

BDNF 유전자 이입 슈반세포와 PGA 도관을 이용한 백서 좌골신경 재생에 관한 연구

최원재¹ · 안강민¹ · 고은봉¹ · 신영민¹ · 김윤태¹ · 황순정¹ · 김남열² · 김명진¹조승우³ · 김병수³ · 김윤희⁴ · 김성민⁵ · 오승재⁶ · 김성준⁶ · 장정원² · 이종호¹¹서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, ²연세대학교 의과대학 약리학교실, ³한양대학교 공과대학 화공학과,⁴경희대학교 문리대학 생물학과, ⁵강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, ⁶서울대학교 전기컴퓨터공학부**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2004;30:465-473)PERIPHERAL NERVE REGENERATION USING POLYGLYCOLIC ACID CONDUIT AND
BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR GENE TRANSFECTED
SCHWANN CELLS IN RAT SCIATIC NERVEWon-Jae Choi¹, Kang-Min Ahn¹, En-Feng Gao¹, Young-Min Shin¹, Yoon-Tae Kim¹, Soon-Jeong Hwang¹,
Nam-Yeol Kim², Myung-Jin Kim¹, Seung-Woo Jo³, Byung-Soo Kim³, Yun-Hee Kim⁴,
Soung-Min Kim⁵, Seung-Jae Oh⁶, Sung-Jun Kim⁶, Jeong-Won Jahng², Jong-Ho Lee¹¹Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Seoul National University²Department of Pharmacology, Yonsei Medical School, ³Department of Chemical Engineering, Hanyang University⁴Department of Biology, Kyung-Hee University⁵Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Kangnung National University⁶School of Electrical Engineering and Computer Science, Seoul National University**Purpose :** The essential triad for nerve regeneration is nerve conduit, supporting cell and neurotrophic factor. In order to improve the peripheral nerve regeneration, we used polyglycolic acid(PGA) tube and brain-derived neurotrophic factor(BDNF) gene transfected Schwann cells in sciatic nerve defects of SD rat.**Materials and methods :** Nerve conduits were made with PGA sheet and outer surface was coated with poly(lactic-co-glycolic acid) for mechanical strength and control the resorption rate. The diameter of conduit was 1.8mm and the length was 17mm. Schwann cells were harvested from dorsal root ganglion(DRG) of SD rat aged 1 day. Schwann cells were cultured on the PGA sheet to test the biocompatibility adhesion of Schwann cell. Human BDNF gene was obtained from cDNA library and amplified using PCR. BDNF gene was inserted into E1 deleted region of adenovirus shuttle vector, pAACCMVpARS. BDNF-adenovirus was multiplied in 293 cells and purified. The BDNF-Adenovirus was then infected to the cultured Schwann cells. Left sciatic nerve of SD rat (250g weighing) was exposed and 14mm defects were made. After bridging the defect with PGA conduit, culture medium(MEM), Schwann cells or BDNF-Adenovirus infected Schwann cells were injected into the lumen of conduit, respectively. 12 weeks after operation, gait analysis for sciatic function index, electrophysiology and histomorphometry was performed.**Results :** Cultured Schwann cells were well adhered to PGA sheet. Sciatic index of BDNF transfected group was -53.66 ± 13.43 which was the best among three groups. The threshold of compound action potential was between 800 to 1000 μ A in experimental groups which is about 10 times higher than normal sciatic nerve. Conduction velocity and peak voltage of action potential of BDNF group was the highest among experimental groups. The myelin thickness and axonal density of BDNF group was significantly greater than the other groups.**Conclusion :** BDNF gene transfected Schwann cells could regenerate the sciatic nerve gap(14mm) of rat successfully.**Key words :** Peripheral nerve regeneration, PGA tube, BDNF, Schwann cell, Gene transfection**이종호**

110-768, 서울특별시 종로구 연건동 28

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Jong-Ho Lee

Department of OMFS, College of Dentistry, Seoul National University

28 Yeongun-dong, Jongno-gu, Seoul, # 110-768, South Korea

Tel : 82-2-2072-2631 Fax : 82-2-766-4948

E-mail : leejongh@plaza.snu.ac.kr

I. 서 론

신경재생을 위한 현재까지 가장 좋은 방법은 자가 신경이식이나 공여부의 감각이상이나 제한된 신경공여길이 그리로 통증이 심한 신경종(neuroma)의 발생 등의 합병증이 발생하게 된다. 이를 극복하기 위하여 다양한 조직공학적인 방법이 응용되어 왔

* 본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥 사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호 : 02-PJ1-PG1-CH07-0001)

며, 현재까지 손상된 신경의 재생 촉진은 3가지 인자의 복합적인 작용이 가장 효과적인 것으로 알려져 있다. 그 인자 중 첫째는 절단된 신경의 연결을 하는 도관이며, 둘째는 신경초의 성장을 도와주는 신경세포이며, 셋째는 신경성장인자이다¹⁾.

신경사이를 연결하는 도관은 신경의 재생에 있어서 필수적인 요건으로서 다양한 재료로서 발전 되어 왔다. 자가 신경에서부터 자가 정맥²⁾, 근육^{3,4)}, tendon⁵⁾, 동종 신경 및 이종신경⁶⁾ 등 생체에서 추출된 재료로부터 합성 재료중 비흡수성인 silicone⁷⁾, Gore-Tex⁸⁾ 등과 흡수성인 PLA, PLGA, PGA, biodegradable glass, PPE⁹⁾ 등이 개발되어 있다.

세포는 여러가지 성장인자를 생산하여 신경의 재생을 돕게 되고 주로 사용되는 세포로는 슈반세포, astrocytes, oligodendrocyte 나 bone marrow stem cell 등이 있다⁹⁾.

마지막으로 신경재생에 도움을 주는 신경성장인자(neurotrophic factor)는 여러가지 종류가 있으며, 이중 neurotrophin은 nerve growth factor(NGF), brain-derived neurotrophic factor(BDNF), neurotrophin-3(NT-3), neurotrophin -4/5(NT-4/5)를 포함하고 감각 및 운동신경의 발달과 생존 그리고 성장에 많은 영향을 주는 것으로 연구되어 있다. 이 중 BDNF는 돼지의 뇌에서 추출된 성장인자로서 사람의 경우 염색체 11p13 locus에 존재하며 NGF와 51개 동일한 아미노산을 가지고 있다. 특히 BDNF는 운동신경의 생존과 분화에 큰 영향을 미치며 중추 신경에서 운동신경의 재생에 관여한다고 알려져 있다^{10,11)}. BDNF 유전자를 이입한 슈반세포를 이식한 척수 신경재생에 관한 연구에서는 절단된 척수의 신경재생을 촉진하는 것으로 보고되었다¹²⁾. 최근까지의 연구는 대부분 중추신경에서 연구가 되어 왔으며 말초신경 재생에 있어 BDNF의 영향에 대한 연구는 논란의 여지가 많았다. 실험 디자인에 따라 다양한 결과가 보고되어 있으며, BDNF의 말초신경에 대한 영향은 결론이 내려져 있지 않다. Utley 등¹³⁾ 은 절단된 말초신경 재생에 BDNF가 기능적인 회복을 증진시킨다고 하였으나, Shirley 등¹⁴⁾ 은 효과가 없다고 하였다. Jones 등¹⁵⁾ 은 척수의 재생에 BDNF를 사용한 결과 국소적으로 고농도를 주입하였을 때만 효과가 있다고 하였다.

본 연구에서는 말초신경 재생에 필수요건인 신경도관, 지지세포 그리고 신경성장인자의 장점을 이용하고자 BDNF유전자가 이입된 슈반세포를 PGA로 만든 도관에 채워 말초 신경재생을 촉진하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 슈반세포의 채취 및 배양

슈반세포의 배양은 기존에 발표한 방법을 따랐다¹⁶⁾. 간단히 설명하면 슈반세포의 배양을 위하여 생후 1일의 Sprague Dawley를 얼음에 묻어 마취를 하고 70% 알코올로 소독을 한 후 등을 종절개하여 척수후근절을 채취하였다. 채취한 조직은 바로 차가운 CMF-HBSS 용액에 보관하고 척수후근절 채취가 끝나면 칼을 이용하여 후근절을 잘게 잘랐다. 배양 1일 후, 5mM cytosine arabi-

noside(Ara-C)를 배양액당 1 μ l/ml를 첨가된 배양액으로 교환하고, 48시간 후에 GDNF 0.2 μ g/ml와 cytosine arabinoside(Ara-C)이 첨가된 배양액으로 교환하였다. 일차배양에서 슈반세포의 성장이 육안으로 확인 될 정도로 잘 성장하였을 경우에는 GDNF 처리를 생략하였다. 이후 배양 중에 섬유모세포의 비율이 높아질 경우 Ara-C가 첨가된 배양액으로 바꾸어서 2회 정도 배양액을 바꾸어 주었다.

2. 재조합 BDNF-Adenovirus 제조 및 유전자 이입

BDNF-adenovirus는 경희대 생물학과 김윤희교수에게서 얻었는데, 그 제작 방법은 다음과 같았다. BDNF-adenovirus를 제조하기 위해 인간 BDNF cDNA 유전자를 cDNA library에서 PCR을 이용해 얻은 다음 adenovirus shuttle vector인 pAACCMVpARS의 E1 region이 제거된 위치에 cloning하였다. BDNF-adenovirus shuttle vector와 전체 adenovirus 5 genome을 가지고 있는 pJM17 plasmid를 293 cell에 co-transfection하여 adenovirus genome sequence간에 homologous recombination이 일어나게 하여 replication-incompetent BDNF-adenovirus를 생산하였다. 재조합 adenovirus는 viral genome 내에 BDNF sequence가 들어있는지 PCR을 이용해 확인하였고, BDNF-Adenovirus를 single plaque으로 분리하여 wild-type adenovirus를 제거하였다. 최종 분리한 BDNF 재조합 virus vector를 다량의 293 cell에 감염시키고 (50 m.o.i) 이틀 후 293 cell이 cytotoxicity를 나타낼 때 cell을 채취하고 -80 $^{\circ}$ C에서 얼림과 녹임을 5회 반복하고 각 단계마다 vortex로 과격히 흔들어주어 BDNF-adenovirus 혼탁액을 얻었다. 배양된 슈반세포에 BDNF재조합 adenovirus를 넣고 밤새 배양하여 유전자 이입을 하였다.

3. PGA 도관제작

생분해성이고 non-woven meshes인 100% PGA (Albani International Inc. USA)를 주재료로 하여 도관을 제작하였다. PGA sheet fibers는 지름이 12 μ m 이며 PGA의 inherent viscosity는 1.23 dl g⁻¹이었다. 그리고 differential scanning calorimetry로 측정한 PGA의 crystallinity는 57%이었다. PGA meshes를 강화하기 위하여 표면을 클로로포름 용액에 녹인 75:25 poly(lactic-co-glycolic acid) 용액을 붓을 이용하여 PGA mesh의 한쪽 면을 골고루 코팅하였다. 도관형태로 만들기 위하여 지름 1.8mm의 Teflon cylinder에 polymer films을 싸서 양측이 중첩되게 하였으며 중첩부위는 클로로포름 용액을 이용하여 접착하였다. 제작된 도관은 진공상태에서 3일간 보관하여 잔여 용매가 빠져 나오도록 하였으며, 37 $^{\circ}$ C에서 EO gas를 이용하여 소독하였다. 제작된 도관의 미세구조 관찰을 위하여 주사현미경 사진을 촬영하였다.

4. 주사전자현미경 사진(SEM study)

PGA 도관에 슈반세포의 부착 여부와 PGA의 세포독성을 파악하기 위하여 1 \times 1cm PGA sheet를 12-well plate에 넣은 뒤 배양액

으로 잠גיע 하였다. PGA sheet 위에 1×10^4 개의 슈반세포를 seeding 후 72시간 배양하였다. PGA sheet를 조심스럽게 꺼낸 뒤 주사현미경 사진관찰을 위하여 2.5% glutaraldehyde용액에 전 고정 한 후 phosphate buffer로 수세 하였으며 1% osmium tetroxide로 후고정하였다. Graded ethanol로 탈수를 하고 ion-sputtering coater(E5400®, BIO-RAD)로 gold-palladium을 코팅 한 후 주사현미경(JEOL 840A®, Japan)으로 300배와 500배에서 관찰하였다.

5. PGA 도관의 이식

생후 8주된 300g내의 백서(n=12)를 케타민(Ketara®, Yuhan Corp., 40mg/Kg) 과 xylazine을 (Rompun®, Bayer Korea Ltd., 10mg/Kg) 4:1로 혼합한 후 복강내로 주입하여 마취하였으며, 고정판에 사지를 고정한 후 좌측 대퇴부를 절개하였다. 이때 근육을 다치지 않게 조심하여 박리 한 후 좌측 좌골신경을 노출시켰다. Peroneal nerve와 tibial nerve 분지점에서 근심방면으로 10mm 부위에서 신경을 절단 한 뒤 17mm의 도관을 위치시켰다. 근원심부 신경이 1.5mm도관 안으로 들어가게 하여 최종 신경결손의 길이는 14mm가 되도록 하였다. 10-0 Nylon을 이용하여 원위부를 먼저 봉합한 후, 도관내 이식한 세포나 용액이 원심으로 새지 않도록 fibrin sealant(Greenplast®, 녹십자)를 이용하여 원심부위를 밀봉하였다. Hamilton syringe를 이용하여 MEM배지, 슈반세포 또는 BDNF-Adenovirus 감염 슈반세포를 각각 주입한 후 근심을 다시 10-0 Nylon을 이용하여 봉합하였다. 이때 도관의 근심부위가 위쪽을 향하게 한 상태로 근심의 절단된 신경을 도관의 내부로 들어가게 하여 내부에 이식한 세포와 배지가 새지 않도록 하였다. 근심부위의 신경은 충분히 박리하여 장력 없이 봉합되게 하였다. 봉합후 도관내의 이식재가 흘러 내리지 않도록 한 상태에서 근심부위도 역시 fibrin glue를 사용하여 밀봉하였다(Fig. 1-a, b).

실험군은 3군으로 나누었으며 PGA 도관군(P, n=4)은 도관을 이식한 후 40 μ l의 MEM 배지만 넣었으며, PGA-Sch(Sch, n=4)군은

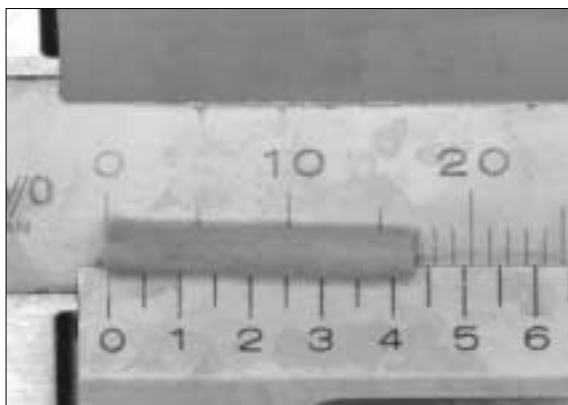
PGA도관에 배양된 슈반세포를 1×10^6 개/40 μ l 가 되도록 하여 이식하였다. PGA-BDNF-Sch(BDNF, n=4)군은 PGA도관에 BDNF-adenovirus를 감염시킨 슈반세포를 사용하였으며, 슈반세포의 수는 Sch군과 같이 하였다. 동종 슈반세포 이식 후 발생할 수 있는 면역 거부반응을 줄이기 위하여 cyclosporine A를 올리브유에 섞어 20mg/kg/day로 위장관 투여하였다. 대조군은 우측 좌골신경을 노출시키고 다시 창상을 봉합한 sham군으로(n=12) 하였다.

6. 보행분석 (좌골신경 기능지수 : SFI)

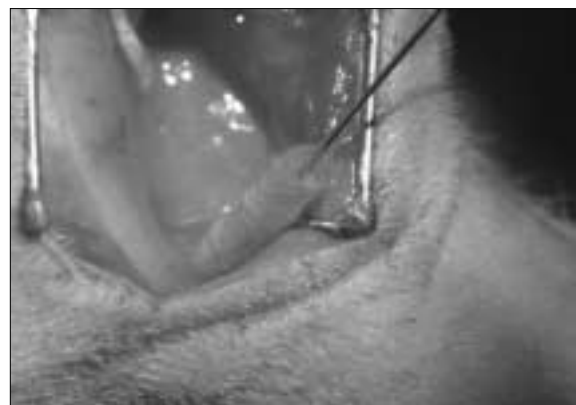
술후 12주째에 좌골신경의 손상 정도를 파악하기 위하여 Bain-Mackinnon-Hunter(BMH) sciatic function index⁷⁾를 조사하였다. 우선 백서의 뒷다리 발바닥에 잉크를 바른 뒤 암실로 이루어진 직선의 통로(8cm \times 45cm)를 여러 번 지나가게 하여 발바닥 자국을 검사하였다. 검사항목은 PL(print length), TS(toe spread), IT(intermediary toe spread)이었으며, 각각 PLF(PL Factor), TSF(TS Factor), ITF(IT Factor)를 아래의 표와 같이 구하여 수치를 구하였다. 정상은 0이며 -100의 수치는 좌골신경이 완전 절단된 상태로 판단하였다.

7. 전기생리학적 검사

술후 12주째에 이식한 좌골 신경부위를 노출시킨 뒤 좌우의 신경이 분리 되지 않도록 주의하여 박리 하였다. 근위단과 원위단의 신경을 노출시킨 후 자극 전극이 근위단에 위치하고 수용 전극이 원위단에 위치하도록 하였다. 주위의 노이즈를 감소시키기 위하여 액상파라핀으로 절연하였으며 정상부위는 자극을 20 μ A부터 시작하여 반응이 나타날 때까지 강도를 올렸다. 실험군측은 자극은 100 μ A부터 시작하여 반응이 있을 때까지 증가시켰다. 원위부의 근육이 움직이면서 발가락을 움직일 때 전류를 역치로 정하였으며 이때 자극 전도 속도를 측정하였다. 자극원은 WPI



(a)



(b)

Fig. 1. (a) Fabricated PGA conduit (length 17mm, diameter 1.8mm)
(b) Injection of Schwann cells using Hamilton syringe

Table 1. Experimental groups for rat sciatic nerve regeneration

Experimental Group	Nerve repair Modality
I (n=4)	PGA only (P)
II (n=4)	PGA - Sch (Sch)
III (n=4)	PGA-BDNF-Sch (BDNF)

P : PGA conduit filled with MEM

Sch : PGA conduit filled with Schwann cells

BDNF : PGA conduit filled with BDNF-adenovirus infected Schwann cells

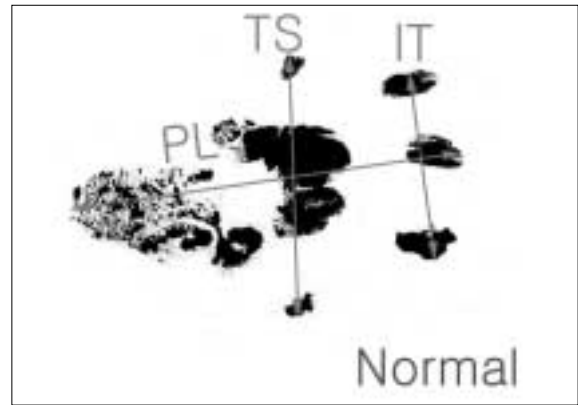


Fig. 2. SD rat footprint of normal side

Table 2. Sciatic function index (SFI)

$$SFI = -38.3(EPL-NPL/NPL) + 109.5(ETS-NTS/NTS) + 13.3(EIT-NIT/NIT) - 8.8$$

(EPL : Experimental print length, NPL : Normal print length, ETS : Experimental toe spread, NTS : Normal toe spread,

EIT : Experimental intermediary toe spread, NIT : Normal intermediary toe spread)

stimulus isolator A365® (WPI Instrument®, USA)를 이용하였으며 amplifier(Plexon, Dallas, USA)를 이용하여 1000배 증폭하여 신호를 측정하였다. Oscilloscope은 LeCroy 9304AM QUAD 200MHz Oscilloscope를 이용하였으며, 활동전압이 발생할 때 전압을 측정하여 peak voltage로 기록하였다.

8. 조직 및 조직 형태학적 검사

각 실험군 및 대조군의 신경생리학적 검사를 시행한 후 17mm의 이식체를 포함한 좌골신경을 박리하여 채취하였다. 양측에 사용된 10-0 Nylon을 수술 현미경(Zeiss, Germany) 하에 찾은 뒤 가운데 부위를 찾아서 표본을 제작하였다. 가운데가 절단된 조직은 2% glutaraldehyde에 고정하고, 2% osmium tetroxide에 후고정을 시행하였다. 100% epon에 포매시킨 다음 1 μm 두께의 semi-thin 절편을 만든 후, 각 조직편을 toluidine blue에 염색하였다. 광학현미경 하에 축삭(axon)이 관찰되는 대표부위를 선택하여 400배에서 각 3군데에서 관찰하여 디지털 영상을 얻었으며(n=12), Optima 6.1 image analyzing 프로그램(mediacybernestic USA)을 이용하여 축삭 밀도를 구하였다. 대표부위 중 각 3군데를 정하여 투과전자현미경 사진을 얻은 후 컴퓨터 화상분석을 시행하여 신경수초의 두께를 측정 비교하였다.

9. 통계분석

정상신경과 각 실험군의 축삭 수와 신경초 두께를 구하여 평균을 구하였으며, 각군의 비교를 위하여 Kruskal-Wallis test를 시행하고 Duncan's multiple comparison으로 사후 검정하였다.

III. 결 과

1. PGA 도관 제작 및 주사현미경 관찰

도관은 PGA fiber로 구성되어 있었으며, 두께는 25 μm 내외였다. 도관의 전반부에서 다공성을 지니고 있어서 주위에서 영양분이 공급되는데 효과적인 형태를 가지고 있었다. 도관의 내경은 1.5~1.8mm 였으며 내부의 PGA fiber는 부드러워서 백서의 좌골신경단(직경 1.0-1.5mm)을 저항감 없이 내부에 넣을 수 있었다. 또한 PGA도관은 적절한 강도를 가지고 있어 미세봉합사를 이용하여 신경과 연결 시 무리 없이 수술이 가능하였다(Fig. 3-a, b).

2. 슈반세포의 PGA sheet 배양

PGA sheet에 슈반세포를 배양한 결과 슈반세포가 PGA fiber에 부착이 잘 되었으며 돌기를 형성하고 있었다. SEM 결과 슈반세포가 PGA 도관 내에서 자라는데 적절하고 생체 적합하다고 판단되었다(Fig. 4-a, b).

3. 좌골신경기능지수(Table 3)

이식 12주 후에 측정된 보행분석 결과 좌골신경지수는 Table 3과 같았다. PGA 도관만 이식한 P군은 평균 -77.76 ± 10.65로서 정상치에 비하여 30% 정도의 수치였다. 이에 비하여 BDNF군에서의 SFI는 -53.66 ± 13.43로서 -65.02 ± 12.44의 평균수치를 보이는 Sch군 보다 더 높은 수치로 이는 BDNF가 이입된 군에서 가장 높은 신경 회복을 보여 주었다. 통계처리 결과 각 군간의 비교에서 P군과 BDNF군은 의미 있는 차이를 보였으며 (p=0.0002), 나머지

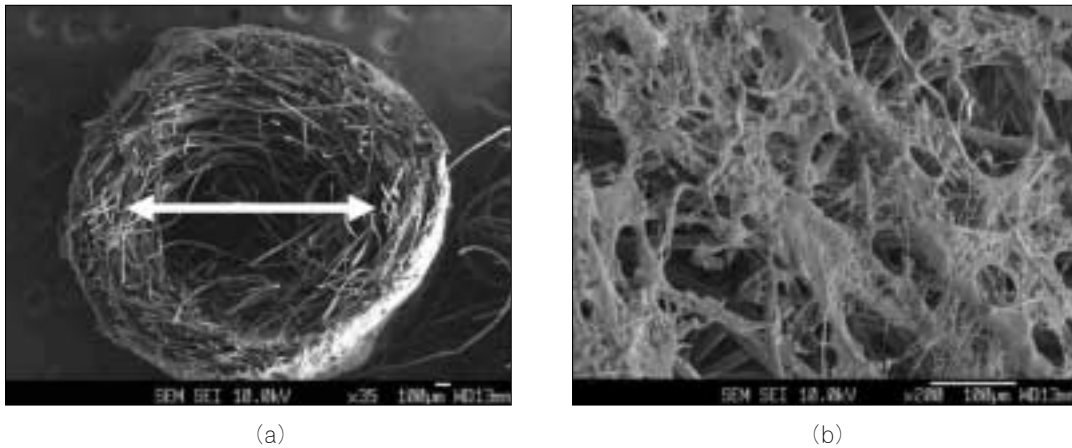


Fig. 3. (a) SEM photograph of PGA tube. Woven $12\mu\text{m}$ fiber is visible. Internal diameter was 1.5 to 1.8 mm (Internal Diameter : \leftrightarrow). Inner fiber was soft enough to hold rat sciatic nerve end which diameter was between 1.0 and 1.5 mm.
 (b) 75:25 poly(lactic-co-glycolic acid) solution coated PGA mesh

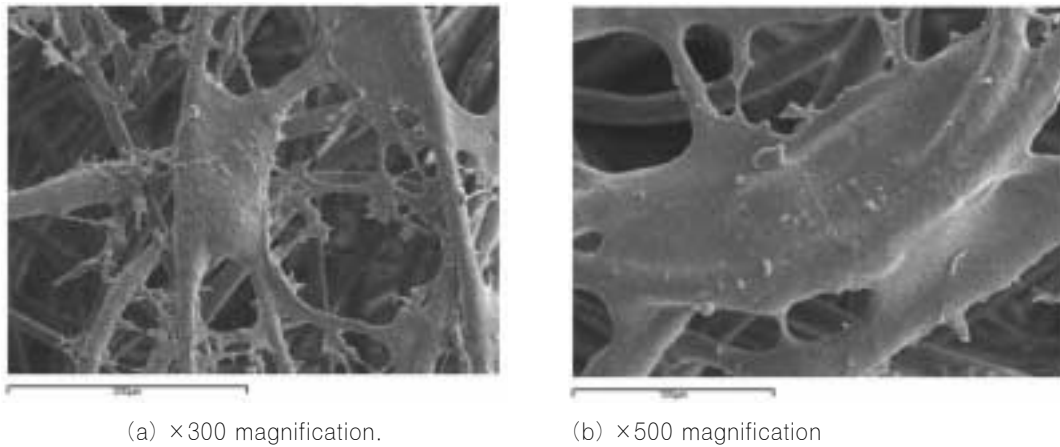


Fig. 4. Schwann cells cultured on PGA sheet

군간(P vs Sch, Sch vs BDNF)에는 의미 있는 차이를 보이지는 않았다($p>0.005$).

4. 전기생리학적 검사(Table 4)

근육반응을 발생하는 전기 역치는 전기자극을 $20\mu\text{A}$ 에서 시작하여 점차 올렸으며, 전기자극으로 원위부의 근육의 움직임과 발가락의 구부러짐을 기준으로 하였다. 정상측에서는 $80\mu\text{A}$ 자극에서 근육의 움직임이 나타나 낮은 역치를 보였으며, 실험군에서는 Sch군과 BDNF군에서는 $800\mu\text{A}$ 에서 처음 반응을 보였다. 나머지 P군에서는 1마리는 아무런 반응이 나타나지 않아서 신경이 재생이 일어나지 않는 것으로 판단하였으며, 나머지 3마리에서는 $1000\mu\text{A}$ 에서 반응이 나타났다. 실험군에서 전도속도와 활동전압의 측정을 위해서는 자극은 3군에서 모두 $1000\mu\text{A}$ 를 사용하였

다. 전도 속도는 P군과 Sch, BDNF군간에는 의미 있는 차이를 보였으며($P<0.0001$), BDNF-adenovirus를 감염시킨 슈반세포를 넣은 군에서 가장 높은 수치를 보였으나($6.16\pm 0.58\text{m/sec}$), 슈반세포만 넣은 군($5.1\pm 1.07\text{m/sec}$)과는 의미 있는 차이를 보이지 않았다($p>0.05$). 최고 전압 역시 P군과 Sch, BDNF군은 의미 있는 차이를 보였으나($p<0.0001$), Sch군과 BDNF군 사이에는 차이를 보이지 않았다($p>0.05$).

5. 조직형태학적 검사(Table 5)

채취한 조직의 횡단면을 절단하여 가운데 부위를 관찰하였다. 단면적은 반대측 정상군이 가장 넓었고, 그 다음은 BDNF군, Sch, P군 순이었다. 축삭의 밀도는 정상군이 제일 높았으며, 그 다음이 BDNF군, 다음이 Sch군이었고, PGA 도관만 사용한 군에서 밀

Table 3. Sciatic functional index (SFI)

SFI	P (n=4)	Sch (n=4)	BDNF (n=4)
Mean	-77.76 ± 10.65	-65.02 ± 12.44	-53.66 ± 13.43
Range	-62.00 ~ -82.10	-51.28 ~ -77.22	-44.34 ~ -70.22

P : PGA conduit filled with MEM

Sch : PGA conduit filled with Schwann cells

BDNF : PGA conduit filled with BDNF-adenovirus infected Schwann cells

Table 4. Conduction velocity (C.V)and peak voltage of Experimental Group (× 1000 amplification)

	Control (n=12)	P (n=4)	Sch (n=4)	BDNF (n=4)
Threshold(μA)	80	1000	800	800
C. V(m/sec)	10.29 ± 1.07	1.44 ± 1.00	5.1 ± 1.07	6.16 ± 0.58
Peak Voltage	0.46 ± 0.07	0.22 ± 0.21	0.47 ± 0.07	0.40 ± 0.10

P : PGA conduit filled with MEM

Sch : PGA conduit filled with Schwann cells

BDNF : PGA conduit filled with BDNF-adenovirus infected Schwann cells

Table 5. Axon density and Myelin thickness of normal and experimental groups

	Normal (n=12)	(n=4)	Sch (n=4)	BDNF (n=4)
Axon Density (each/mm ²)	19,950 ± 1,595	1,780 ± 1,319	9,550 ± 2,350	16,440 ± 3,250
Myelin Thickness (μm)	1.6615 ± 0.534	0.3807 ± 0.1251	0.3884 ± 0.086	0.5884 ± 0.1356

P : PGA conduit filled with MEM only

Sch : PGA conduit filled with Schwann cells

BDNF: PGA conduit filled with BDNF-adenovirus infected Schwann cells

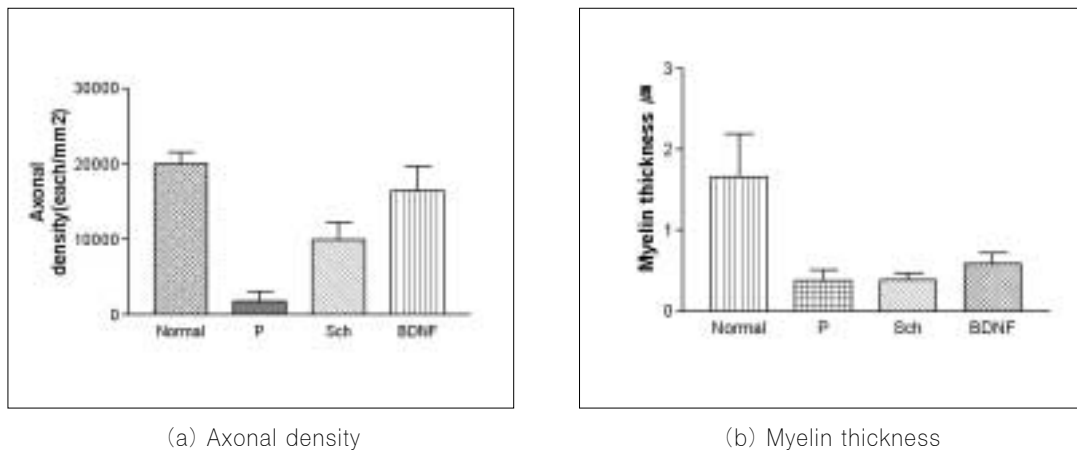


Fig. 5. Axonal Density(a) and Myelin thickness(b) of each group

도가 제일 낮았으며(Fig. 5-a, Fig. 6), 정상군과 실험군 모두에서 유의한 차이를 보였다(p<0.0001). 마이엘린 두께는 정상군과 모든 실험군 사이에 유의한 차이를 보여 정상신경과는 차이가 많

았다(p<0.0001). 실험군 간에는 P군과 BDNF군 사이에 유의한 차이를 보였으나(p=0.003) 나머지 군간은 통계학적으로 의미 있는 차이를 보이지 않았다(P<0.05) (Fig. 5-b, Fig. 7).

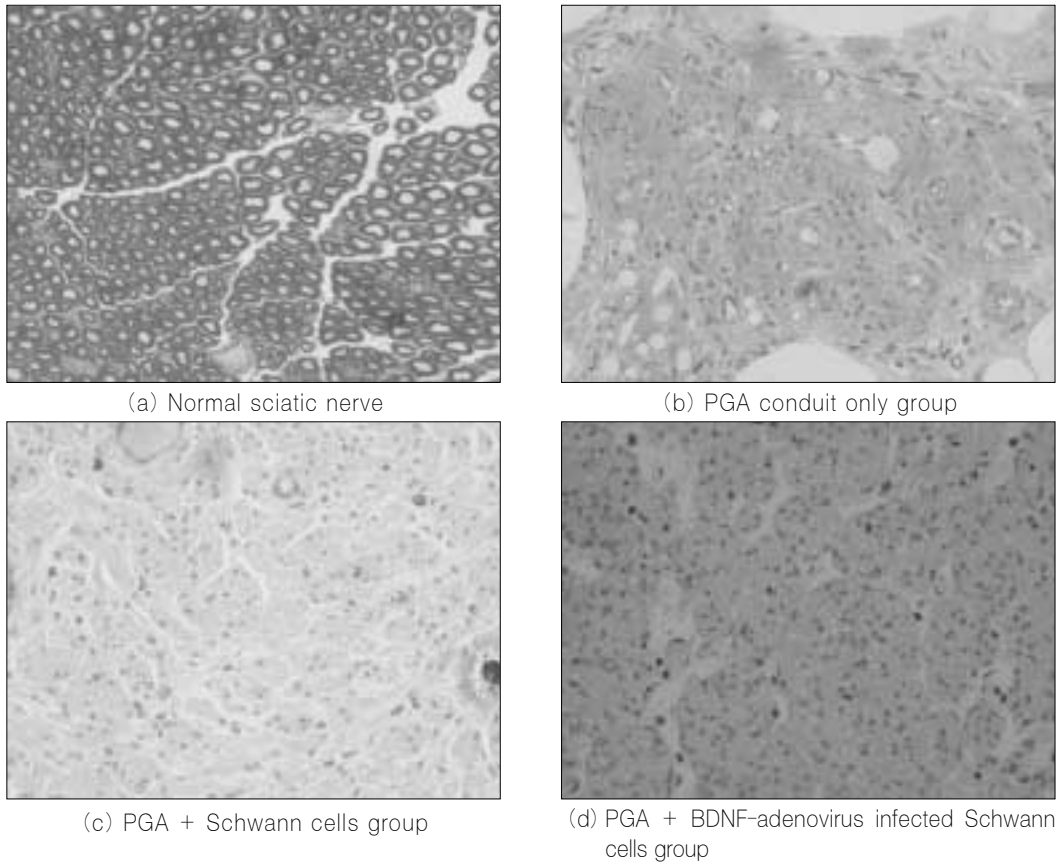


Fig. 6. Cross-section of regenerated nerves (specimen obtained at center of conduit, toluidine blue stain) ($\times 200$)

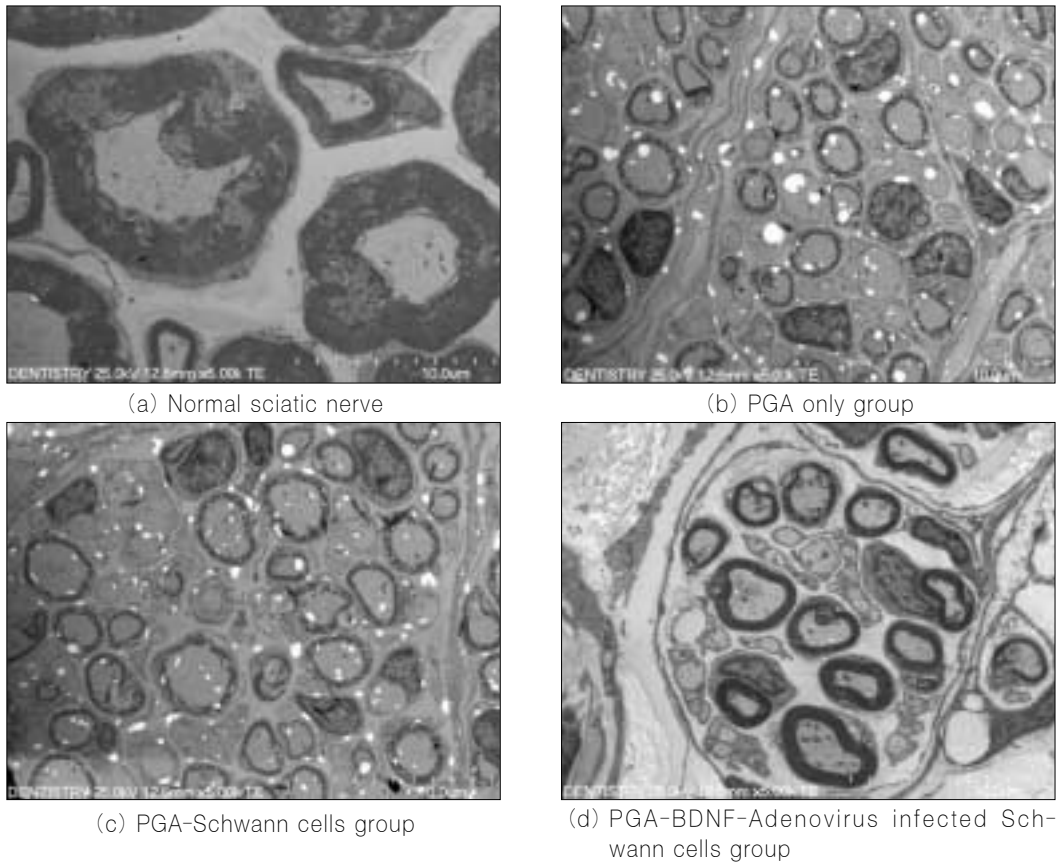


Fig. 7. TEM view of regenerated nerve ($\times 5,000$)

IV. 고 찰

이상적인 신경 도관이 갖추어야 할 성질로는 생분해성이며, 성장인자를 유리할 수 있고, 외부에서 공급된 세포가 잘 살고 축삭이 자라는 길을 제공하여야 한다. 이러한 말초신경 재생에 가장 많이 사용되는 재료는 생체재료와 합성재료로 나누어지는데, 생체재료는 독성이 적으며 생분해되는 성질이 있고 2차 수술이 필요 없다는 장점이 있다. 주로 사용된 생체재료로는 자가신경, 근육, 정맥, tendon, epineural sheath와 지방막(fat sheaths) 등이 있다. 하지만 동종이나 이종간의 이식을 한 경우 면역반응으로 인하여 조직 거부가 발생하여 면역억제제의 투여가 필요한 경우가 많았다. 하지만 최근에 이종이식체의 처리가 발달함에 따라 acellular allograft를 이용하여 신경재생의 유도체로 사용하여 좋은 결과를 보이고 있다. 생체도관은 대량생산이 어려워 좀더 간단한 방법으로 만들수 있는 방법이 연구되어 왔으며, 여러가지 생체 적합고분자 재료의 발달로 인하여 동종이나 이종 생체재료는 합성물질로 대체 되고 있다.

말초신경재생을 위한 초기실험에서는 생체내 흡수되지 않는 재료인 silicone, metal tube 등을 사용하였으나 신경이 재생되면서 이식된 도관에 의해 압력이 가해지는 현상이 발생하였으며 추가적인 제거 수술이 필요하여 생분해성 재료의 개발이 시도되어 왔다. 최근에는 합성고분자 제작의 발전에 힘입어 polylactic acid(PLA), polylactic-co-glycolic acid(PLGA), polyurethane, polyphosphoester(PPE) 등이 사용되어 왔다. 특히 PPE는 양호한 말초신경 재생을 보였으나 초기에 crack 발생이 높고 조작이 힘들다는 단점이 있다¹⁸. 이에 비해 PGA는 조작이 간편하고 도관을 만들기 편한 sheet 형태로 주문 제작이 가능하고, 다공성이어 주위 조직에서 영양분 공급을 받기에도 적당하다. 실제 신경도관 내부는 PGA fiber로 구성되어 다공성을 보이고 부드러운 백서의 좌골신경단을 도관 내에 포관할 경우 부드럽게 들어가 수술 시 어려움이 없었다. 그러나 PGA만으로 도관을 제작할 경우 생체내에서 8주 이내에 생분해 되는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험에서는 PLGA를 PGA mesh에 약 25 μ m 두께로 코팅하여 조작용이 하게 하고 분해 속도를 늦춰 주교자 하였다. 본 연구에서는 신경도관의 생체 분해 속도와 염증 반응을 매식 시간에 따라 조사하지는 않았으나, 이식 12주째 신경 탐사 시 PGA 도관은 완전히 분해되어 있었으며, 주위염증반응도 이때에는 관찰되지 않았다. 본 연구에서 사용한 도관의 문제점으로는 도관 외면에 도포한 PLGA가 도관의 다공성을 다소 차단하여 도관 내부에 들어 있는 슈반세포의 생존에 어떤 영향을 미치지 않았나 하는 점이였다. 이러한 점을 확인하기 위해 도관 내에 주입된 슈반세포의 생존도를 생체내에서 측정하는 실험이 추가되었으면 하는 아쉬움이 있었다. 또한 슈반세포에 대한 생적합성 정도도 우리는 단지 PGA 내면에 세포 부착 정도만 주사전자현미경으로 조사하였으나, 세포독성도를 MTT assay 등을 이용해 추가하였으면 좋았겠다는 생각이 들었다.

BDNF는 motor neuron의 생존을 높이는 것으로 알려져 있으며 운동과 감각 신경의 axonal growth를 촉진하는 사실이 알려져 있

다^{20,22}. 하지만 말초신경재생에서 BDNF의 역할에 대하여서는 실험하는 디자인에 따라서 다양한 결론으로 논란의 여지가 많았다. Utley 등¹⁹은 BDNF와 콜라겐 도관을 이용한 말초신경재생 실험에서 신경의 기능적인 회복이 증가 된다고 하였으나, 일부 연구자들은 일시적인 BDNF의 국소 투여는 말초 신경재생에 영향을 주지 않는다고 하였다¹⁶. 이러한 결과들은 BDNF를 전달하는 방법의 차이에 의해 발생하는 것으로 국소적으로 적절한 농도를 주입하여야 신경재생을 향상시키는 것으로 알려져 있다¹⁵. 지속적인 신경영양인자의 유리를 위하여 세포를 유전적으로 변형시키는 연구가 또한 진행되어 왔으며 가장 많은 연구의 대상이 된 것은 섬유모세포²⁰이며 최근에는 슈반세포¹²나 neural stem cell¹⁹ 등에도 유전자 이입을 하고 있다. 슈반세포에는 BDNF만 유리하게 하거나 NT-3를 혼합하여 생성하기도 하며 NGF를 유리하도록 유전자 이입도 가능하다. BDNF유전자 이입 슈반세포를 이용한 척수의 재생 실험에서 축삭의 성장을 도와준다는 연구가 있었으나²¹ 말초신경에서는 연구가 이루어 지지 않은 상태이다.

본 실험은 BDNF의 유리를 지속적으로 하기 위하여 슈반세포에 유전자 이입을 위하여 adenovirus를 사용하였다^{24,25}. 기도 상피세포(airway epithelium)를 자연적 숙주로 하는 adenovirus는 분열 중인 세포뿐만 아니라 neuron과 같이 최종 분화된 비분열 세포(non-dividing cell)에도 감염할 수 있는 폭 넓은 숙주범위를 갖고 있으며, 안정성 면에서 고려 할 때 adenovirus는 숙주의 염색체에 삽입되지 않으며 경미한 호흡기 질환을 유발할 뿐이다. 또한 virus의 분리와 높은 역가로의 농축이 쉬운 장점이 있다. 우리는 BDNF-adenovirus shuttle vector와 전체 adenovirus 5 genome을 가지고 있는 pJM17 plasmid를 293 cell에 co-transfection하여 adenovirus genome sequence간에 homologous recombination이 일어나게 하여 replication-incompetence BDNF-adenovirus를 생산하였다. 본 연구에서는 언급되지 않았으나 재조합 adenovirus viral genome 내에 BDNF sequence가 들어 있는 것을 PCR을 통해 그리고, 슈반세포에 BDNF-Adenovirus를 감염시켜 BDNF의 발현 및 분비 증가를 RT-PCR과 ELISA를 통해 확인하였다.

Evans 등²⁶은 백서 좌골 신경모델을 이용한 실험에서 PLLA 도관과 이종 슈반세포를 이용한 말초 신경재생에서 isograft를 한 군에 비하여 슈반세포만을 넣은 군에서는 신경의 재생에 있어 유의한 차이를 보여 슈반세포만으로는 자가신경이식에 해당하는 결과를 얻기는 힘들다고 하였다. 하지만 중추신경의 재생에 있어서 BDNF유전자를 이입시킨 경우 절단된 척수의 신경재생이 촉진되는 것을 보고하였다. 본 실험에서는 말초신경의 재생에 슈반세포와 비교하여 BDNF를 과량 분비하는 슈반세포의 신경재생 능력을 검증하고자 하였다. 비록 보행분석, 전도 속도와 역치전류를 준 경우 발행하는 최대 전압은 두 군에서 차이를 보이지 않았지만 전반적인 경향은 BDNF군에서 비교적 좋은 결과를 보였으며 조직학적 검사에서는 새로 재생된 축삭의 수와 마이엘린의 두께는 의미 있는 차이를 보였다. 비록 정상군에 비해서는 BDNF 유전자를 이입한 슈반세포의 이식군이 일부 열등한 결과를 보였지만 도관만 연결한 경우나 슈반세포만을 넣은 군보다는 기능적, 조직학적으로 우수한 결과를 보였다. 이는 BDNF를

분비하는 슈반세포가 말초 신경재생이 일어나고 있는 과정에 긍정적으로 작용하는 것으로 판단되었다. 본 실험에서 제작한 흡수성 도관과 BDNF 신경영양인자를 발현하는 슈반세포의 이식은 장차 자가신경이식의 신경재생능에 필적하며 이의 단점을 보완할 수 있는 보다 향상된 신경재생 방법으로 발전할 수 있을 것으로 사료되었다

V. 결 론

슈반세포는 PGA sheet에 부착이 잘 되었으며, PLLA 도관 PGA 도관은 이식 12주 이내에 생체에서 완전히 흡수되었다. BDNF-adenovirus를 감염시킨 슈반세포를 PGA 도관에 넣어 14mm의 백서 좌골 신경 결손부를 재건하였을 경우 PGA도관만 연결한 군이나 PGA도관에 슈반세포를 넣은 군에 비하여 높은 신경재생능을 보여 보다 향상된 신경재생법임을 확인할 수 있었다.

참고문헌

- Schmidt CE, Leach JB: Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. *Annu Rev Biomed Eng* 2003;5:293-347.
- Risitano G, Cavallaro G, Merrino T, Coppolino S, Ruggeri F: Clinical results and thoughts on sensory nerve repair by autologous vein graft in emergency hand reconstruction. *Chir Main* 2002;21(3):194-7.
- Battiston B, Tos P, Cushway TR, Geuna S: Nerve repair by means of vein filled with muscle grafts I. Clinical results. *Microsurgery* 2000;20(1):32-6.
- Battiston B, Tos P, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG, Guglielmo R: Nerve repair by means of vein filled with muscle grafts. II. Morphological analysis of regeneration. *Microsurgery* 2000;20(1):37-41.
- Brandt J, Dahlin LB, Lundborg G: Autologous tendons used as grafts for bridging peripheral nerve defects. *J Hand Surg [Br]* 1999;24(3):284-90.
- Ide C, Tohyama K, Tajima K, Endoh K, Sano K, Tamura M, et al: Long acellular nerve transplants for allogeneic grafting and the effects of basic fibroblast growth factor on the growth of regenerating axons in dogs: a preliminary report. *Exp Neurol* 1998;154(1):99-112.
- Danielsson PA, Adolfsson L, Dahlin LB: Different effect on axonal outgrowth of application of non-absorbable or absorbable tubes around a nerve repair. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 2001;35(4):347-53.
- Vasconcelos BC, Gay-Escoda C: Facial nerve repair with expanded polytetrafluoroethylene and collagen conduits: an experimental study in the rabbit. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;58(11):1257-62.
- Keirstead HS: Stem cell transplantation into the central nervous system and the control of differentiation. *J Neurosci Res* 2001;63(3):233-6.
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H: Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *Embo J* 1982;1(5):549-53.
- Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, Hofer M, Hengerer B, Masiakowski P, et al: Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 1989;341(6238):149-52.
- Menei P, Montero-Menei C, Whittemore SR, Bunge RP, Bunge MB: Schwann cells genetically modified to secrete human BDNF promote enhanced axonal regrowth across transected adult rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 1998;10(2):607-21.
- Utlely DS, Lewin SL, Cheng ET, Verity AN, Sierra D, Terris DJ: Brain-derived neurotrophic factor and collagen tubulization enhance functional recovery after peripheral nerve transection and repair. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996;122(4):407-13.
- Shirley DM, Williams SA, Santos PM: Brain-derived neurotrophic factor and peripheral nerve regeneration: a functional evaluation. *Laryngoscope* 1996;106(5 Pt 1):629-32.
- Jones LL, OM, Bunge MB, Tuszynski MH: Neurotrophic factors, cellular bridges and gene therapy for spinal cord injury. *J Physiol* 2001;533:83-89.
- Soung-Min Kim, Jong-Ho Lee, Nam-Yeol Kim, Kang-Min Ahn, Won-Jae Choi, Si-Ho Choi et al.: Improved protocol for Schwann cell isolation and proliferation from rat dorsal root ganglia in vitro. *J Kor Asso Maxillofac Plastic Reconstr Surgeons* 2003;25(4):265-72.
- Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA: Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1989;83(1):129-38.
- Xu X, Yee WC, Hwang PY, Yu H, Wan AC, Gao S, et al: Peripheral nerve regeneration with sustained release of poly(phosphoester) microencapsulated nerve growth factor within nerve guide conduits. *Biomaterials* 2003;24(13):2405-12.
- Molander H, Olsson Y, Engkvist O, Bowald S, Eriksson I: Regeneration of peripheral nerve through a polyglactin tube. *Muscle Nerve* 1982;5(1):54-7.
- Sendtner M, HB, Kolbeck R, Thoenen H, Barde YA: Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature* 1992;360:757-59.
- Oppenheim RW, Yin QW, Prevette D, Yan Q: Brain-derived neurotrophic factor rescues developing avian motoneurons from cell death. *Nature* 1992;360(6406):755-7.
- Yan Q, Elliott J, Snider WD: Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death. *Nature* 1992;360(6406):753-5.
- Loh NK, Woerly S, Bunt SM, Wilton SD, Harvey AR: The regrowth of axons within tissue defects in the CNS is promoted by implanted hydrogel matrices that contain BDNF and CNTF producing fibroblasts. *Exp Neurol* 2001;170(1):72-84.
- Li ZQ, Zhu QS, Zhu JY, Hao W, Xu YM, Wang CJ, et al: [Construction and identification of recombinant adenovirus vector containing Tet-on adjustable NT3 and BDNF genes]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2004;20(3):344-7.
- Koda M, Hashimoto M, Murakami M, Yoshinaga K, Ikeda O, Yamazaki M, et al: Adenovirus vector-mediated in vivo gene transfer of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes rubrospinal axonal regeneration and functional recovery after complete transection of the adult rat spinal cord. *J Neurotrauma* 2004;21(3):329-37.
- Evans GR, Brandt K, Katz S, Chauvin P, Otto L, Bogle M, et al: Bioactive poly(L-lactic acid) conduits seeded with Schwann cells for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 2002;23(3):841-8.