

경직성 뇌성마비 환자의 근육내  
Ubiquitin 및 Neural cell adhesion  
molecule 유전자 발현

연세대학교 대학원

의 학 과

정 성 훈

경직성 뇌성마비 환자의 근육내  
Ubiquitin 및 Neural cell adhesion  
molecule 유전자 발현

지도교수 한 수 봉

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2005년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

정 성 훈

# 정성훈의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2005년 12월 일

## 감사의 글

지금까지 참된 의사가 될 수 있도록 자상하게 인도해주신 한수봉 선생님께 진심으로 감사드리며 본 연구를 위하여 각별한 조언을 해주신 김현우 선생님, 김태승 선생님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 연구 진행에 많은 도움을 주신 병리학 교실의 김세훈 선생님, 정형외과 교실원 및 공선영 선생님께도 감사의 마음을 전합니다.

언제나 저의 든든한 정신적 버팀목이신 부모님과 장인, 장모님 그리고 사랑하는 아내 정은이와 아들 주한이께도 감사의 마음을 전합니다.

저자 씀

## 차 례

국문요약 .....	1
I. 서론 .....	2
II. 재료 및 방법 .....	5
1. 연구대상 .....	5
2. 조직학 검사 .....	6
가. Haematoxylin and Eosin 염색 .....	6
나. 호소조직화학 염색 .....	6
다. Gomori Trichrome 염색 .....	7
라. 면역조직화학 염색 .....	7
3. 유전자 발현 .....	8
가. 근육 조직의 RNA 분리 .....	8
나. RNA 정량 .....	9
다. 역전사 중합효소 연쇄반응 .....	9
(1) Clonal DNA 제작 .....	9
(2) 역전사 중합효소 연쇄반응 .....	9
III. 결과 .....	11
1. 조직병리학적 소견 .....	11
2. 조직화학적 소견 .....	12
가. Ubiquitin 단백질에 대한 조직화학염색 소견.....	12
나. Neural cell adhesion molecule 단백질에 대한 조직화학 염색 소견 .....	12
3. 유전자 발현 .....	13
가. Ubiquitin 유전자 발현 .....	13
나. Neural cell adhesion molecule 유전자 발현.....	14
IV. 고찰 .....	15
V. 결론 .....	21
참고문헌 .....	22
영문요약 .....	26

## 그림 차례

그림 1. 조직병리학적 소견 .....	11
그림 2. Ubiquitin단백에 대한 조직화학적 염색 .....	12
그림 3. Neural cell adhesion molecule단백에 대한 조직 화학적 염색 .....	12
그림 4. Ubiquitin유전자 발현 .....	13
그림 5. Neural cell adhesion molecule유전자 발현.	14

## 표 차례

표 1. 환자 요약 .....	6
표 2. 역전사 중합효소 연쇄반응에 사용된 Ubiquitin, Neural cell adhesion molecule과 GAPDH의 염 기서열 .....	10

국문요약

## 경직성 뇌성마비 환자의 근육내 Ubiquitin 및 Neural cell adhesion molecule 유전자 발현

목적 : 본 연구에서는 뇌성마비 환자에서 근육의 경직도에 따른 조직 병리학적 변화 및 Ubiquitin과 Neural cell adhesion molecule (N-CAM) 유전자 발현 양상을 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법 : 경직성 뇌성마비 환자 7명과 신경근육성 질환으로 확진을 받았거나 의심되는 환자 5명 그리고 대조군으로 정상인 환자 1명을 대상으로 정형외과적 수술 시에 근 생검을 실시하였다. 생검된 근육으로 조직병리학적 관찰을 하였으며 역전사 중합효소 연쇄반응과 Ubiquitin 및 N-CAM 단백질에 대한 조직화학염색을 시행하여 Ubiquitin 및 N-CAM 유전자 발현 정도를 관찰하였다.

결과 : 조직병리학적 소견에서는 경직도에 따른 질병특이적인 변화는 없었다. 뇌성마비 환자에서는 경직이 심한 환자에서 Ubiquitin 유전자 발현은 증가하였고 N-CAM 유전자 발현은 감소하는 양상을 보였다. 조직화학염색에서는 Ubiquitin 단백질에 대한 반응이 모든 환자들에서 음성이었으며 N-CAM 단백질은 유전성 운동 및 감각 신경병증 (hereditary motor sensory neuropathy) 환자 2명에서만 강한 양성을 보였다.

결론 : 본 연구에서 나타난 경직성 뇌성마비 환자에서 근육의 경직도에 따른 Ubiquitin 및 N-CAM 유전자 발현의 결과는 여러가지 기전이 복합적으로 작용하여 나타난 것으로 사료되었으며 향후 뇌성마비 환자의 분자생물학적 연구 및 치료에 적용되기 위해서는 유전자 전사 후 변화에 대한 관찰이 필요하리라 생각된다.

---

핵심되는 말 : 뇌성마비, 경직성, Ubiquitin, Neural cell adhesion molecule



경직성 뇌성마비 환자의 근육내 Ubiquitin 및  
Neural cell adhesion molecule 유전자 발현

<지도교수 한 수 봉>

연세대학교 대학원 의학과

정 성 훈

I. 서 론

뇌성마비(cerebral palsy)는 단일 질환이 아니라 임신 중 혹은 출생 후 뇌에 대한 단기간 내의 손상으로 발생하며, 운동 기능의 조절 장애를 유발하여 운동이나 자세 이상 등 공통적인 특징을 나타내는 상태를 지칭한다<sup>1</sup>. 이때 뇌의 병변은 영구적이고 비 진행성(nonprogressive)이며 더 이상의 활성적인 병변이 없어야 한다. 그러나 이로 인한 상하지의 변형은 성장하면서 점점 진행하고 변화한다. 뇌성마비의 생리학적인 유형에 따른 분류는 크게 경직형(spastic type), 이상운동형(dyskinetic type), 운동실조형(ataxic type), 혼합형(mixed type), 저긴장형(hypotonic type) 등이 있으며 이 중 경직형이 가장 많다. 경직성(spasticity)이란 근육을 수동적으로 늘일 때 근육의 신전 반사(stretch reflex)의 항진으로 인하여 근육의 긴장성이 증가되는 것이며 이러한 경직성은 심각한 근골격계의 기능적 장애를 유발시키지만 현재 경직성의 정확한 병리생리학적인 기전은 밝혀져 있지 않다<sup>1</sup>.

현재까지의 경직성 뇌성마비 관한 연구는 중추성 뇌병변이라는 관점 때문에 근본적인 신경학적인 면에서 많이 진행되어 왔다. 중추 신경

계에서의 병리현상은 현재까지의 연구에서 많이 밝혀진 반면, 이환된 근육자체의 조직병리학적 및 생화학적 관점에서의 연구 결과는 아직 미비한 실정이다. Castle<sup>2</sup> 등은 경직성 뇌성마비 환자에서의 근육에 대한 조직학적인 변화를 보고하였는데 약 반 수에서 조직학적 변화가 없거나 미미하게 나타났을 뿐 만 아니라 생김한 근육 부위 및 환자의 중증도(severity)에 따라 제 1형 근섬유(type I fiber)와 제 2형 근섬유(type II fiber)의 위축(atrophy) 및 비대(hypertrophy)가 다양하게 나타났다고 하였고 이렇게 일정하지 않고 다양한 조직학적 소견을 보이는 이유는 다양한 중증도 때문일 것 이라고 추측하였다. Booth<sup>3</sup> 등은 경직성 뇌성마비 환자들의 경직도를 임상적으로 측정하여 근육내의 교원질 양과의 상관관계를 조사하였는데 경직도가 심할수록 교원질 양이 많은 결과를 나타낸다고 보고하였고 Ito<sup>4</sup> 등은 비복근을 채취하여 분석한 결과 질병특이적인 이상소견은 없었으나 근섬유형 분포(fiber type distribution)에 있어서 제 1형 근섬유 우세(type-1 fiber predominancy)와 제 2B형 근섬유 결핍(type-2B fiber deficiency) 양상을 보였으며, 근섬유 크기의 변이성(variability) 특히 제 1형 근섬유의 변이성 증가는 나이가 많을수록, 중증도가 심할수록 증가하였다고 보고하였다. 이러한 일련의 연구에서 보고 되었듯이 경직성 뇌성마비 환자에서 근육자체의 조직병리학적인 변화는 매우 다양하게 나타나고 있다.

근육 자체의 분자생물학적 및 조직학적 관점에서의 연구도 아직 미비한 실정이다. Marbini<sup>5</sup> 등은 탈신경 표식자(denervation marker)로 neural cell adhesion molecule(N-CAM)을 이용한 면역조직화학적 연구를 진행하였는데 6세 미만의 어린 환자에서 특징적으로 N-CAM의 발현이 군화된 근섬유(grouped fibers)에서 일어나는 사실을 발견하고 이는 경직성 뇌성마비 환자에 있어서 운동신경 단위 재배치(motor unit remodeling) 가설을 지지하는 소견이라고 하였다. N-CAM은 대부분의 말초신경이나 중추신경의 표면에 있는 막성 당단백(membrane

glycoprotein)으로써 정상 성인 근세포에서는 발견되지 않으나 탈신경 시에 다시 나타나게 된다<sup>6</sup>. 최근 근 소모(muscle wasting)와 관련된 여러 가지 단백질 분해 세포기전이 신경 근육성 질환에서 연구가 되고 있는데 근육 내 Ubiquitin proteasome proteolytic system이 중요한 기전으로 알려져 있다<sup>7</sup>. Ubiquitin은 열충격 단백질(heat shock protein)의 일종으로 근육 세포 내에서 초기에는 비활성화 상태로 존재하다가 고정(immobilization), 탈신경(denervation), 근 무부하(muscle unloading)와 같은 불용성 상태(disuse condition), 노화과정(aging process), 기아(starvation), 다양한 종류의 악액질(cachexic states)등의 환경에서 활성화 되며<sup>8,9,10</sup>, Ubiquitin 단백질이 세포 내 단백질을 분해하기 위해서는 세 가지 군의 보조효소; E1(ubiquitin activating), E2(ubiquitin conjugating), E3(ubiquitin ligating)가 필요하다<sup>11</sup>.

정형외과적으로 신경근육성 질환 환자의 경직도는 매우 중요한 임상적 의미를 지니며 이와 관련된 장애로 수술을 시행하는 경우가 흔하다. 주로 하지 근육의 구축(contracture)으로 근건 이전술(tendon transfer)이나 근건 연장술(tendon lengthening)을 주로 시행하게 되는데 이때 근육의 탄력성 저하가 심할 경우에는 골절제술(Osteotomy)을 시행하기도 한다. 본 연구에서는 뇌성마비 환자의 경직도에 따른 조직병리학적 변화 및 Ubiquitin과 N-CAM 유전자 발현 양상을 관찰하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 연구 대상

경직성 뇌성마비 환자 7명, 신경근육성 질환으로 확진을 받았거나 의심되는 환자 5명, 그리고 대조군으로 정상인 환자 1명을 대상으로 수술 전 사전 동의 후 정형외과적 수술 시에 근 생검을 실시하였다. 경직도는 수술 전 신체 문진을 통해 측정되었는데, 이를 위해 modified Ashworth's scale(MAS)을 이용하여 1등급에서 4등급까지 나누었다. 경직성 뇌성마비 환자가 7명이었으며 유전성 운동 및 감각 신경병증(hereditary motor sensory neuropathy) 환자 2명, 원인 불명의 침묵 변형 환자 1명, 원인 불명의 보행 이상 환자 1명, 피부근염 환자 1명이었다. 모든 환자들은 정상보다 증가된 경직도를 보였으며 3명의 환자에서 1등급의 경직도를 보였고 나머지 환자들은 4등급이었다. 성별은 환자는 남자가 6명, 여자가 6명이었고 대조군은 남자로 하였다. 나이는 4세에서 21세까지 다양하였으며 평균 나이는 9.8세였고, 12명의 환자들은 모두 근육 경직으로 인한 관절 구축이 있는 환자들이었으며 근건 이전술과 근건 연장술을 받았다. 생검은 수술 부위에 따라서 장무지 외전근과 비복근에서 실시하였으며 대조군은 신경학적으로나 근골격계에 이상이 없는 환자로 다른 적응증으로 수술을 시행 받는 경우였다.

표 1. 환자 요약(summary of patients)

Pts. No.	Sex/Age	Diagnosis	Biopsy site	MAS <sup>1</sup>	Pathology
1	M/4	Normal control	Abductor hallucis longus	0	Normal
2	M/6	Dermatomyositis	Gastrocnemius	4	Normal
3	M/12	Unknown origin equinovarus deformity	Abductor hallucis longus	4	Normal
4	M/21	Unknown origin gait abnormality	Abductor hallucis longus	4	Type I predominancy
5	M/11	Hereditary motor sensory neuropathy	Abductor hallucis longus	4	Group atrophy consistent with neurogenic atrophy
6	M/11	Hereditary motor sensory neuropathy	Gastrocnemius	4	Group atrophy consistent with neurogenic atrophy
7	F/7	Cerebral palsy	Abductor hallucis longus	1	Normal
8	F/8	Cerebral palsy	Gastrocnemius	1	Normal
9	F/8	Cerebral palsy	Abductor hallucis longus	1	Normal
10	F/20	Cerebral palsy	Gastrocnemius	4	Normal
11	F/11	Cerebral palsy	Gastrocnemius	4	Normal
12	M/5	Cerebral palsy	Gastrocnemius	4	Normal
13	F/4	Cerebral palsy	Gastrocnemius	4	Type I predominancy

1. modified Ashworth's score

## 2. 조직학적 검사

### 가. Haematoxylin and Eosin 염색(H & E 염색)

생검한 근육조직을 액체질소(Liquid nitrogen, LN2)를 이용하여 동결한 뒤 통상적인 방법으로 동결절편을 제작하여 Harris Hematoxylin 용액에서 5분 반응 후 흐르는 물에 수세 하였고, eosin 용액에서 3분간 염색하여 70, 90, 100% ethanol로 탈수 후 봉입하여 전체적인 조직 변화를 광학현미경하에서 관찰 하였다.

### 나. 효소조직화학 염색(Enzyme Histochemistry)

동결절편 3장씩을 준비하여 알칼리성 전반응액(alaline preincubation 용액 pH9.4)에 반응시킬 절편을 고정액에 옮겨 실온에서 5분간 고정하고 Tris buffer에 1분간 수세하였다. 알칼리성 전반응액(pH9.4)에서

15분, 산성 전반응액(pH4.3, pH4.6)에서 30분간 반응시킨 후, Tris buffer에 1분간 2회 헹구고 반응액(incubation 용액)으로 37℃에서 1시간 반응시켰다. 1% calcium chloride 수용액에서 30초씩 3회 수세하고 2% cobalt chloiede 수용액에서 3분 반응하여 수세 후에 1.5% ammonium sulfide 수용액에서 3분간 반응 후에 흐르는 물에 수세 후, 70, 90, 100% ethanol로 탈수하고 봉입하였다.

#### 다. Gomori Trichrome 염색

1% potassium permanganate 수용액에서 1분간 산화 후에 수세 후 1% oxalic acid 수용액에 1분간 표백을 하고, 2% ferric ammonium sulfate 수용액에 1분간 감작하였다. ammoniacal silver용액에서 1분간 반응 시키고 10% formalin에 3분간 환원한 후, 0.2% gold chloride수용액에서 1-분간 조색을수행 하였다. 1% oxalic acid 수용액에 1분간 반응한 뒤 5% sodium thiosulfate 수용액에서 5분간 장착한 뒤 70, 90, 100% ethanol로 탈수하고 봉입하였으며 각 단계에서 증류수로 수세하였다.

#### 라. 면역조직화학 염색((Immunohistochemistry)

3% hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 조직 내 내인성 peroxidase를 불활성 시킨 후 blocking serum으로 실온에서 10분간 반응시켰다. Anti-Torpedo Dystrophin 일차항체, Ubiquitin 일차항체(DAKO, Denmark), N-CAM 일차 항체(Santa cruz, California, USA)로 37℃에서 2시간 반응시켰다. Avidin-biotin(Zymed Histo Plus kit, San Francisco, CA, USA)방법을 이용하여 면역조직화학염색을 수행하였으며 blocking serum에서 일차 항체 단계를 제외한 각 단계에서 PBS 용액으로 수세하였다. 3,3'-diaminobenzidine(DAB, Vector laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA)으로 발색하고 Mayer's hematoxilin으로 대조 염색을 수행한 후 70, 90, 100% 에틸알코올에서

탈수하고 봉입하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

### 3. 유전자 발현

#### 가. 근육 조직의 RNA 분리

RNA 분리는 Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, Canada)를 이용한 acid guanidium thiocyanate-phenol chloroform extraction 방법으로 시행하였다. 추출된 근육 중 1g을 분리하여 15ml conical tube에 옮긴 후 phosphated buffered saline(PBS, introgen, USA)으로 3회 세척하였다. 이후 Trizol<sup>®</sup> 1ml을 첨가한 후 2분간 상온에 방치한 다음, Homogenizer(Diax 100, Heidolph, Germany)를 사용하여 조직을 균일화 시켰다. 이후 2ml e-tube에 조직액을 옮긴 후 chloroform(Sigma, USA) 200 $\mu$ l/Trizol 용량을 조직액에 첨가시킨 후 15초간 vortexing시켰다. 상온에서 2분간 방치 시킨 후 원심분리기를 이용하여 14000rpm으로 15분간 원심분리 시행하였다. 원심 분리 후 상층액을 새로운 e-tube로 옮기고, Isopropanol(Sigma, USA)을 동일 부피로 첨가하고 15초간 vortexing 시킨 후 15분간 상온에 방치시켰다. 이후 다시 원심분리기를 이용하여 14000rpm으로 10분간 원심 분리하였고, 상층액을 버리고 75% DEPC(Diethyl Pyrocarbonate, Sigma, USA)-Ethanol 용액을 1ml 첨가 한 후 다시 7500rpm으로 5분간 원심분리 시켰다. 다시 상층액을 버리고 상온에서 5분간 방치시킨 후 충분히 건조 시켰고, 30 $\mu$ l DEPC용액을 첨가하여 추출된 RNA를 충분히 녹였다. 이후 1% Agarose gel(Sigma, USA)을 이용하여 추출된 RNA를 100Volt에서 약 10분간 전기영동 시켰다. 전기영동으로 28s 와 18s로 분리됨을 확인 하였고 두 subunit의 density 비가 1.5-2.0사이인 경우 RNA를 다음 실험에 사용하였으며 그 이하인 경우는 다시 추출 하였다.

#### 나. RNA 정량

추출된 RNA 1 $\mu$ l에 DEPC water를 첨가하여 50배 희석시킨 후

Spectrophotometry( $\lambda=260\text{nm}$ )로 흡광도를 측정하였다. 측정된 값으로 전체 RNA양을 측정하였고, DEPC water를 첨가하여 농도가  $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 가 되도록 하였다.

다. 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

(1) Clonal DNA(cDNA) 제작

AccuPower<sup>®</sup>-RT PreMix(Bioneer,Korea) Kit  $20\mu\text{l}$ 에 정량된 total RNA  $5\mu\text{g}$ 을 첨가하고 deoxyribonucleotide triphosphate(dNTP, Promega, USA)  $1\mu\text{l}$ 를 최종적으로 첨가한 후 Thermo Hybrid PCR reactor(USA)를 이용  $72^\circ\text{C}$ 에서 5분간 반응 시켰다.

(2) 역전사 중합효소 연쇄반응

AccuPower<sup>®</sup>-PCR premix tube(Bioneer, Korea)에 제작된 cDNA  $1\mu\text{l}$ 와 primer  $10\text{pmole}$ 를 넣고, 전체 부피가  $20\mu\text{l}$ 가 되도록 증류수를 첨가하였다. 각 유전자에 대해 사용된 primer는 참고 문헌과 Gene Bank를 이용하여 제작 되었으며 염기서열은 표 2와 같다. Ubiquitin의 경우  $94^\circ\text{C}$ 에서 1분 유지 후  $94^\circ\text{C}$  5초,  $54^\circ\text{C}$  5초와  $72^\circ\text{C}$  30초 조건으로 27 cycle을 시행 하였고  $72^\circ\text{C}$ 에서 2분간 안정시켰다. GAPDH의 경우 각각의 primer와 동일한 조건으로 수행하였다. 이후, 2% Agarose gel에 RT-PCR결과로 얻어진 cDNA  $3\mu\text{l}$ 를 well에 넣고 100 volt에서 약 15분간 전기영동 시켰다. DNA ladder를 함께 전기영동하여 Ubiquitin의 경우 120bp에서 유전자 발현을 확인하였고 GAPDH의 경우 226bp에서 유전자 발현을 확인하였다. 확인된 두 유전자 발현을 UV 디지털 카메라로 촬영 후 Image-pro<sup>®</sup> 프로그램을 이용하여 GAPDH 유전자의 발현을 기준으로 상대적인 발현 정도를 측정하여 비교하였다.



**표 2.** 역전사 중합효소 연쇄반응에 사용된 Ubiquitin, Neural cell adhesion molecule(N-CAM)과 GAPDH의 염기서열 (Primer of Ubiquitin, N-CAM and GAPDH)

Ubiquitin <sup>1</sup>	Forward	5'- GGG TGT CAG TAT CTT TAA CGG C - 3'
	Reverse	5'- CAG ACG GGC AAA GAT ACA CA - 3'
N-CAM <sup>2</sup>	Forward	5'- CGT AGA AAA CAT TGC ACA GA - 3'
	Reverse	5'- CTA TGA ACA TGC ACG CAT AC - 3'
GAPDH <sup>3</sup>	Forward	5'- GAA GGT GAA GGT CGG AGT - 3'
	Reverse	5'- GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC - 3'

<sup>1</sup> Ubiquitin은 전기영동 후 120bp에서 위치를 확인함

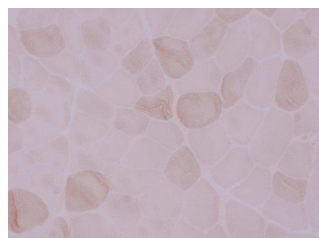
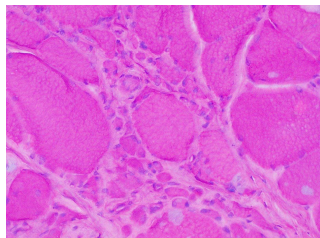
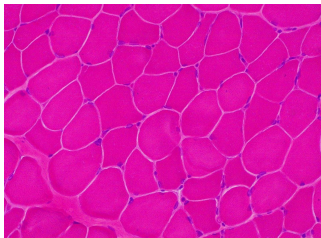
<sup>2</sup> N-CAM은 전기영동 후 140bp에서 위치를 확인함

<sup>3</sup> GAPDH는 전기영동 후 226bp에서 위치를 확인함

### Ⅲ. 결과

#### 1. 조직병리학적 소견

뇌성마비 환자 7명중 6명은 근육세포가 정상크기의 다각형 모양으로 구성되어 있었고 핵은 근섬유막하에 존재하며 효소조직화학염색(ATPase pH9.4, pH4.3, pH4.6, NAPH-TR)에서 제 1형 근섬유와 제 2형 근섬유가 정상비율로 구성되어 있었다. 근 섬유형 군화(fiber type grouping)나 근 섬유형 우세(fiber type predominancy), 특정 근섬유의 위축이나 비대가 없는 정상 조직소견을 보였으며 1명에서만 제 1형 근섬유 우세를 보였다. Dystrophin 면역 염색에서도 근 섬유막을 따라 정상적인 면역 활성도를 보였으며 utrophin 증가 반응도 없었다. 또한 미토콘드리아 근 질환을 관찰할 수 있는 Gomori trichrome 염색에서는 ragged red fiber나 nemaline 간체는 없었다. 유전성 운동 및 감각 신경병증 환자 2명에서는 신경원성 근 위축에 합당한 소견인 소집합 위축(small grouped atrophy)를 보였다. 원인 미상의 보행 이상 환자에서는 제 1형 근섬유형 우세 소견을 보였다.



(가)환자7(H&E염색)

(나)환자6(H&E염색)

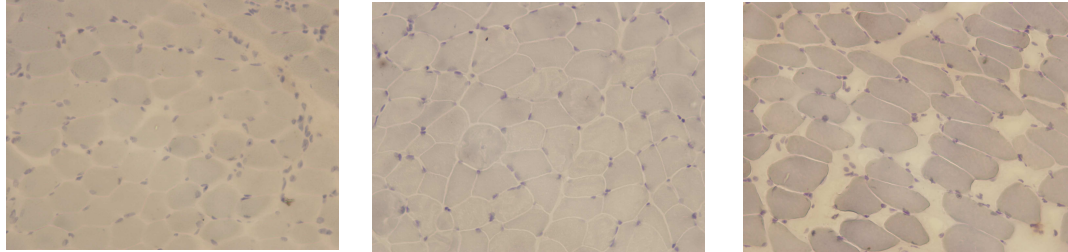
(다)환자13(ATPase pH9.4)

그림1. 조직병리학적 소견(X20). (가) 뇌성마비 환자인 환자7에서는 정상크기의 다각형 모양으로 구성되어 있는 근육세포와 근섬유막하에 존재하고 있는 정상 근육핵이 보인다. (나) 유전성 운동 및 감각 신경병증 환자인 환자6에서는 소집합 위축 소견이 보인다. (다) 뇌성마비 환자인 환자13에서는 효소화학염색에서 물계 염색되는 type I fiber가 우세한 소견을 보이고 있다.

## 2. 조직화학적 소견

### 가. Ubiquitin 단백질에 대한 조직화학염색 소견

모든 환자들에서 ubiquitin 단백질에 대한 염색이 음성반응을 보였다.



(가) 환자1(대조군)

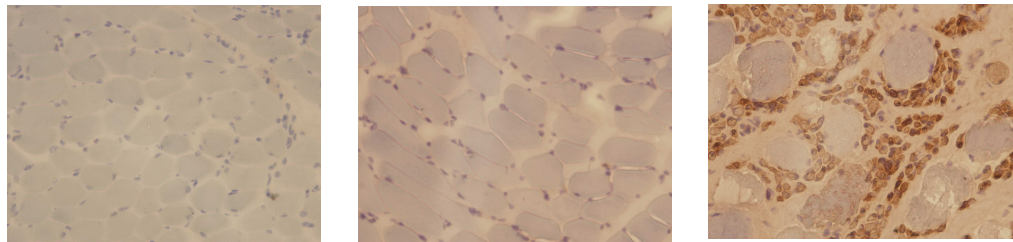
(나) 환자7(음성염색대조군)

(다) 환자13

그림2. Ubiquitin 단백질에 대한 조직화학적 염색 (x20). 환자1, 환자7, 환자13 모두에서 음성반응을 보여주고 있다.

### 나. Neural cell adhesion molecule 단백질에 대한 조직화학염색 소견

뇌성마비 환자에서는 염색이 되지 않았으며 강직도가 심했던 유전성 운동 및 감각 신경병증 환자 두 명에서 모두 위축된 근섬유의 세포질에서 강한 N-CAM 발현을 나타내었다.



(가) 환자1(대조군)

(나) 환자13

(다) 환자5

그림3. N-CAM 단백질에 대한 조직화학적 염색(x20). 유전성 운동 및 감각 신경병증 환자인 환자5에서 강한 양성 반응을 보이고 있다.

### 3. 유전자 발현

#### 가. Ubiquitin 유전자 발현

생검한 근육의 일부를 이용하여 전체 RNA를 적출한 후 역전사 중합효소 연쇄반응을 시행한 결과 뇌성마비 환자의 경우에 경직도가 낮았던 환자 7, 환자 8, 환자 9 에서는 Ubiquitin 유전자 발현이 대조군 보다 낮았으나 4등급의 경직도를 가진 환자들에게서는 Ubiquitin 유전자 발현이 대조군보다 증가하는 소견을 보였다. 유전성 운동 및 감각 신경병증 환자 2명 및 제 1형 근섬유형 우세를 보인 원인 불명의 보행 이상 환자에서는 정상 보다 높은 발현을 보였으나 피부근염 환자와 원인 불명의 침착 변형을 보인 환자에서는 정상인 대조군과 비슷하거나 적은 유전자 발현을 보였다.

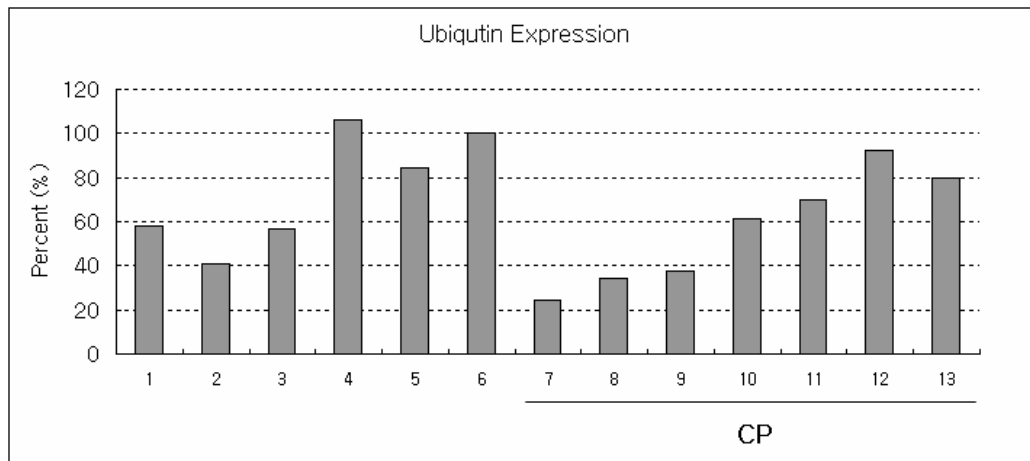
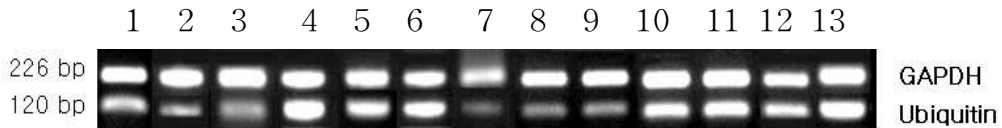


그림4. Ubiquitin 유전자 발현

1:normal control, 2:dermatomyositis, 3:unknown origin equinocavovarus, 4:unknown origin gait abnormality, 5,6:hereditary motor sensory neuropathy, 7,8,9,10,11,12,13:cerebral palsy

### 나. Neural cell adhesion molecule 유전자 발현

생검한 근육의 일부를 이용하여 전체 RNA를 적출한 후 역전사 중합효소 연쇄반응을 시행한 결과 뇌성마비 환자에서는 환자 12를 제외하고 모두 발현되었다. 특이할 만 한 것은 경직도가 낮았던 환자 7, 환자 8, 환자 9 그룹이 경직도가 높았던 환자 10, 환자 11, 환자 12, 환자 13 그룹보다 상대적으로 강한 발현을 보였다는 점이다.

피부근염 환자, 원인 미상의 침족 환자, 원인 미상의 보행 장애 환자 및 2명의 유전성 운동 및 감각 신경병증 환자에서는 모두 강한 발현을 보였다.

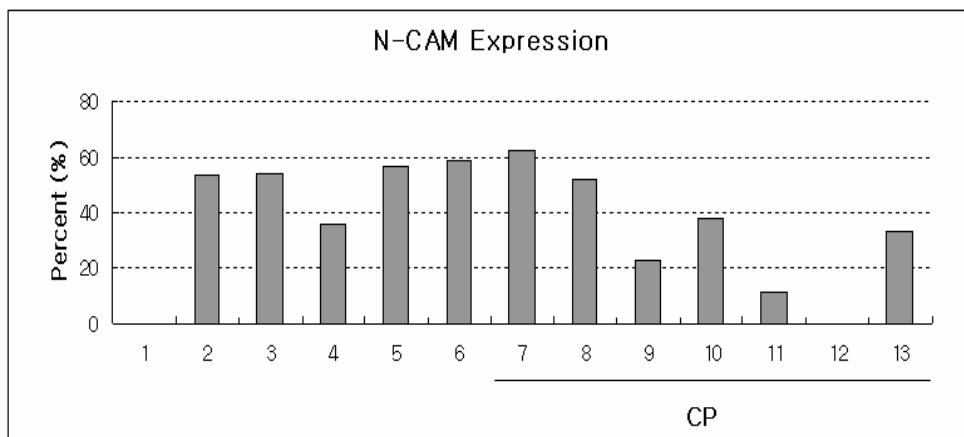
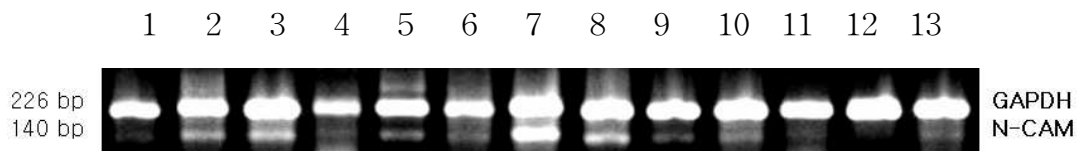


그림5. Neural cell adhesion molecule 유전자 발현

1:normal control, 2:dermatomyositis, 3:unknown origin equinovarus, 4:unknown origin gait abnormality, 5,6:hereditary motor sensory neuropathy, 7,8,9,10,11,12,13:cerebral palsy

#### IV. 고찰

일반적으로 정상 골격근은 잘 조화된 합성과 분해 과정을 통해 항상 근육의 안정성과 항상성을 유지하고 있다. 정상적인 생체 반응으로써 금식을 하게 되면 근육 단백질의 분해가 일어나 아미노산이 생성되며 간에서의 포도당신생(gluconeogenesis)에 쓰이게 된다. 이러한 외부 환경의 변화에 대한 생체의 유익한 반응이 있는 반면 신경이 단절되는 경우와 같은 병적인 환경에서는 생체의 정상적인 조절 범위를 벗어나게 되어 근 단백질 분해가 가속화되고 단백질 합성보다 분해가 더 많아져 근 소모가 일어나게 된다<sup>12,13</sup>. 또한 근 소모가 지속될 경우에는 비가역적 단계인 근 위축으로 진행하게 된다.

현재까지 알려진 단백질 분해 기전으로 세가지 주요한 기전이 있으며 이에는 cytosolic calcium-dependent calpain system, lysosomal protease system, ATP-dependent ubiquitin proteasome system 등을 포함한다<sup>14</sup>. 근 위축 과정에서 이들 세 가지 기전은 단독적으로 보다는 상호 보완적으로 작용한다. 특히 본 연구에서 살펴본 Ubiquitin 단백질 분해기전의 경우 여러 원인으로 발생하는 근 소모의 가장 중요한 기전으로 알려져 있다<sup>7</sup>. 또한 calcium-activated pathway와 lysosomal pathway는 근육 내 단백질 파괴의 약 15-20% 부분을 차지하고 근원섬유 단백질(myofibrillar protein)에는 작용하지 않는다고 알려져 있다<sup>14</sup>. 특히 lysosomal proteolysis는 주로 수용체(receptors)나 채널(channels), 수송체(transporters)와 같은 세포막 단백질(cell membrane proteins) 파괴에 관여한다고 알려져 있으며 혈장 지단백이나 호르몬과 같은 세포외 단백질도 lysosomal pathway에 의해 분해되어진다<sup>14</sup>. Ubiquitin에 의한 단백질 분해의 과정은 첫 단계로 E1 enzyme에 의한 ubiquitin 활성화(activation)에 의해 시작된다. 다음 단계로 ubiquitin은 E2 enzyme(ubiquitin conjugating enzyme)으로 운반되고 E2 enzyme은 다시 ubiquitin을 E3(ubiquitin ligation

enzyme)으로 운반시켜서 E3 enzyme이 ubiquitin을 기질 단백질 (substrate protein)과 결합시킨다<sup>15</sup>. 여기서 Ubiquitin 결합 반응이 반복되면 5개 이상의 Ubiquitin이 결합하게 되면서 multiubiquitin 사슬이 생성된다. 이러한 multiubiquitin 사슬-기질단백 결합체가 26S proteasome으로 운반되어 단백질 분해가 일어나게 되고 Ubiquitin은 분해 되지 않고 배출되어 재사용된다. 최근에는 E3(ubiquitin protein ligase)에 대한 관심이 고조되고 있는데 이는 E3가 ubiquitination에 관여하는 효소들 중에서 조직 및 기질(substrate) 특이성이 가장 높기 때문이다<sup>15</sup>. 특히 Bodine<sup>16</sup> 등은 근육에서 Mouse muscle atrophic F-box(MaFBX) 유전자와 Muscle RING finger 1(MuRF1) 유전자가 근육 내 Ubiquitin 활성화에 특이적인 역할을 하는 것을 증명하였다. 또한 신경차단, 고정, 및 현수(suspension)등 근 위축을 일으키는 여러 가지 조건에서 이 두 유전자 발현을 차단하여 근 위축을 감소시키는데 성공하여, Ubiquitin의 근 위축에 있어서의 중요한 역할을 재조명하였다. Ubiquitin 단백질 분해 기전은 기아상태(starvation), 패혈증(sepsis), 대사성 산증(metabolic acidosis), 무체중부하상태(weightlessness), 중증의 외상(severe trauma), 탈신경 근 위축(denervation atrophy), 동물 및 사람에서의 악성 악액질(cancer cachexia) 등 여러 가지 원인에서 발생하게 된다<sup>17,18,19,20</sup>. 이러한 일련의 보고들은 대부분 동물 실험 모델을 이용한 것이며 환자들을 대상으로 하여 Ubiquitin-dependent proteolytic pathway의 역할을 조명한 보고는 극소수에 불과한 편이다. Tiao<sup>21</sup> 등은 패혈증 환자에 있어서 근 단백질의 파괴 기전을 증명하기 위해 Ubiquitin 및 20S proteasome subunit HC3의 mRNA를 측정하였다. 정상 대조군 보다 패혈증 환자에게서 mRNA가 많이 발현됨을 증명함으로써 사람에게 있어서도 동물과 동일한 Ubiquitin에 의한 단백질 분해 기전에 의해 근 소모가 일어남을 보였다. Williams<sup>22</sup> 등도 비슷한 방법으로 암환자에 있어서 Ubiquitin 및 20S proteasome subunit HC3, HC5, HC7, HC9등

의 mRNA를 측정하여 근 소모의 주요한 기전으로 Ubiquitin proteasome proteolytic pathway를 증명하였다. 또한 두부 외상 환자에 있어서도 근 소모에서의 Ubiquitin proteolysis 중요성이 입증되었다<sup>23</sup>. Kumanoto<sup>24</sup> 등은 근이영양증 환자에 있어서 Ubiquitin 유전자 발현이 증가함을 보고하였으며 특히 괴사된 근섬유 및 재생 근섬유에서 잘 관찰된다고 하였다.

경직성 뇌성 마비 환자는 골격근의 비정상적인 긴장상태로 인한 근육 구축, 관절 변형 및 탈구 등 근, 골격계 이상으로 인해 정형외과적 수술이 적용되는 경우가 흔하다. 본 연구에서는 수술 전 신체 문진 및 수술 시에 근육 탄력성을 기준으로 하여 근육 경직도에 따라서 환자를 선택하여 근건 이전술 및 근건 연장술시에 근 생검을 시행하였다. 역전사 중합효소 연쇄반응에서 Ubiquitin 유전자 발현은 경직도 1등급이었던 환자 3명에서는 대조군보다 낮은 유전자 발현을 보였고 경직도 4등급이었던 환자들은 피부근염 환자와 원인 불명의 침착 변형을 보인 환자를 제외한 환자들에게서는 Ubiquitin 유전자 발현이 대조군 보다 높았다. 따라서 경직도와 Ubiquitin 유전자 발현과의 상관관계를 유추해 볼 수 있다. Castle<sup>2</sup> 등은 경직성 뇌성 마비환자에 있어서 근육의 조직학적 변화를 기술하면서 경직성 뇌성마비 환자는 지속적인 긴장성 근육 활성화로 제 1형 근섬유의 비대가 보여야 하나 오히려 위축을 보였는데 그에 대한 가설로 경직성의 관절 고정역할을 제시하였다. Booth<sup>3</sup> 등도 경직성이 골격근에 미치는 영향은 고정이나 탈신경, 건절제술이 골격근에 미치는 영향과 유사하다고 하였다. Ubiquitin은 고정, 탈신경, 근 무부하(muscle unloading)와 같은 불용성 상태(disuse condition)에서 활성화되는데 경직성이 이러한 불용성 상태를 유발했다고 유추 할 수 있다. 또한 경직성 뇌성마비에서 경직도가 심해질수록 지방조직이나 결합조직의 침착이 증가하는 소견을 보이고 중심성 핵(internal nuclei)의 출현 빈도가 증가하면서 근섬유 분열(fiber splitting), 근섬유의 직경이 일정하지 않고 다양하게



나타나는 등의 근 병변성(Myopathic) 조직변화가 보이는데 이러한 질환의 만성화가 근육의 구축을 심화시키면서 관절 고정상태를 유발시켰다고 생각할 수 있다<sup>2</sup>. 경직도가 1등급이었던 환자 7, 환자 8, 환자 9에서 대조군보다 더 낮은 Ubiquitin의 발현을 보였는데 이는 Ubiquitin이 아닌 다른 경로를 통한 근 소모가 더 활성화되었기 때문이라고 유추해 볼 수 있다. N-CAM 유전자 발현은 정상 대조군과 뇌성마비 환자 1명을 제외한 모든 환자에서 발현이 증가되었다. 특이할 만한 것은 뇌성마비 환자에서 경직도가 낮았던 환자 7, 환자 8, 환자 9 그룹이 경직도가 높았던 환자 10, 환자 11, 환자 12, 환자 13 그룹보다 상대적으로 강한 발현을 보였다는 점이다. N-CAM은 대부분의 말초신경이나 중추신경의 표면에 있는 막성 당단백으로써 태아 발생시에 관상근세포(myotube)의 표면에서 나타나지만 성장하면서 없어지게 되어 성인이 되면 완전히 사라지게 된다<sup>6</sup>. 그러나 성인 근육에 탈신경화가 일어나게 되면 다시 근육에 나타나게 되는데 여기서 N-CAM이 재신경지배에 중요한 역할을 한다<sup>6</sup>. N-CAM은 근섬유 사이의 간질조직에서도 나타나며 신경 종판이 있었던 자리에 집중적으로 분포함으로써 재신경이 지배될 자리를 유도한다고 알려져 있다<sup>6</sup>. 재신경지배가 완전히 끝나게 되면 N-CAM도 사라지게 된다. N-CAM은 정상적인 근육에는 없으며 다양한 신경근육성 질환에서 발현이 증가 되는 것으로 알려져 있는데 대표적 질환은 척수성 근육 위축증(spinal muscular atrophy), 다발성 근염(polymyositis), 진행성 근이영양증(progressive muscular dystrophy) 등이다<sup>25</sup>. 탈신경 및 재신경지배는 연속적이면서 서로 중복되는 과정으로 볼 수 있는데 이런 과정에서 N-CAM 유전자 발현이 가장 많이 나타나는 시점은 탈신경 과정과 재신경지배가 중복되는 기간이고 재신경지배가 진행되면서 서서히 N-CAM도 사라지게 된다. 뇌성마비 환자에서 N-CAM 발현 기전은 탈신경-재신경지배 시에 일어나는 기전과 일치하지는 않지만 비정상적인 상부 신경계통으로부터의 근세포 반응이라는 점에서 볼 때

경직성이 심한 경우를 탈신경-재신경지배 과정에서 N-CAM 유전자가 발현 되는 과정의 말기 과정으로 볼 수 있으며 여기서 뇌성마비 환자의 경직도와 N-CAM 유전자 발현 강도의 역 상관관계를 유추해 볼 수 있다. 또한 과도한 지속적인 긴장성 자극에 대한 근세포의 탈감작 및 탈진(exhaustion)으로 경직도가 심한 경우에는 N-CAM 유전자 발현이 감소했다고 유추할 수 있다. 한편, 면역화학 염색에서 Ubiquitin 단백질은 모든 환자에 있어서 염색이 되지 않았으며 N-CAM 단백질은 유전성 운동 및 감각 신경병증 환자 2예에서만 염색이 되었다. 이는 전사후 단백질 합성과정에서의 장애라고 유추해볼 수 있으며 이에 대한 추가적인 연구가 필요하리라 사료된다.

조직학적 변화는 경직성 뇌성마비 환자 7명중 1명이 제 1형 근섬유 우세를 보였으며 다른 환자에서는 정상 소견을 보였다. Castle<sup>2</sup> 등의 보고에서도 약 반수에서만 다양한 소견의 조직학적 변화가 보인다고 했다. 제 1형 근섬유형 우세는 뇌성마비 환자에서 흔히 보이는 조직학적 소견으로써 긴장성 근섬유(tonic muscle)인 제 1형 근섬유의 지속적인 활성화에 의한 소견으로 볼 수 있다. Seter<sup>26</sup> 등은 동물 실험에서 지속적인 고주파 자극(high frequency stimulation)에 의해서 제 2형 근섬유가 제 1형 근섬유로 변환 되는 것을 증명하였다. 따라서 경직성 뇌성마비 환자에서도 경직성으로 인한 지속적인 근육 활성화에 의해 유사한 과정이 생겼다고 추측해 볼 수 있다. Ito<sup>4</sup> 등은 경직성 뇌성마비 환자들의 근육 생검에서 질병 특이적인 이상소견은 없었으나 근섬유형 분포에 있어서 변화를 관찰하였는데 이전 연구결과와 유사한 제 1형 근섬유형 우세와 제 2B형 근섬유형 결핍 양상을 확인하였다. 그러나 이러한 변화는 1.5세 때 뇌허혈로 인한 경직성 편마비 환자에서는 보이지 않았으므로 상위 운동 피질이 척수 운동단위(spinal motor unit)에 어떠한 영향을 미쳐서 근섬유형 변화를 야기했다는 가설을 지지하고 뇌손상시의 연령이 중요한 의미를 지닌다고 하였다. 유전성 운동 및 감각 신경병증 환자 2명에서는 신경원성 근

위축에 합당한 소견인 소집합 위축(small grouped atrophy)를 보였다. 근육은 정상적으로 한 종류의 근섬유형끼리 모여 있지 않고 서양바둑판 모양으로 서로 다른 근섬유형이 섞여 있으나 비정상적인 경우에 한 종류의 근섬유형끼리 모여 있는 소견을 근섬유형 군화(fiber type grouping)라 부른다. 이 소견은 신경원성 근위축의 대표적인 조직학적 소견으로 탈신경 후 나타나는 신경 재지배에 의한 이차적인 변화로 생각로 생각된다. Booth<sup>3</sup> 등은 뇌성마비 환자에서 경직도에 따른 조직학적 변화를 보고하였는데 경직도가 높은 환자일수록 교원질의 양이 많으며 근섬유의 원형화와 섬유간 간격의 증가를 보인다고 하였다. 본 연구에서는 경직도에 따른 특이적인 변화를 보인 예는 없었다.

이상에서 본 바와 같이 본 연구에서도 다양한 결과의 조직학적인 소견과 Ubiquitin 및 N-CAM 유전자 발현을 보였다. 이는 여러 가지 요인들이 복합적으로 작용하여 뇌성마비 환자의 골격근에 영향을 미치기 때문이라고 유추할 수 있다. 가능한 변수로는 경직도, 보행가능 여부, 변형된 관절 및 근육에 대한 물리치료 기간 및 효율성, 일상생활의 활동성 등이 있을 수 있으며 이에 대한 추가적인 연구가 더 필요하다고 판단된다.

#### IV. 결 론

본 연구에서는 뇌성마비 환자의 경직도에 따른 조직병리학적 변화 및 Ubiquitin과 N-CAM 유전자 발현 양상을 관찰하고자 하였다. 경직이 심한 환자에서 Ubiquitin 유전자 발현은 증가하였고 N-CAM 유전자 발현은 감소하는 양상을 보였다. 이러한 소견은 향후 뇌성마비 환자에 있어서 분자생물학적 연구 및 치료에 적용이 될 수 있으리라 사료된다. 그러나 본 연구에서는 환자 수가 많지 않았고 생검 부위도 동일 부위가 아니었으며 유전자 발현이 면역화학염색에서의 결과와 일치하지 않았기 때문에 향후 추가적인 연구가 필요하리라 사료된다.

## V. 참고문헌

1. Mutch L, Alberman E, Hagberg B, Kodama K, and Perat MV. Cerebral palsy epidemiology; where are we now and where are we going? *Dev Med Child Neurol* 1992;34:547-551
2. Castle ME, Reyman TA, and Schneider M. Pathology of spastic muscle in cerebral palsy. *Clin Orthop* 1979;142:223-232
3. Booth CM, Cortina MJ, and Theologis TN. Collagen accumulation in muscles of children with cerebral palsy and correlation with severity of spasticity. *Dev Med Child Neurol* 2001;43:314-320.
4. Ito J, Araki A, Tanaka H, Tasaki T, Cho K, and Yamazaki R. Muscle histopathology in spastic cerebral palsy. *Brain Dev* 1996;18:299-303
5. Marbini A, Ferrari A, Cioni G, Bellanova MF, Fusco C, and Gemignani F. Immunohistochemical study of muscle biopsy in children with cerebral palsy. *Brain Dev* 2002;24(2):63-66
6. Covault J and Sanes JR. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) accumulates in denervated and paralyzed skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:4544-4548
7. Jagoe RT and Goldberg AL. What do we really know about the ubiquitin-proteosome pathway in muscle atrophy? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2001;4:183-190
8. Calore EE, Sesso A, Puga FR, Cavaliere MJ, Calore NMP, and Weg R. Early expression of Ubiquitin in myofibers of rats in organophosphate intoxication. *Ecotoxicol Environ Saf* 1999;43:187-194
9. Auclair D, Garrel DR, Chaouki ZA, and Ferland LH. Activation

- of the Ubiquitin pathway in rat skeletal muscle by catabolic doses of glucocorticoids. *Am J Physiol* 1997;272:C1007-16
10. Curtis JW, Joshua MVM, Dan DH, and Per-Olof H. Sepsis up regulate the gene expression of multiple ubiquitin ligases in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:298-705
  11. Mitch WE and Goldberg AL. Mechanisms of disease: Mechanisms of muscle wasting - The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *N Engl J Med* 1996;335(25):1897-1905
  12. Lecker SH, Solomon V, Mitch WE, and Goldberg AL. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Nutr* 1999;129:227S-237S
  13. Lecker SH, Thomas J, Alexander G, Marcelo G, Vickie B, James B, et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involves a common program of changes in gene expression. *FASEB J* 2004;18:39-51
  14. Jackman RW and Kandarin SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol* 2004;287:834-843.
  15. Mitch WE and Goldberg AL. Mechanisms of Disease: Mechanisms of Muscle Wasting - The Role of the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *N Engl J Med* 1996;335(25):1897-1905.
  16. Bodines SC, Esther L, Susanne B, Venus KML, Lorna N, Brian AC, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001;294:1704-1708
  17. Furuno K, Goodman MN, and Goldberg AL. Role of different proteolytic systems in the degradation of muscle proteins

- during denervation atrophy. *J Biol Chem* 1990;265:8550-8557
18. Llovera M, Garcia-Martinez C, Agell N, Marzabel M, Lopez-Sariano FJ, and Argiles JM. Ubiquitin gene expression is increased in skeletal muscle of tumor-bearing rats. *FEBS Lett* 1994;338:311-318
  19. Mitch WE, Medina R, Griebler S, May RC, England BK, Price SR, et al. Metabolic acidosis stimulates muscle protein degradation by activating the adenosine triphosphate-dependent pathway involving ubiquitin and proteasomes. *J Clin Invest* 1994;93:2127-2133
  20. Fang CH, Tiao G, James JH, Ogle CK, Fischer JE, and Hasselgren PO. Burn injury stimulates multiple proteolytic pathways in skeletal muscle, including the ubiquitin-energy-dependent pathway. *J Am Coll Surg* 1995;180:161-170
  21. Tiao G, Hobler S, Wang JJ, Meyer TA, Luchette FA, Fischer JE et al. Sepsis is associated with increased mRNAs of the Ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in human skeletal muscle. *J. Clin. Invest* 1997;99:163-168
  22. Williams A, Sun X, Fischer JE, and Hasselgren PO. The expression of genes in the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway is increased in skeletal muscle from patients with cancer. *Surgery* 1999;126(4):744-750.
  23. Mansoor O, Beaufriere B, Boirie Y, Ralliere C, Taillandier D, Aourousseau E, et al. Increased mRNA levels for components of the lysosomal, Ca-activated, and ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathways in skeletal muscle from head trauma patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2714-2718.

24. Kumamoto T, Fujimoto S, Ito T, Horinouchi H, Ueyama H, and Tsuda T. Proteasome expression in the skeletal muscles of patients with muscular dystrophy. *Acta Neuropathol* 2000;100(6):595-602.
25. Walsh FS, Moore SE, and Lake BD. Cell adhesion molecule N-CAM is expressed by denervated myofibres in Wernig-Hoffman and Kugelberg-Welander type spinal muscular atrophies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1987;50:439-442
26. Sreter FA, Pinker K, Jolesz F, and Mabuchi K. Fast to slow transformation of fast muscles in response to long-term phasic stimulation. *Exp Neurol* 1982;75:95-102

## **Abstract**

The expression of Ubiquitin and Neural cell adhesion molecule genes in the muscles of spastic cerebral palsy patients

Sung Hoon Jung

*Department of Medicine  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Soo Bong Han)

**Purpose :** This study was performed to see the histopathologic changes of muscles and the expression patterns of Ubiquitin and N-CAM genes in accordance with cerebral palsy patient's spasticity

**Materials and Methods :** We studied thirteen specimens from seven patients with spastic cerebral palsy, five patients who were diagnosed as or suspected to have neuromuscular diseases, and one normal person as a control group. Specimens were obtained during orthopaedic operations . We studied the histopathologic changes and the expression patterns of Ubiquitin and N-CAM genes through the routine histologic procedures, the reverse transcriptional polymerase chain reaction(RT-PCR), and immunostaining procedures.

**Results :** There were no disease-specific abnormalities related with the degree of spasticity on histopathologic evaluation. However, in the cerebral palsy patients, there seemed to be positive correlations between the expression of Ubiquitin gene and the degree of spasticity, and negative correlations between the expression of N-CAM gene and the degree of spasticity. On the other hand, in the immunostaining procedures, the reactions to Ubiquitin protein were all negative and reactions to N-CAM protein were strongly positive only in two hereditary motor sensory neuropathy patients.



Conclusions : This study shows that in the cerebral palsy patients, the degree of spasticity seems to have positive correlations with the expression of Ubiquitin gene and negative correlations with the expression of N-CAM gene. These results seem to be caused by multiple mechanisms. If more studies about the changes after the transcription of Ubiquitin and N-CAM genes are performed, these results can be applied to the research and treatment of cerebral palsy on molecular biologic aspects.

---

Key Words : cerebral palsy, spasticity, ubiquitin, Neural cell adhesion molecule