

## 랫드 궁둥신경에서 155 kd Neurofascin의 발현개시에 대한 면역세포화학적인 연구

원희영<sup>1</sup> · 조익현<sup>2</sup> · 이종환<sup>1</sup> · 남상섭<sup>1</sup> · 최농훈<sup>1</sup> · 박재형<sup>3</sup> · 장병준<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>건국대학교 수의과대학 및 수의과학연구소, <sup>2</sup>경희대학교 한의과대학, <sup>3</sup>대원국제중학교  
(접수: 2012년 8월 13일, 수정: 2012년 9월 21일, 게재승인: 2012년 9월 25일)

### An immunohistochemical study on the initial development of 155 kd neurofascin in rat sciatic nerve

Hee-Young Won<sup>1</sup>, Ik-Hyun Cho<sup>2</sup>, Jong-Hwan Lee<sup>1</sup>, Sang-Soep Nahm<sup>1</sup>, Nong-Hoon Choe<sup>1</sup>,  
Jae-Hyung Park<sup>3</sup>, Byung-Joon Chang<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine and Veterinary Research Institute, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

<sup>2</sup>School of Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University, Seoul 130-701

<sup>3</sup>Daewon International Middle School, Seoul 143-907, Korea

(Received: August 13, 2012; Revised: September 21, 2012; Accepted: September 25, 2012)

**Abstract :** Neurofascin, one of the members of L1CAM, has been known to have some important roles during the development of nerve fibers. In order to investigate the role of neurofascin associated with the development of nerve fibers in the rat sciatic nerve, the initial development of NF155 in the paranode was studied with immuno-fluorescence and immuno-electron microscopy. The result of the present study showed NF155 was not detected in the fetal sciatic nerve and began to reveal at the postnatal day 0 (P0) and dramatically increased by time lapse until postnatal day 7 (P7). NF155 was prominently localized in the axolemma of paranode and not detected in the central region of node of Ranvier. According to the present study, NF155 is likely to have some relationships with the formation of paranode and myelin sheath.

**Keywords :** immunocytochemistry, NF155, paranode, sciatic nerve

## 서 론

Neurofascin(NF)은 면역글로블린 superfamily에서 L1 subgroup의 하나로 축삭의 성장, 다발형성 및 말이집 형성의 초기 단계에서 말이집마디(node of Ranvier)의 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [1, 14, 15, 18].

NF의 분자적 구조는 6개의 면역글로블린 domain(Ig)과 반복되는 fibronectin typeIII(FnIII), 하나의 막관통 부위 및 세포질 domain 등으로 구성되어 있는데 단백질 구조의 차이에 따라 두 가지의 아형(subtype)이 주로 연구대상이 되어 왔다. 그 중 186 kD neurofascin(NF186)은 말이집마디와 축삭시작 분절(initial segment)에서 그 발현이 보고되어 있고 [8], 155 kD neurofascin(NF155)은 말이집섬유의 결마디(paranode)와 말이집틈새(myelin incisure, Schmidt-Lanterman cleft) [3-5, 8], 그리고 민말이집섬유의 축삭막에 분포되어 있음이 보고되었다 [8]. NF의 세포질영역은 세포내에 ankyrin과 결합하는 부위를 가지고 있어서 막관련 단백질의 안정화에도 관여

하고 있는 것으로 알려져 있다 [7, 9, 10].

신경발생 및 재생의 과정에서 특이적으로 분포하여 그 기능이 매우 흥미로운 NF의 역할을 규명하기 위한 연구의 일환으로 본 연구에서는 NF155 및 NF186을 함께 인식하는 항체를 이용하여 말이집섬유의 결마디에 분포하는 것으로 보고되어 있는 [3, 4, 8] NF155가 결마디에서 최초로 발현되는 시기를 알아보아 말이집의 형성과 관련된 NF의 역할을 알아볼 목적으로 본 실험을 기획하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

궁둥신경의 결마디에서 NF의 발현 개시에 대해 알아보기 위해 출생 당일, 생후 1일, 2일, 3일, 7일령의 Sprague-Dawley 랫드 각각 5마리씩 총 25마리의 새끼 랫드를 암수 구분없이 사용하였으며, 또한 실험환경에 적응하여 임신한 한 마리의 어미를 실험에 사용하였다. 어미에서 임신 일령을

\*Corresponding author

Tel: +82-2-450-3711, Fax: +82-2-450-3037

E-mail: bjchang@konkuk.ac.kr

체크하여 임신 20일령에 이르렀을 때 어미를 마취(ketamine 50 mg/kg, xylazine 1 mg/kg B.W.)하여 개복한 후 5마리의 태아를 꺼내 실험에 사용하였다. 그 밖의 동물은 출생 직후부터 어미와 같은 케이지에서 함께 유지하다가 실험에 사용할 일령에 이르르면 어미로부터 분리시켜서 사용하였다. 동물 실험의 모든 과정은 건국대학교 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committees)의 가이드 라인을 따라 수행하였고 실험기간동안 사료와 음료수는 충분히 공급하였다.

### 면역형광염색

새끼 랫드는 고통을 최소화하기 위해 수술가위로 신속하게 단두하여 즉시 입체현미경 아래에서 공동신경을 적출하고 0.1 M PBS에 희석된 10% formalin에 3시간 고정하였다. 고정이 끝난 조직은 PBS에 15분씩 3회 수세한 후 5%, 10%, 15% sucrose 용액에 각각 처리한 후 OCT compound를 사용하여 포매하였다. 동결절편기로 10  $\mu$ m 절편을 작성하였으며, 얻은 절편은 gelatin 코팅된 슬라이드에 올려 놓고 실온에서 2시간 건조 후 면역염색에 사용하였다.

신경절편을 PBS에 짧게 수세하여 OCT compound를 제거한 다음 10% goat serum in 0.2% gelatin, 0.3% Triton X-100 in PBS(buffer A)에 1시간 block한 후 4% goat serum in buffer A에 1:4,000으로 희석된 goat anti-rabbit neurofascin(155 kd and 186 kd; Dr. Peter J. Brophy, University of Edinburgh, UK)에 overnight하여 incubation한 후 buffer A에 20분씩 3회 수세하였다. 4% goat-serum in Buffer A에 1:200으로 희석된 goat anti-rabbit FITC (Cappel)에 실온에서 3시간 incubation한 다음 PBS에 5분씩 4회 수세하였다. PBS를 제거하고 적절하게 말린 슬라이드를 Vectashield를 점적하여 coverslip을 씌우고 형광현미경 (BX51; Olympus, USA)으로 관찰하였다.

### 면역전자현미경염색

새끼 랫드를 단두하여 희생시킨 후 넙다리 상부에서 각각의 공동신경을 절취하여 동일한 고정액에 3시간 침적 고정한 후 0.1 M phosphate buffer에 10분씩 3회 수세한 다음 30%, 50%, 70%, 90%, 100% ethanol에 각각 2분씩 짧게 탈수하였다. 50% LR gold monomer와 50% ethanol 혼합액에서 30분, 70% LR gold monomer와 30% ethanol 혼합액에서 1시간, 100% LR gold monomer에서 1시간 침투 과정을 거친 후, -25°C에서 자외선등(360 nm의 파장) 아래서 LR gold resin(Agar Scientific, UK)으로 24시간 포매하였다. Ultramicrotome(Ultracut E; LKB, Germany)으로 1  $\mu$ m 절편을 작성한 후 1% toluidine blue에 염색하여 광학현미경으로 관찰한 다음, 전자현미경으로 관찰할 부위를 선정한 후, 나머지 부분은 마름질한 다음, 60~70 nm의 두께로 초박절편을 얻었다. Formvar 코팅된 nickel grid에 초박절편을 올려놓은 다음 건조시킨 후 면역염색을 시행하였다. 초박절편을 PBS-Milk-Tween(0.1% PBS, 0.2% milk, 0.1%

Tween 20)에 30분간 배경염색을 차단한 후, 1:200 goat anti-rabbit neurofascin에 4°C에서 12시간 반응시켰다.

PBS-BSA-Tween(0.1M PBS, 0.2% BSA, 0.1% Tween 20)에 5회 수세한 후, 절편을 15nm gold particles이 부착된 goat anti-rabbit IgG(British Biocell International, UK)를 1:50으로 희석해서 실온에서 2시간 반응시켰다. 절편을 PB-Tween(0.1M phosphate buffer, 0.1% Tween 20)에 5회 수세한 후, 3차 증류수로 3회 수세한 다음, 2.5% glutaraldehyde에 15분간 고정한 후, uranyl acetate와 lead citrate에 염색한 후 60 kV 가속전압 아래 JEOL 1200 EXII TEM (JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

## 결 과

### 면역형광염색

태생 20일령 랫드 태아의 공동신경에서 면역형광염색을 실시한 결과 신경섬유의 어떤 부위에서도 NF의 면역반응이 나타나지 않았다(Fig. 1A). 따라서, 출생 전에는 아직 공동신경에서 NF의 발현이 나타나지 않음을 확인하였다.

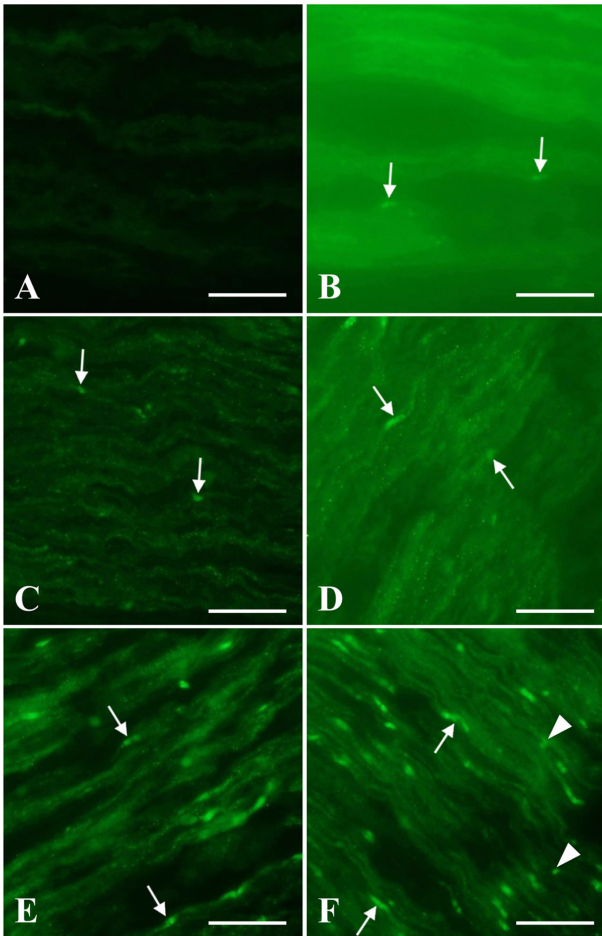
출생 당일(P0) 랫드 공동신경에서는 매우 미약하지만 NF 면역반응을 관찰할 수 있었고 NF의 분포는 매우 드물게 관찰되었다(Fig. 1B).

출생 1일(P1)부터는 7일까지 일령이 경과함에 따라 NF의 면역반응이 계속 증가하였고(Figs. 1C-F) 특히, 7일령에서는 성숙한 신경에서 볼 수 있는 만큼 결마디의 NF 면역반응이 뚜렷하게 관찰되었다. 결마디에서 발현하는 NF는 이전 연구자들의 연구 결과 [3, 4, 8]를 바탕으로 NF155인 것으로 볼 수 있다. 본 실험에서 연구 대상으로 공동신경의 섬유 부분을 설정하였기 때문에 축삭시작분절에서 주로 발현되는 것으로 알려진 NF186의 발현은 체크하지 않았고 양쪽 결마디 사이의 틈새인 말미집마디에서도 NF 면역반응이 나타나지 않았기 때문에 본 실험에서 NF186의 면역반응은 보이지 않았고 관찰되는 NF 면역반응은 모두 NF155인 것으로 알 수 있다.

NF155의 면역반응이 나타나는 양상은 말미집마디를 기준으로 양쪽에 있는 결마디에서 대칭적으로 나타났다. 또한, 7일령의 랫드에서는 결마디에서 관찰되는 NF 면역반응 외에 매우 짧은 마디 모양으로 말미집틈새에서도 NF155 면역반응이 관찰되었다.

### 면역전자현미경염색

면역전자현미경염색으로 관찰한 랫드 공동신경에서 태생 20일령(E20)에서는 NF155에 양성 반응을 보이는 금입자를 관찰할 수 없었다(Fig. 2A). 출생 당일(P0)에는 NF155에 양성 반응을 보이는 금입자를 관찰할 수 있었으나 그 분포가 매우 드물게 나타났으며(Fig. 2B), 출생 1일령(P1) 이후 일령이 증가하면서 축삭막을 따라 나란히 배열된 NF155 양성 반응의 금입자의 분포가 현저하게 증가하였는데(Figs. 2C-F) 이는 면역형광염색으로 관찰한 결과와 일치하였다.

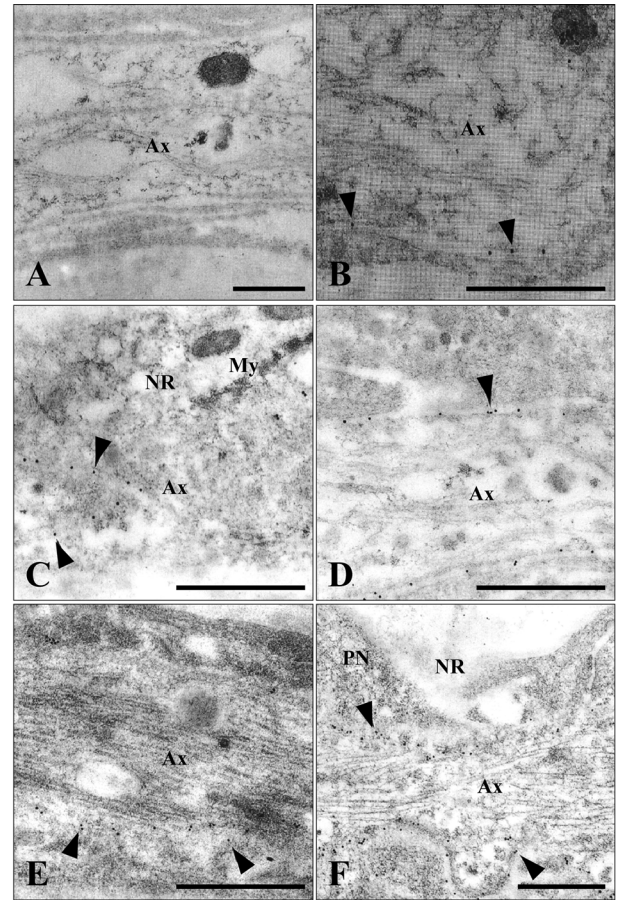


**Fig. 1.** Immunofluorescence of NF155 expression in rat sciatic nerve. At the age of embryonic day 20 (E20) any NF155 immunoreactive structures were not found in the sciatic nerve. NF155 expression in the paranodal region (arrows) was first detected at postnatal day 0 (P0) and dramatically increased with age. At postnatal day 7, NF155 immunoreaction was also checked in the Schmidt-Lanterman cleft (arrow heads). (A) Embryonic day 20 (E20), (B) Postnatal day 0 (P0), (C) Postnatal day 1 (P1), (D) Postnatal day 2 (P2), (E) Postnatal day 3 (P3), (F) Postnatal day 7 (P7). Scale bars: 20  $\mu$ m.

일령이 증가함에 따라 궁둥신경에서 말이집의 형성이 뚜렷하게 확인되었고 주로 곁마디 부위의 축삭막을 따라 NF155 양성반응 금입자의 분포가 뚜렷하게 나타나고 신경마디의 중심 부위의 축삭막에서는 NF 면역반응이 나타나지 않음을 확인하였다.

## 고 찰

NF는 immunoglobulin superfamily에 속하는 cell adhesion molecule로 닭의 축삭에서 처음 발견되었는데 [19], 이 그룹에 속하는 분자들은 축삭의 성장 [17, 23], 축삭의 방향 유도 [12, 20], 신경연접형성 [13], 신경세포-아교세포 상호작용 [21], 말이집형성 [24] 등 신경계통의 발생과정에서 중요한



**Fig. 2.** Post-embedding immunoelectron micrography of NF155 expression in rat sciatic nerve. NF155 immunoreactive gold particles (arrow heads) were first checked at postnatal day 0 (P0) and rapidly increased with age. NF155 was prominently detected in the axolemma of paranodal region and not detected in the central region of node of Ranvier. Ax: axon, My: myelin, NR: node of Ranvier, PN: paranodal region. (A) Embryonic day 20 (E20) (B) Postnatal day 0 (P0), (C) Postnatal day 1 (P1), (D) Postnatal day 2 (P2), (E) Postnatal day 3 (P3), (F) Postnatal day 7 (P7). Scale bars = 500 nm.

역할을 하는 것으로 알려져 있다.

NF는 중추신경계통과 말초신경에서 색다른 분포 양상을 보이는데 지금까지 몇 가지 isoform이 알려져 있고 그 중에서 NF155와 NF186에 대하여 주로 많은 연구가 이루어져왔다.

중추신경계통에서 NF155는 말이집 형성의 개시와 함께 oligodendrocytes에서 일시적으로 강하게 발현한다. Oligodendrocytes에서 말이집 형성 초기에 NF의 급격한 증가가 있으나, 어느 정도 시간이 경과하면 그 발현이 갑자기 줄어들면서 성숙한 동물에 이르기까지 주로 신경세포에 분포하게 되는 것이 흥미롭다 [6].

말초신경에서는 NF의 발현양상에 대한 연구가 많지 않다. Davis 등 [8]은 NF155가 민말이집 축삭에서 발현한다고 했으며, Davis 등 [9]은 궁둥신경에서 가장 많이 존재하는 형

태의 isoform은 NF155로서 말이집마디에서 발현함을 보고했다. 또한, Tait 등 [22]은 NF155가 말이집 형성시 말이집의 싸임과 동시에 Caspr1과 함께 말이집 층의 결마디에 집중되는 것으로 보고했고, Davis 등 [8]도 NF155가 결마디에 분포함을 보고했다.

본 연구에서 저자들은 랫드 궁둥신경에서 NF155가 신경섬유의 결마디에서 최초로 발현되는 시기를 면역세포화학적으로 추구하고 NF155의 발현 개시와 관련된 신경섬유의 초기의 구조적인 변화에 대해 알아보았다.

면역형광염색과 면역전자현미경실험에서 태생 20일째 태아의 궁둥신경에서 NF155의 발현은 전혀 나타나지 않았다. 그러나 출생 당일(P0) 궁둥신경의 축삭막을 따라가며 NF155의 발현이 처음으로 나타나기 시작하여 시간이 경과함에 따라 발현이 증가되었다.

출생후 1일(P1)부터 일령이 경과함에 따라 7일령까지 NF155의 발현이 급격하게 증가되었고 발현 양상도 가운데 좁은 틈새를 두고 양쪽에 대칭적인 모습으로 좀 더 뚜렷하게 관찰되었다.

따라서, 말이집 형성이 진행되고 말이집마디의 구조가 갖춰지는 동안 NF155는 축삭막을 따라 분포하면서 말이집마디를 축으로 양쪽 결마디쪽에 대칭적인 발현 양상을 보이고 이는 말이집의 형성과 관련하여 어떤 역할을 하는 것으로 보인다.

말이집의 형성은 동물이 출생 무렵 급속하게 진행되는 태아기의 미성숙한 말초신경에서 축삭은 하나의 신경집세포에 의해 둘러싸인 채로 다발로 뭉쳐 있다가 신경집세포의 증식과 함께 분리되어 하나의 축삭에 하나의 신경집세포가 대응하는 구도가 형성된다 [2]. 출생 무렵의 랫드에서 각각의 축삭에 신경집세포가 대응하고 있던 상태에 신경집세포가 축삭을 감아 돌기 시작하면서 생후 2일경에는 평균 7층 정도의 감싸기가 진행되는 것으로 알려져 있다 [16]. 생후 1주까지 말이집의 형성은 급속하게 진행되어 신경섬유의 둘레에 신경집세포의 막이 25겹 정도 감아 돌아서 치밀화의 과정에 들어가게 된다 [11].

본 연구는 태아기와 출생 후 이른 시기에 말이집의 형성이 일어나는 시기에 NF155의 발현양상이 어떤 변화가 있는지를 알아보아 궁둥신경의 말이집형성과 NF155의 상관관계를 추적하고자 하였다. 본 연구에서 NF155와 NF186을 동시에 인식하는 항체를 사용하여 실험에 사용하였지만 NF186의 분포는 말이집마디와 축삭시작분절에서 볼 수 있는 것으로 본 실험에서는 축삭시작분절은 연구 대상에 포함되지 않았고 말이집마디의 중심부에서는 NF186의 발현이 뚜렷하게 나타나지 않았다. 따라서, 본 연구에서는 결마디에 분포하는 NF155의 발현을 확인하여 그 시초발현이 언제 이루어지는지 추적하는 것을 목표로 삼았다.

본 연구의 결과로 미루어 볼 때 신경섬유에서 말이집마디의 출현을 비롯하여 말이집의 형성은 NF155의 발현과 매우 깊은 관련이 있는 것으로 보이고 앞으로 좀 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2010년도 건국대학교 학술진흥연구비 지원에 의한 논문임.

## 참고문헌

1. **Brummendorf T, Rathjen FG.** Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily. *Protein Profile* 1995, **2**, 963-1108.
2. **Bunge RP, Bunge MB, Bates M.** Movements of the Schwann cell nucleus implicate progression of the inner (axon-related) Schwann cell process during myelination. *J Cell Biol* 1989, **109**, 273-284.
3. **Chang BH, You KH, Lee JH, Cho IH, Bae CS, Park CH, Han JM, Choe NH, Chang BJ.** A study on the localization of neurofascin in the myelinated rat sciatic nerve fibers. *Korean J Electron Microscopy* 2006, **36**, 131-140.
4. **Charles P, Tait S, Faivre-Sarrailh C, Barbin G, Gunn-Moore F, Denisenko-Nehrbass N, Guennoc AM, Girault JA, Brophy PJ, Lubetzki C.** Neurofascin is a glial receptor for the paranodin/Caspr-contactin axonal complex at the axoglial junction. *Curr Biol* 2002, **12**, 217-220.
5. **Choi HY, Choi IH, Lee JH, Nahm SS, Chang BJ.** Relationship between the formation of Schmidt-Lantermann incisure and the localization of neurofascin in rat sciatic nerve. *Korean J Vet Res* 2009, **49**, 273-278.
6. **Collinson JM, Marshall D, Gillespie CS, Brophy PJ.** Transient expression of neurofascin by oligodendrocytes at the onset of myelinogenesis: implications for mechanisms of axon-glial interaction. *Glia* 1998, **23**, 11-23.
7. **Davis JQ, Bennett V.** Ankyrin binding activity shared by the neurofascin/L1/NrCAM family of nervous system cell adhesion molecules. *J Biol Chem* 1994, **269**, 27163-27166.
8. **Davis JQ, Lambert S, Bennett V.** Molecular composition of the node of Ranvier: identification of ankyrin-binding cell adhesion molecules neurofascin (mucin+/third FNIII domain-) and NrCAM at nodal axon segments. *J Cell Biol* 1996, **135**, 1355-1367.
9. **Davis JQ, McLaughlin T, Bennett V.** Ankyrin-binding proteins related to nervous system cell adhesion molecules: candidates to provide transmembrane and intercellular connections in adult brain. *J Cell Biol* 1993, **121**, 121-133.
10. **Dubreuil RR, MacVicar G, Dissanayake S, Liu C, Homer D, Hortsch M.** Neuroglial-mediated cell adhesion induces assembly of the membrane skeleton at cell contact sites. *J Cell Biol* 1996, **133**, 647-655.
11. **Garbay B, Heape AM, Sargueil F, Cassagne C.** Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* 2000, **61**, 267-304.
12. **Hortsch M, Goodman CS.** Cell and substrate adhesion molecules in *Drosophila*. *Annu Rev Cell Biol* 1991, **7**, 505-557.
13. **Itoh K, Stevens B, Schachner M, Fields RD.** Regulated expression of the neural cell adhesion molecule L1 by specific patterns of neural impulses. *Science* 1995, **270**, 1369-1372.
14. **Koticha D, Maurel P, Zanazzi G, Kane-Goldsmith N, Basak S, Babiarez J, Salzer J, Grumet M.** Neurofascin interactions play a critical role in clustering sodium channels, ankyrin G and beta IV spectrin at peripheral nodes of Ranvier.

- Dev Biol 2006, **293**, 1-12.
15. **Lambert S, Davis JQ, Bennett V.** Morphogenesis of the node of Ranvier: co-clusters of ankyrin and ankyrin-binding integral proteins define early developmental intermediates. *J Neurosci* 1997, **17**, 7025-7036.
  16. **Low PA.** Hereditary hypertrophic neuropathy in the trembler mouse. Part 2. Histopathological studies: electron microscopy. *J Neurol Sci* 1976, **30**, 343-368.
  17. **Morales G, Hubert M, Brummendorf T, Treubert U, Tarnok A, Schwarz U, Rathjen FG.** Induction of axonal growth by heterophilic interactions between the cell surface recognition proteins F11 and Nr-CAM/Bravo. *Neuron* 1993, **11**, 1113-1122.
  18. **Pruss T, Niere M, Kranz EU, Volkmer H.** Homophilic interactions of chick neurofascin in trans are important for neurite induction. *Eur J Neurosci* 2004, **20**, 3184-3188.
  19. **Rathjen FG, Wolff JM, Chang S, Bonhoeffer F, Raper JA.** Neurofascin: a novel chick cell-surface glycoprotein involved in neurite-neurite interactions. *Cell* 1987, **51**, 841-849.
  20. **Stoeckli ET, Landmesser LT.** Axonin-1, Nr-CAM, and Ng-CAM play different roles in the in vivo guidance of chick commissural neurons. *Neuron* 1995, **14**, 1165-1179.
  21. **Suter DM, Pollerberg GE, Buchstaller A, Giger RJ, Dreyer WJ, Sonderegger P.** Binding between the neural cell adhesion molecules axonin-1 and Nr-CAM/Bravo is involved in neuron-glia interaction. *J Cell Biol* 1995, **131**, 1067-1081.
  22. **Tait S, Gunn-Moore F, Collinson JM, Huang J, Lubetzki C, Pedraza L, Sherman DL, Colman DR, Brophy PJ.** An oligodendrocyte cell adhesion molecule at the site of assembly of the paranodal axo-glia junction. *J Cell Biol* 2000, **150**, 657-666.
  23. **Williams EJ, Furness J, Walsh FS, Doherty P.** Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. *Neuron* 1994, **13**, 583-594.
  24. **Wood PM, Schachner M, Bunge RP.** Inhibition of Schwann cell myelination in vitro by antibody to the L1 adhesion molecule. *J Neurosci* 1990, **10**, 3635-3645.