 반응이 활발히 진행되어 olig2 및 MBP 단백질의 발현이 증가한 것으로 보인다.

PND7 군의 경우, 사지협응성 검사에서 정상군과 비교했을 때는 유의미한 감소를 보였지만, 기억력 검사에서는 정상군과 유의미한 차이를 보이지 않았다. 특히, 다른 군과 비교하였을 때 염증 지표의 유의미한 증가도 관찰되지 않았으며, 희소돌기교세포의 분화 및 성숙 지표도 큰 차이가 없었는 바, 이 시기는 미성숙 희소돌기교세포로 저산소성 허혈과 염증 반응에 대한 저항성을 가지고 있기 때문에 손상이 미미했던 것으로 여겨진다(Back et al., 1998).

이상의 결과를 종합해보면, PND4, 5, 6 및 7일에 HIL 수술을 실시하여 뇌성마비를 유도하면 시기에 따른 큰 차이가 있는 것을 확인할 수 있다. PND4군의 경우 보상성 반응으로 인해 뇌성마비 평가 지표가 올바르게 판단되지 않아 좋은 선택이 될 수 없으며 PND7 군의 경우에는 희소돌기교세포의 저항성이 증가하여 뇌성마비 유도율이 감소할 수 있는 위험성을 가지고 있다. 또한 PND6 군의 경우, 심각한 염증성 손상으로 다수의 동물

이 사망하는 경우도 관찰할 수 있었기 때문에 좋은 선택이 될 수 없다. 결론적으로, 본 실험에서는 행동검사의 이상, 적절한 염증 지표의 증가 및 희소돌기교세포의 성숙 및 분화 관련 단백질의 감소가 종합적으로 관찰되지는 PND5 군이 가장 적합함을 제안하는 바이다.

Conflicts of Interest

The authors declared no conflicts of interest.

References

- Archer, L. N., Levene, M. I., & Evans, D. H. (1986). Cerebral artery Doppler ultrasonography for prediction of outcome after perinatal asphyxia. *Lancet*, 2, 1116-1118. doi:10.1016/s0140-6736(86)90528-3
- Back, S. A., Gan, X., Li, Y., Rosenberg, P. A., & Volpe, J. J. (1998). Maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress-induced death caused by glutathione depletion. *Journal of Neuroscience*, 18, 6241-6253. doi:10.1523/JNEUROSCI.18-16-06241.1998
- Cai, Z., Pan, Z. L., Pang, Y., Evans, O. B., & Rhodes, P. G. (2000). Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. *Pediatric Research*, 47, 64-72. doi:10.1203/00006450-200001000-00013
- Choi, E.-K., Park, D., Kim, T. K., Lee, S. H., Bae, D.-K., Yang, G., Yang, Y.-H., Kyung, J., Kim, D., Lee, W. R., Suh, J.-G., Jeong, E.-S., Kim, S. U., Kim, Y.-B. (2011). Animal models of periventricular leukomalacia. *Laboratory Animal Research*, 27, 77-84.
- Dammann, O., & Leviton, A. (1997). Maternal intrauterine infection, cytokines, and brain damage in the preterm newborn. *Pediatric Research*, 42, 1-8. doi:10.1203/00006450-199707000-00001
- Delivoria-Papadopoulos, M., & Mishra, O. P. (1998). Mechanisms of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategies for prevention. *The Journal of Pediatrics*, 132, 30-34. doi:10.1016/s0022-3476(98)70525-6
- El Waly, B., Macchi, M., Cayre, M., & Durbec, P. (2014). Oligodendrogenesis in the normal and pathological central nervous system. *Frontiers in Neuroscience*, 8, 145. doi:10.3389/fnins.2014.00145
- Grether, J. K., & Nelson, K. B. (1997). Maternal infection and cerebral palsy in infants of normal birth weight. *Journal of the American Medical Association*, 278, 207-211. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9218666>
- Hagberg, H., Peebles, D., & Mallard, C. (2002). Models of white matter injury: comparison of infectious, hypoxic-ischemic, and excitotoxic insults. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 8, 30-38. doi:10.1002/mrdd.10007
- Haynes, R. L., Folkner, R. D., Keefe, R. J., Sung, I., Swzeda, L. I., Rosenberg, P. A., . . . Kinney, H. C. (2003). Nitrosative and oxidative injury to premyelinating oligodendrocytes in periventricular leukomalacia. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 62, 441-450. doi:10.1093/jnen/62.5.441
- Hermans, R. H., Hunter, D. E., McGivern, R. F., Cain, C. D., & Longo, L. D. (1992). Behavioral sequelae in young rats of acute intermittent antenatal hypoxia. *Neurotoxicology and Teratology*, 14, 119-129. doi:10.1016/0892-0362(92)90060-n
- Jelinski, S. E., Yager, J. Y., & Juurlink, B. H. (1999). Preferential injury of oligodendroblasts by a short hypoxic-ischemic insult. *Brain Research*, 815, 150-153. doi:10.1016/s0006-8993(98)01053-1
- Jesberger, J. A., & Richardson, J. S. (1991). Oxygen free radicals and brain dysfunction. *International Journal of Neuroscience*, 57, 1-17. doi:10.3109/00207459109150342

- Kessarlis, N., Fogarty, M., Iannarelli, P., Grist, M., Wegner, M., & Richardson, W. D. (2006). Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nature Neuroscience*, 9, 173-179. doi:10.1038/nn1620
- Kim, T. K., Park, D., Ban, Y. H., Cha, Y., An, E. S., Choi, J., . . . Kim, Y. B. (2018). Improvement by Human Oligodendrocyte Progenitor Cells of Neurobehavioral Disorders in an Experimental Model of Neonatal Periventricular Leukomalacia. *Cell Transplantation*, 27, 1168-1177. doi:10.1177/0963689718781330
- Kinney, H. C., & Back, S. A. (1998). Human oligodendroglial development: relationship to periventricular leukomalacia. *Seminars in Pediatric Neurology*, 5, 180-189. doi:10.1016/s1071-9091(98)80033-8
- Marret, S., Mukendi, R., Gadisseux, J. F., Gressens, P., & Evrard, P. (1995). Effect of ibotenate on brain development: an excitotoxic mouse model of microgyria and posthypoxic-like lesions. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 54, 358-370. doi:10.1097/00005072-199505000-00009
- Michikawa, M., Lim, K. T., McLarnon, J. G., & Kim, S. U. (1994). Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *Journal of Neuroscience Research*, 37, 62-70. doi:10.1002/jnr.490370109
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Oka, A., Belliveau, M. J., Rosenberg, P. A., & Volpe, J. J. (1993). Vulnerability of oligodendroglia to glutamate: pharmacology, mechanisms, and prevention. *Journal of Neuroscience*, 13, 1441-1453. doi:10.1523/JNEUROSCI.13-04-01441.1993
- Palmer, C., Vannucci, R. C., & Towfighi, J. (1990). Reduction of perinatal hypoxic-ischemic brain damage with allopurinol. *Pediatric Research*, 27(4 Pt 1), 332-336. doi:10.1203/00006450-199004000-00003
- Park, D., Kim, T. K., Choi, Y. J., Lee, S. H., Kang, H., Yang, Y.-H., . . . Kim, Y.-B. (2010). Experimental models of cerebral palsy in infant rats. *Laboratory Animal Research*, 26, 345-351.
- Park, M. S., Kim, S. J., Chung, C. Y., Kwon, D. G., Choi, I. H., & Lee, K. M. (2011). Prevalence and lifetime healthcare cost of cerebral palsy in South Korea. *Health Policy*, 100, 234-238. doi:10.1016/j.healthpol.2010.09.010
- Rice, J. E., 3rd, Vannucci, R. C., & Brierley, J. B. (1981). The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Annals of Neurology*, 9, 131-141. doi:10.1002/ana.410090206
- Serwanski, D. R., Rasmussen, A. L., Brunquell, C. B., Perkins, S. S., & Nishiyama, A. (2018). Sequential Contribution of Parenchymal and Neural Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Precursor Cells toward Remyelination. *Neuroglia*, 1, 91-105. doi:10.3390/neuroglia1010008
- Vigano, F., Schneider, S., Cimino, M., Bonfanti, E., Gelosa, P., Sironi, L., . . . Dimou, L. (2016). GPR17 expressing NG2-Glia: Oligodendrocyte progenitors serving as a reserve pool after injury. *Glia*, 64, 287-299. doi:10.1002/glia.22929
- Volpe, J. J. (1998). Brain injury in the premature infant: overview of clinical aspects, neuropathology, and pathogenesis. *Seminars in Pediatric Neurology*, 5, 135-151. doi:10.1016/s1071-9091(98)80030-2
- Volpe, J. J., Kinney, H. C., Jensen, F. E., & Rosenberg, P. A. (2011). The developing oligodendrocyte: key cellular target in brain injury in the premature infant. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 29, 423-440. doi:10.1016/j.ijdevneu.2011.02.012
- Warner, B. B., Stuart, L. A., Papes, R. A., & Wispe, J. R. (1998). Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice. *American Journal of Physiology*, 275, 110-117. doi:10.1152/ajplung.1998.275.1.L110
- Wilson-Costello, D., Friedman, H., Minich, N., Fanaroff, A. A., & Hack, M. (2005). Improved survival rates with increased neurodevelopmental disability for extremely low birth weight infants in the 1990s. *Pediatrics*, 115, 997-1003. doi:10.1542/peds.2004-0221

- Yon, J.-M., Kim, Y.-B., & Park, D. (2018). The ethanol fraction of white rose petal extract abrogates excitotoxicity-induced neuronal damage in vivo and in vitro through inhibition of oxidative stress and proinflammation. *Nutrients*, 10, 1375. doi:10.3390/nu10101375
- Yonezawa, M., Back, S. A., Gan, X., Rosenberg, P. A., & Volpe, J. J. (1996). Cystine deprivation induces oligodendroglial death: rescue by free radical scavengers and by a diffusible glial factor. *Journal of Neurochemistry*, 67, 566-573. doi:10.1046/j.1471-4159.1996.67020566.x

Authors Information

Yoon, Eun-Jung : Korea National Univeristy of Education, Post-doc, First Author

Jeong, Jiwon : Korea National Univeristy of Education, Graduate student, Co-author

Park, Yeobin : Korea National Univeristy of Education, Graduate student, Co-author

Park, Dongsun : Korea National Univeristy of Education, Professor, Corresponding Author