

흰쥐에서 척수 손상 후 후각망을 조직의
이식이 척수 재생에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의 학 과

임 길 병

흰쥐에서 척수 손상 후 후각망을 조직의
이식이 척수 재생에 미치는 영향

지도교수 박 경 아

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2002년 12월 일

연세대학교 대학원

의학과

임 길 병

임길병의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2002년 12월 일

감사의 글

이 논문이 완성되기까지 끊임없는 격려와 세심한 지도를 하여 주신 박경아 지도교수님께 진심으로 감사드리며, 바쁘신 일정에도 논문을 지도하여 주신 이원택 교수님, 윤도흠 교수님, 박은숙 교수님, 허지희 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

그리고 논문이 완성되기까지 세심한 배려를 해주신 이종은 교수님과 해부학교실원 여러분께 감사드립니다.

아울러 바쁜 일과에도 많은 배려를 해주신 일산백병원 나영무 교수님과 재활의학과 식구들에게도 고마운 마음을 전합니다.

또한 현재의 제가 있기까지 많은 사랑과 도움을 주신 연세의대 재활의학교실의 선생님들께도 깊은 감사를 드립니다.

오늘에 이르기까지 한결같은 사랑으로 이끌어 주신 부모님과 장인, 장모님의 은혜에 감사드리며 길고 힘든 과정을 무사히 마칠 수 있도록 곁에서 힘이 되어준 사랑하는 아내와 두 아들에게 고마운 마음을 전합니다.

끝으로 이 작은 결실이 의학발전에 조금이나마 도움이 되길 기원합니다.

저자 씀

차 례

국문요약 -----	iv
I. 서론 -----	1
II. 재료 및 방법 -----	3
1. 실험동물 -----	3
2. 척수 수술 방법 -----	3
3. 표본제작 -----	4
4. 면역조직화학염색 -----	4
5. 관찰 및 분석 -----	5
III. 결과 -----	6
1. 실험동물의 행동 관찰 소견 -----	6
2. 척수 절단 실험대조군 척수 조직의 현미경 관찰 소견 -----	7
3. 척수 절단 3주후 후각망울 이식군 척수 조직의 현미경 관찰 소견 --	8
4. 척수 절단 직후 후각망울 이식군 척수 조직의 현미경 관찰 소견 ---	13
5. Tyrosine hydroxylase 면역조직화학 소견 -----	16
IV. 고찰 -----	19
V. 결론 -----	22
참고문헌 -----	23
영문요약 -----	26

그 립 차 례

그림 1. 척수를 절단한 실험대조군의 척수 절단부의 H-E 염색 소견-----	7
그림 2. 척수 절단군의 H-E 염색 소견 -----	8
그림 3. 1차 수술로 척수를 완전 절단한 후 다시 2차 수술을 하여 후각망을 조직을 넣어준 실험군 동물의 H-E 염색 소견 -----	9
그림 4. 척수 절단 3주일 후 후각망을 조직을 이식한 실험군 동물의 H-E 염색 소견-----	10
그림 5. 척수 절단 3주일 후 후각망을 이식한 실험군 손상 근위부의 H-E 염색 소견 -----	11
그림 6. 척수 절단 3주일 후 후각망을 이식한 실험군의 손상 원위부의 H-E 염색소견-----	11
그림 7. 척수 절단 3주일 후 후각망을 이식한 실험군 원위부의 신경세사 단백질 면역조직화학 염색 소견 -----	12
그림 8. 척수 절단 3주일 후 후각망을 이식한 실험군 원위부 회색질의 H-E 염색 소견 -----	12
그림 9. 척수 절단 3주일 후 후각망을 이식한 실험군 원위부 백색질의 H-E 염색 소견-----	13
그림 10. 절단 직후 후각망 이식군 척수의 손상부와 손상 원위부의 H-E 염색 소견 -----	14
그림 11. 절단 직후 후각망 이식군 척수의 손상부와 손상 원위부의 H-E 염색 소견 -----	15
그림 12. 절단 직후 후각망 이식군 척수의 손상부와 손상 원위부의 신경세사 단백질 면역조직화학염색 소견 -----	15

그림 13. 정상대조군의 tyrosine hydroxylase 면역조직화학염색 소견 -----17

그림 14. 척수 절단 실험대조군의 tyrosine hydroxylase 면역조직화학염색
소견 -----17

그림 15. 절단 직후 후각망울 이식군의 손상 근위부 tyrosine hydroxylase 면역조
직화학염색 소견-----18

그림 16. 절단 3주일 후 후각망울 이식군의 손상 원위부 tyrosine hydroxylase 면
역조직화학염색 소견 -----18

국문요약

흰쥐에서 척수 손상 후 후각망을 조직의 이식이 척수 재생에 미치는 영향

흰쥐에서 척수를 완전하게 가로절단하여 손상시킨 후, 절단된 척수 사이를 유일하게 신경원이 재생되는 조직인 후각상피의 섬유다발이 들어가는 후각망을 조직을 삽입한 다음 기능의 회복이 일어난 실험동물의 척수에 어떠한 형태학적 변화가 오는지를 관찰하고자 본 실험을 시도하였다.

흰쥐의 척수를 완전하게 가로 절단하고 절단 직후와 3주일 후에 후각망을 조직을 삽입하였다. 형태학적 관찰을 하기 위해 H-E, Nissl 염색, 신경세사단백질, 아교섬유산성단백질 면역조직화학염색을 하였고, 실제로 신경의 재생이 일어나 척수 원위부로 자라나는지를 관찰하기 위해 norepinephrine 생합성의 속도제한 효소인 tyrosine hydroxylase를 항원으로 하는 면역조직화학방법을 이용 하행섬유가 손상 원위단으로 성장하는지를 관찰하고자 하였다.

후각망을 조직을 넣어준 척수손상 동물에서는 마비된 뒷다리에 운동이 일어나 회복된 양상이 일부에서 나타났으며, H-E 염색과 Nissl 염색에서는 손상된 부위가 크게 감소했고, 근위부와 원위부에 모두 정상적인 회색질의 전각신경세포가 나타났다. 백색질도 섬유다발로 이어졌으며, tyrosine hydroxylase 양성 신경원이 원위부 쪽으로 성장하는 현상을 관찰할 수 있었다.

핵심되는 말: 척수 손상, 가로절단, 신경세사단백질, tyrosine hydroxylase, 전각신경 세포

흰쥐에서 척수 손상 후 후각망을 조직의 이식이 척수 재생에 미치는 영향

<지도교수 박경아>

연세대학교 대학원 의학과

임길병

I. 서론

척수 손상은 인간의 활동성을 극도로 제한하는 심각한 질환으로 미국에서는 주요 외상 환자의 약 2.6%를 차지하고 있다.¹⁾ 그 원인의 첫 번째로는 교통사고가 차지하고 있어 우리나라와 같이 교통사고가 빈발하는 지역에서는 특히 중요한 연구의 대상이 되고 있다.

Ramon y Cajal이 재생이 가능한 말초신경계와는 달리 중추신경계는 거의 재생이 일어나지 않는다고 단정한 이후,²⁾ 최근까지도 중추신경계의 재생능력은 일부 성장 중의 동물에서만 일어나는 것으로 생각되었다.³⁾ 중추신경계에서도 신경섬유 손상 후 축삭의 성장은 일어나지만 중추신경계의 주변 환경이 재생 과정에 있어 적절한 환경이 아니기 때문에 더 이상의 회복은 일어나지 않는다고 알려져 있다.⁴⁾

그러나 최근 척수 손상 후 재생에 대한 연구 결과가 계속 발표되고 있고, 특히 재생을 촉진하는 조직 이식의 개발에 의해 척수손상을 극복할 수 있고 재생이 성공적으로 이루어질 수 있으리라는 낙관적인 추측이 나타나고 있다.^{5,6)} 성숙한 동물에서 척수 손상시 절단된 척수 사이를 여러 개의 늑간신경으로 이루어진 말초신경조직을 이식하고 산성섬유모세포 성장인자(acidic fibroblast growth factor)를 함유한 접착물질로 이어줘 기능적인 회복이 있었다는 보고가 있었으며,^{7,8)} 유일하게 신경원이 재생되는 조직인 후각상피의 섬유다발인 후각신경의 신경아교세포(olfactory ensheathing glia)를 절단된 척수 사이에 넣어 하행신경섬유의 재생이

일어나고 기능적으로 회복되었다는 보고도 있다.^{9,10)} 이러한 재생을 촉진하는 조직 중에서 말초신경조직이나 슈반세포는 얻기는 쉽지만 그 자체가 죽은 신경원의 재생에 영향을 어떻게 미치는지는 불확실하며, 인간 신경줄기세포는 다른 신경원으로 분화할 수 있는 세포이기는 하지만 얻기가 쉽지 않다는 단점이 있다.

후각신경의 신경아교세포는 유일하게 신경세포체 자체가 재생되는 후각상피 부위에 있는 신경아교세포로 손상 부위에서 사멸한 신경세포를 도와 재생이 가능할 수 있도록 해 줄 수 있다고 생각되고 있다.^{11,12,13)} 이 세포는 별아교세포와 슈반세포의 특징을 함께 갖고 있으며, 후각상피의 감각신경세포의 재생에 영향을 줄 뿐만 아니라, 다른 중추신경계 손상 부위에서 축삭의 재생을 촉진한다고 보고되고 있다.^{14,15,16)}

위와 같은 기존의 학설을 뛰어 넘는 척수 손상 재생 과정에 대한 기전과 분석은 아직 잘 이루어져 있지 않으며, 기존의 연구에서 척수 손상 후 후각신경조직의 투여는 아직 파일럿 연구 중인 주제로 세계적으로 연구하고 있는 연구집단이 거의 없다. 만약에 이러한 연구 결과가 성공적인 경우 우리나라에 빈발하는 교통사고로 인한 척수 손상으로 고통받는 수많은 환자에게 실질적으로 도움이 될 수 있다는 점에서 매우 흥미로운 연구분야이다.

본 연구에서는 흰쥐에서 척수를 완전하게 가로절단하여 손상시킨 후, 절단된 척수 사이를 유일하게 신경원이 재생되는 조직인 후각상피의 섬유다발이 들어가는 후각망울(olfactory bulb)의 신경아교세포를 삽입한 다음, 기능의 회복이 일어난 실험동물의 척수에 어떠한 형태학적 변화가 오는지를 관찰하고자 하였다. 또한 실제로 신경의 재생이 일어나 척수 원위부로 자라나는지를 관찰하기 위해 norepinephrine 생합성의 속도제한효소인 tyrosine hydroxylase를 항원으로 하는 면역조직화학방법을 이용 하행섬유가 손상 원위단으로 성장하는지를 관찰하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

Sprague-Dawley 계통의 성숙한 흰쥐(웅성, 250 - 350 g) 20 마리를 사용하였다. 실험군을 두 군으로 나누어 실험군은 척수 손상 후 젤폼(gelfoam[®])을 삽입한 다음 수술 3주일 후 다시 수술하여 후각망울의 조직을 삽입하였다. 대조군은 척수 손상 후 손상부위에 젤폼을 삽입한 후 수술 3주일 후에 다시 수술을 하였으나 후각망울의 조직은 삽입하지 않았다. 정상대조군은 추궁절제수술(laminectomy)만 하고 척수는 손상시키지 않는 수술(sham operation)을 하였다.

2. 척수 수술 방법

척수 손상 수술 동물은 실험동물을 에테르(ether)로 가볍게 마취한 후 다시 4% chloral hydrate를 복강 주사하여 완전히 마취한 상태에서, 등의 피부를 절개하고 척추를 노출시킨 후 추궁을 절제하여 T13 척수분절의 척수를 노출시켰다. 노출된 T13 척수분절은 수술도를 사용하여 가로로 완전히 절단하였다. 절단면은 겸자로 절단면의 양끝을 들어 확인한 후 절단면 사이에 생리식염수에 적신 젤폼을 삽입하였다.

후각망울 조직 삽입 수술은 일차 척수 손상 수술 3주 후에 실시하였다. 마취한 상태에서 이미 수술한 T13 척수분절을 노출시킨 다음 먼저 준비한 후각망울 조직을 절단면 사이에 삽입하고 지혈하기 위하여 젤폼을 덮었다. 척수 손상모델에 삽입할 후각망울은 척수 손상모델에 삽입하기 직전에 흰쥐를 희생시킨 후 두개골을 열어 적출한 후 4℃ 생리 식염수 하에서 적출하였다. 대조군은 후각망울 대신에 절단면 사이에 생리식염수에 적신 젤폼을 삽입하였다. 수술이 끝난 동물은 항생제를 주사하여 비뇨관의 감염을 방지하였고 배뇨기능이 정상으로 회복될 때까지 매일 두 차례 강제배뇨를 실시하였다.

최종적으로 분석에 들어간 실험동물은 정상대조군 5마리, 실험대조군 5마리, 척수절단 후 3주에 후각망울 조직을 이식한 동물 3마리, 척수절단 직후 이식한 실험군 3마리였다.

3. 표본제작

정상대조군과 척수를 절단하기만 한 실험대조군 흰쥐, 척수를 절단한 3주일 후 또는 직후에 후각망울 조직을 삽입한 실험군 흰쥐를 각각 에테르로 마취시킨 후 가슴을 절개하고 생리식염수 용액을 심장을 통해 관류하였다. 방혈이 끝난 후 다시 4% paraformaldehyde 용액으로 관류하여 조직을 고정한 다음 척수의 분절을 확인하고 T13부위의 척수 신경을 손상부위를 중심으로 1.5 cm 정도 되도록 척수를 적출하였다. 적출된 척수는 고정액에 24시간 동안 고정 후 탈수하여 파라핀으로 포매한 후 박절기를 사용하여 두께 5 μm 로 박절하여 표본을 제작하였다. 표본의 일부는 일반적인 Hematoxylin-Eosin (H-E) 염색과 Nissl 염색을 하였으며, 나머지는 anti-neurofilament protein, anti-GFAP, anti-tyrosine hydroxylase를 사용한 peroxidase-antiperoxidase (PAP)방법으로 면역조직화학염색을 하였다.

4. 면역조직화학염색

박절한 조직에서 파라핀을 제거(deparaffinization)한 후 phosphate buffered saline (PBS)으로 여러 번 수세하였다. 광학현미경하에서 관찰하기 위해서는 다음의 모든 용액에 0.02% triton-X 100을 함유시켜 세포내로 항체의 투과율을 높였다. 10% normal goat serum으로 처리하여 비특이성 항원의 반응을 막고, antirat rabbit tyrosine hydroxylase 항체 (Chemicon, Temecula, CA, USA)를 가한 후 실온에서 하룻밤 반응하였다. 반응이 끝난 표본을 PBS로 수세하고 antirabbit IgG (secondary antibody)로 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 PBS로 수세하였다. 여기에 HRP-conjugated antibody를 가하여 1 시간동안 실온에서 반응시킨 후

diaminobenzidine (DAB)으로 발색하여 표본을 제작하였다. 신경세사단백질 (neurofilament protein)에 대한 항체는 antirat rabbit neurofilament protein 항체 (InnoGenex, San Ramon, CA, USA)를 사용하여 tyrosine hydroxylase와 같은 방법으로 면역 조직 화학 염색을 실시하였다. 발색된 표본은 ethanol과 xylene을 이용한 통상의 탈수과정을 거쳐 탈수한 후 봉입 물질을 가한 후 덮개유리를 씌워 관찰할 수 있는 영구 표본을 제작하였다.

5. 관찰 및 분석

표본은 Olympus, Provis 또는 Vanox 광학현미경을 사용하여 관찰하고 사진을 촬영하였다.

III. 결 과

1. 실험동물의 행동 관찰 소견

척수를 손상시킨 실험군과 실험대조군의 동물은 척수 절단 수술 후 바로 척수 쇼크 상태에 들어가 근육이 완전히 마비되고 이완되었으며 반사(reflex)가 없었으나, 점차 시간이 지날수록 근육에 강직(spasticity)이 나타나고 반사도 정상으로 돌아왔으며 일부에서는 과도반사(hyperreflexia) 소견을 보였다. 이동시에는 뒷다리가 끌려서 이동하였으며 움직임은 전혀 없었다. 정상대조군의 동물에서는 마비가 나타나지 않았고, 근육의 긴장도나 반사 활성화에 이상이 없었다.

척수를 가로 절단한 실험대조군 동물의 대부분은 탈진한 상태로 지냈으며, 배뇨 반사도 없어져 하루에 두 번씩 배뇨를 위해 방광 위를 손으로 눌러 강제로 배뇨해 주었다. 상당수의 동물에서는 요로 감염이 나타났으며, 사망하는 경우도 많았다.

1차 수술 후 다시 2차 수술을 하여 후각망울(olfactory bulb) 조직을 넣어준 실험군의 동물 중 살아남은 일부 동물에서는 2차 수술 1주일 후부터 마비된 뒷다리가 약간씩 운동을 하는 것이 관찰되었으며, 손상된 다리를 물어뜯는 자가신체훼손(self mutilation) 현상도 보였다. 후각망울 조직을 넣지 않은 실험대조군의 동물에서는 마비된 뒷다리의 운동이 거의 나타나지 않았으며, 자가신체훼손 현상도 없었다. 수술과 동시에 후각망울 조직을 넣어준 실험군의 흰쥐에서도 뒷다리의 마비 현상이 척수를 완전히 가로 절단한 동물에 비해 심하지 않았으며 자가신체훼손 현상도 나타났다.

실험군과 실험대조군의 동물 모두, 희생시켜 최종적으로 척수를 적출할 때 완전히 분리시킨 척수가 거의 붙어있는 현상이 관찰되었다.

2. 척수완전 절단 실험대조군 척수 조직의 현미경 관찰 소견

척수를 완전 절단한 실험대조군의 경우 절단한 부분은 다른 부위보다 좁았으나 척수는 다시 이어져 있었고 젤폼은 한쪽으로 밀려져 있었다(그림 1). 절단한 부분을 중심으로 근위부는 약 3 mm 정도, 원위부는 10 mm 이상 신경세포체는 거의 없어지고 신경아교세포만 증식되어 있는 양상을 나타냈으며, 백색질의 신경섬유도 대부분 퇴행성 변화를 보였다(그림 2).

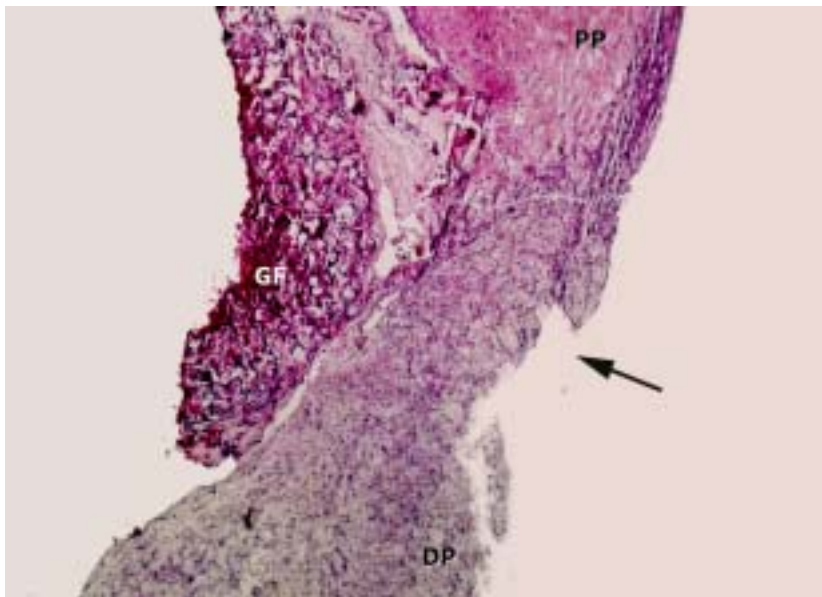


그림 1. 척수를 완전 절단한 실험대조군의 척수 절단부. 척수는 좁지만 다시 이어져 있었고 근위부 쪽에는 일부 정상적인 부분이 나타나고 있으나 원위부는 거의 증식된 신경아교세포로만 구성되어 있었다. DP: 원위부, PP: 근위부, 화살표: 절단부, GF: 젤폼. H-E 염색, x25.

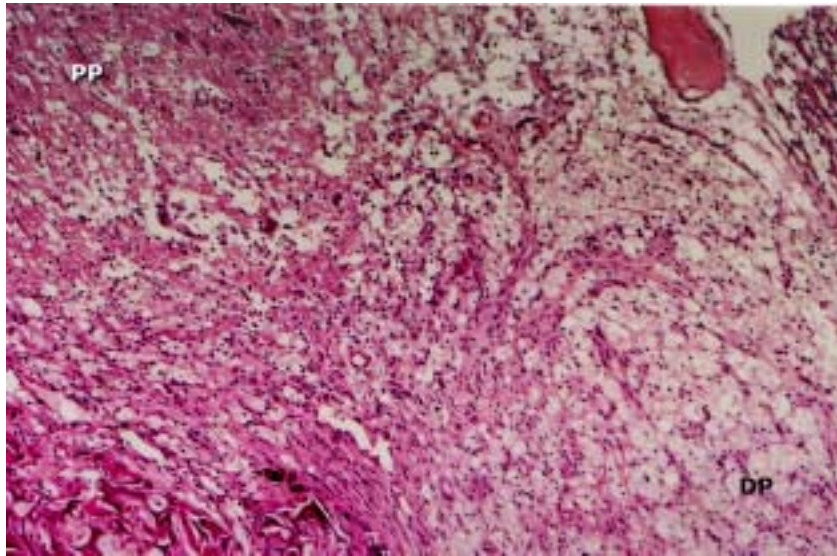


그림 2. 척수 완전 절단군의 H-E 염색 소견으로 신경세포체는 거의 관찰되지 않고 신경아교세포만 증식되어 있으며, 백색질 신경섬유의 퇴행성 변화가 관찰된다. DP: 원위부, PP: 근위부, x100

3. 척수절단 후 후각망울 이식군 척수 조직의 현미경 관찰 소견

1차 수술로 척수를 완전 절단한 후 3주 후에 다시 2차 수술을 하여 후각망울 (olfactory bulb)조직을 넣어준 실험군의 동물의 H-E 염색과 Nissl 염색에서, 척수를 손상시킨 부분은 이어져 있었고 동물에 따라서는 중앙 일부분만을 제외하고는 거의 연속된 형태로 나타나는 경우(그림 3)와 일부 백색질과 회색질이 이어진 경우(그림 4)도 있었다.

손상 근위부에서는 거의 정상적으로 회색질과 백색질이 구분되었으며, 회색질에는 전각 신경세포(anterior horn cell) 등 신경세포체의 형태도 대부분 정상적이었다. 백색질에는 퇴행성변화를 보이는 신경섬유들이 일부 관찰되었으며 이는 상행 신경섬유로 추정되었다. H-E 염색에서 퇴행성 변화를 보이는 구조에는 수초 부분에 파괴가 일어나 지방 방울(lipid droplet)이 형성되므로 염색이 안되는 불규칙한 형태의 공간이 나타난다.

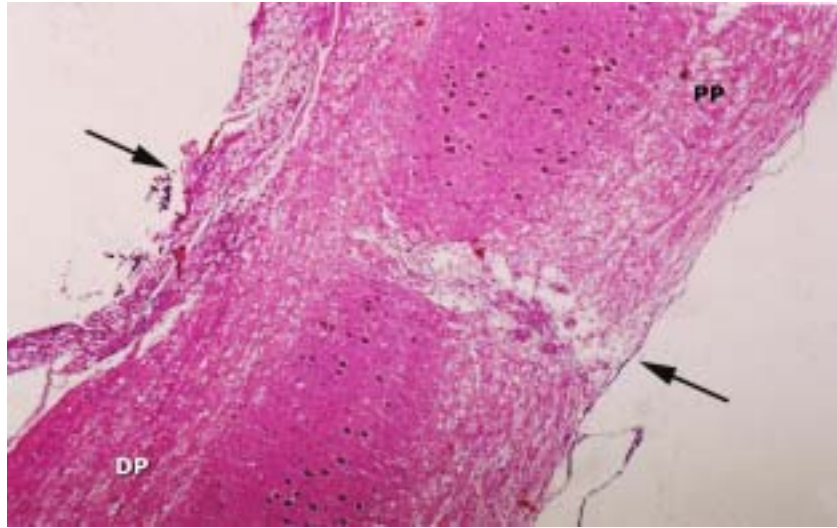


그림 3. 1차 수술로 척수를 완전 절단한 후 다시 2차 수술을 하여 후각 망울 조직을 넣어준 실험군 동물의 H-E 염색 소견. 척수를 손상시킨 부분이 일부분만을 제외하고는 거의 연속된 형태로 관찰된다. DP: 원위부, PP: 근위부, 화살표: 절단부. x25

손상 원위부에서도 손상 부위를 제외한 부분에서는 회색질-백색질이 잘 구별되었고 신경세포도 뚜렷하게 관찰되었다. 손상 부위에서 가까운 쪽 세포의 크기는 근위부나 원위부 아래쪽에 비해 작은 세포를 흔히 관찰할 수 있었고, 이 세포는 핵에 핵소체(nucleolus)가 뚜렷하고 Nissl 소체가 뚜렷하여 전각신경세포로 추측되었다(그림 5, 그림 6). 신경원의 표지 단백질인 신경세사 단백질(neurofilament protein)로 면역조직화학 염색한 결과 세포체와 돌기에 모두 뚜렷하게 염색되어 이 세포들이 신경세포라는 것을 확인할 수 있었다(그림 7). 다만 신경세사가 모여서 형성되는 신경원섬유(neurofibril)는 정상대조군에 비해 약간 불규칙적이고 성긴 배열을 하고 있었다. 원위부의 전각신경원은 Nissl 소체가 일반적인 전각신경원에 비해 더 짙게 나타났다. 원위부에서 아래쪽으로 내려 갈수록 정상적인 형태의 전각세포가 관찰되었고, 회색질과 백색질의 구분도 뚜렷하였다.

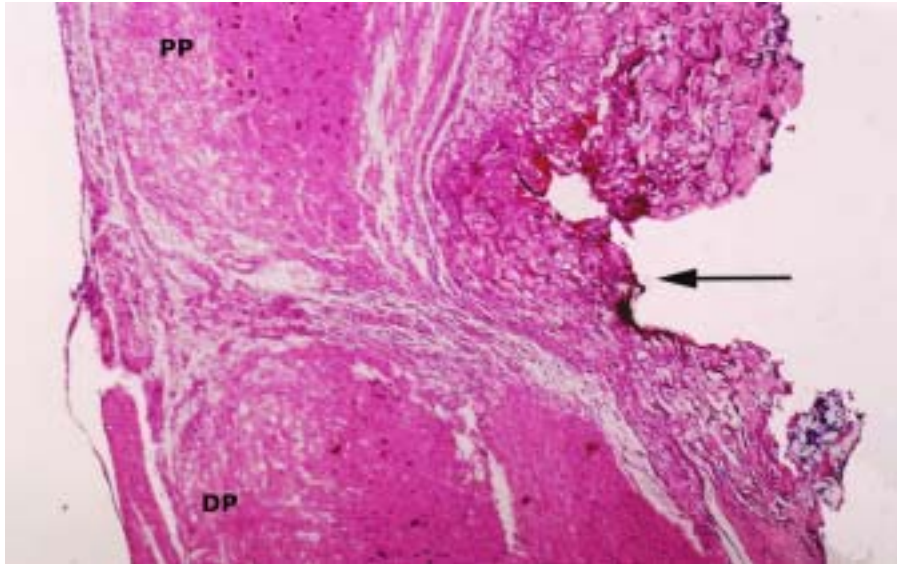


그림 4. 척수를 절단 3주일 후 후각망을 조직을 이식한 실험군 동물의 H-E 염색 소견. 척수를 손상시킨 부분은 외측 일부분을 제외하고는 거의 연속되었으나 회색질-백색질의 구별은 뚜렷하지 않다. 손상 부위 근위부와 원위부의 형태는 거의 정상과 유사한 형태를 보이고 있다. DP: 원위부, PP: 근위부, 화살표: 절단부. x25

척수 손상 원위부에서 회색질의 신경세포체의 형태는 근위부와 크게 다르지 않았으며, 핵, 핵소체, Nissl 소체 등 세포체 내의 구조는 거의 정상적이었다(그림 8). 그렇지만 백색질에는 수초 부분에 파괴가 일어나 지방 방울이 형성되어 염색이 안되는 공간이 나타나는 퇴행성변화를 보이는 신경섬유가 다수 관찰되었다(그림 9).

전체적으로도 손상원위부의 회색질 부분은 손상되거나 이상이 나타나는 구조들이 거의 없었던 반면, 백색질 부분에는 퇴행성 변화를 보이는 신경섬유들이 많이 관찰되었다.

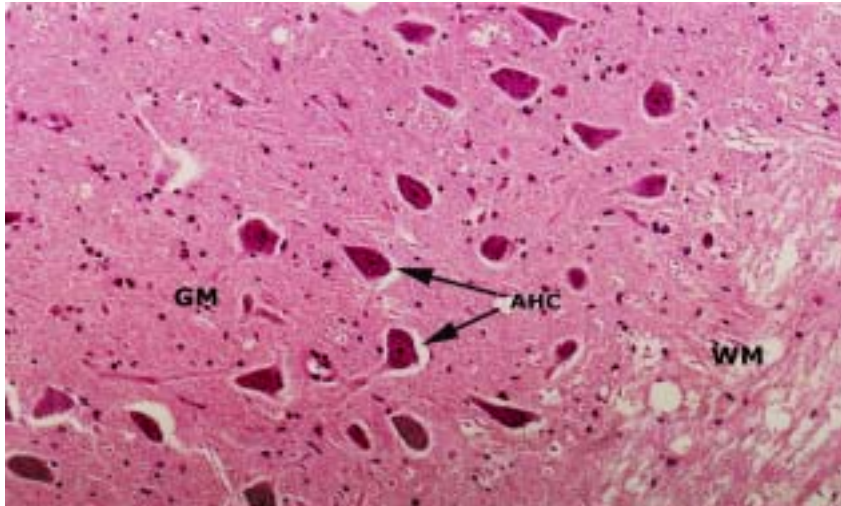


그림 5. 척수 손상 3주일 후 후각망울을 이식한 실험군 손상 근위부의 회색질에는 전각 신경세포 등 신경세포체의 형태가 대부분 정상적이었다. AHC: 전각신경세포(anterior horn cell), GM: 회색질(gray matter), WM: 백색질(white matter).

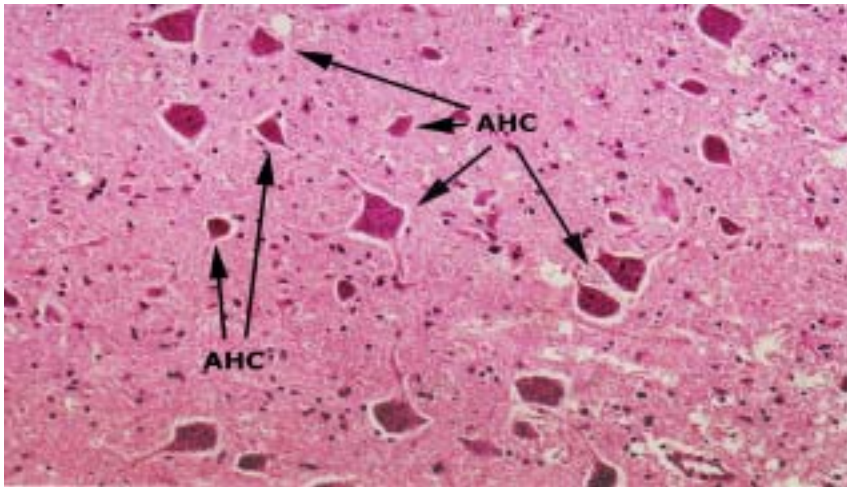


그림 6. 척수 손상 3주일 후 후각망울을 이식한 실험군의 손상 원위부에서는 핵에 핵소체가 뚜렷하고 Nissl 소체가 명확하게 관찰되는 신경세포가 흔히 관찰되었으며, 특히 크기가 작은 신경세포체가 많이 관찰되었다. AHC: 전각신경세포(anterior horn cell)GM: 회색질(gray matter)

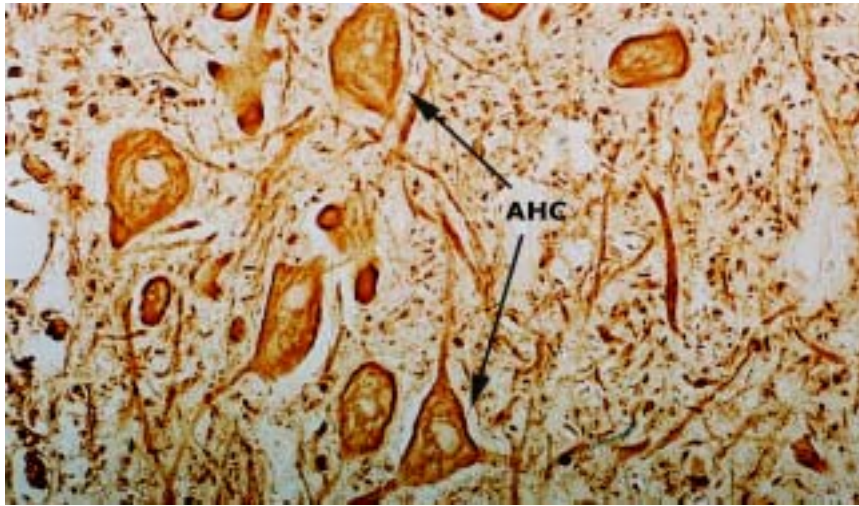


그림 7. 척수 손상 3주일 후 후각망울을 이식한 실험군 원위부의 신경세포사 단백질(neurofilament protein) 면역조직화학 염색 소견. 신경세포의 세포체와 돌기에 모두 뚜렷하게 염색되나 신경원섬유(neurofibril)는 정상 대조군에 비해 약간 불규칙적이고 성긴 배열을 하고 있다. AHC: 전각신경세포(anterior horn cell)

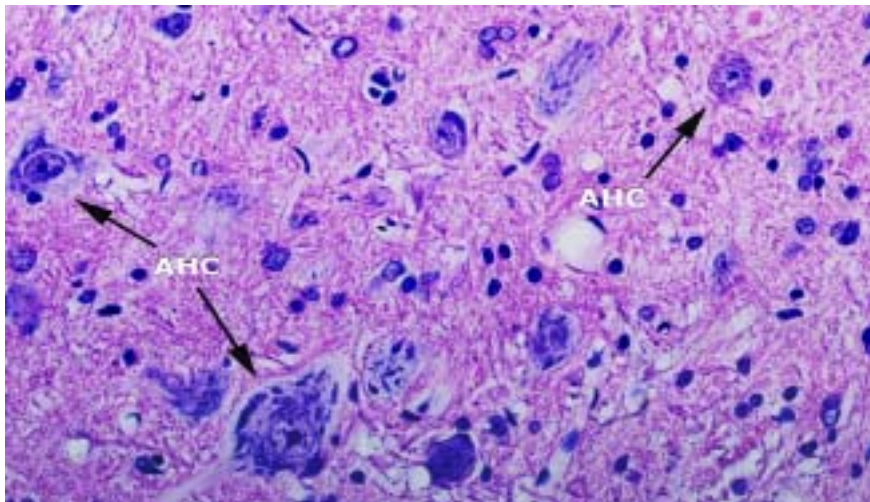


그림 8. 척수 손상 3주일 후 후각망울을 이식한 실험군 원위부 회색질의 H-E 염색 소견. 회색질의 구조는 거의 정상적인 형태를 보인다. AHC: 전각신경세포(anterior horn cell)

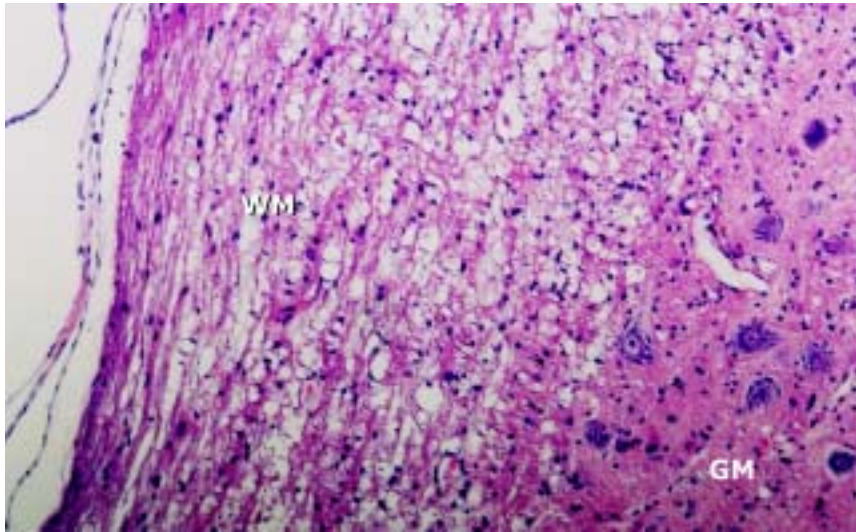


그림 9. 척수 손상 3주일 후 후각망울을 이식한 실험군 원위부 백색질의 H-E 염색 소견. 수초의 파괴가 일어나 지방 방울이 형성되어 염색되지 않는 공간이 나타나는 퇴행성 신경섬유가 다수 관찰되었다. GM: 회색질(gray matter), WM: 백색질(white matter).

4. 척수절단 직후 후각망울 이식군 척수 조직의 현미경 관찰 소견

척수 손상 직후 후각망울 조직을 넣어준 실험군의 동물에서도 척수를 손상시킨 부분은 일부 이어져 있었지만 중앙부에는 상당한 부분이 손상된 형태로 남아 있었다. 그렇지만 척수를 손상만 시킨 실험대조군에 비해서는 손상 부분이 좁고 바로 아래쪽에 정상에 가까운 형태의 척수가 나타났다(그림 10, 그림 11). 손상된 부분에는 신경세포는 찾아볼 수 없었고 신경아교세포들만이 관찰되었다.

손상된 부분 바로 아래쪽의 원위부에는 신경세포들이 많이 나타났으며 작은 세포들이 많기는 하였으나 대부분 핵소체가 뚜렷하고 Nissl 소체가 명확한 전각신경 세포로 관찰되었다(그림 11).

척수 손상 3주일 후 후각망울 이식군의 척수와 같이 척수 손상 직후 후각망울

이식군에서도 회색질에 비해 백색질에 퇴행성 변화가 뚜렷하였다. 신경세사단백질 면역화학염색에서도 백색질에는 신경원섬유가 뭉쳐 퇴행성 변화를 보이는 구조가 많이 나타나는 반면 회색질의 형태는 정상에 가까웠다(그림 12).

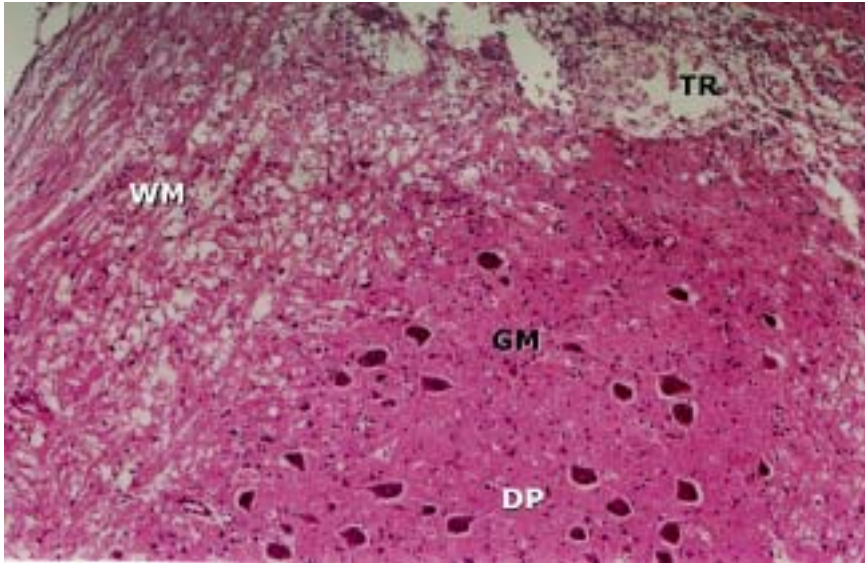


그림 10. 손상 직후 후각망울 이식군 척수의 손상부와 손상 원위부의 H-E 염색 소견. 손상부와 손상 원위부가 뚜렷하게 구분되고 손상 원위부에서는 신경세포가 다수 관찰된다. TR: 척수절단부(transection region), DP: 원위부(distal portion), GM: 회색질(gray matter), WM: 백색질(white matter).

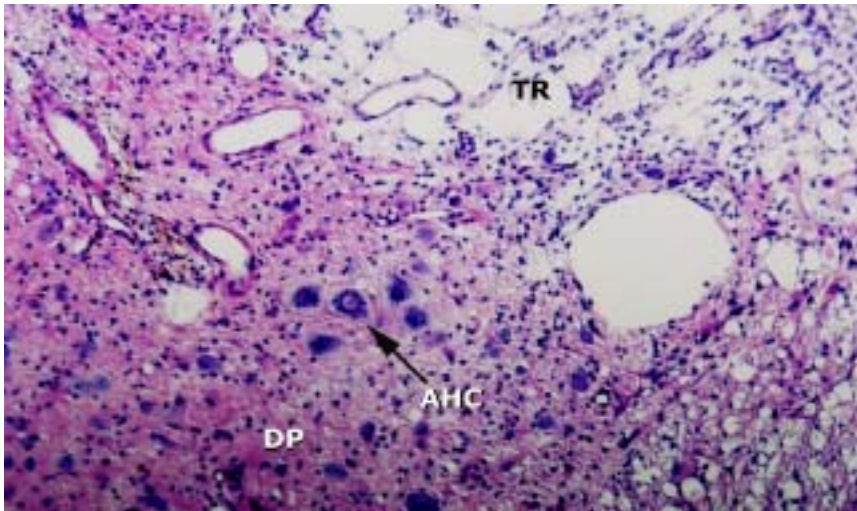


그림 11. 손상 직후 후각망울 이식군 척수의 손상부와 손상 원위부의 H-E 염색 소견. 손상부에는 신경세포가 없고 빈 공간이 많이 관찰된다. 손상 원위부에서는 핵소체가 뚜렷하고 핵이 진염색질형이며 Nissl 소체가 명확한 신경세포가 관찰된다. TR: 척수절단부(transection region), DP: 원위부(distal portion), AHC: 전각신경원(anterior horn cell).

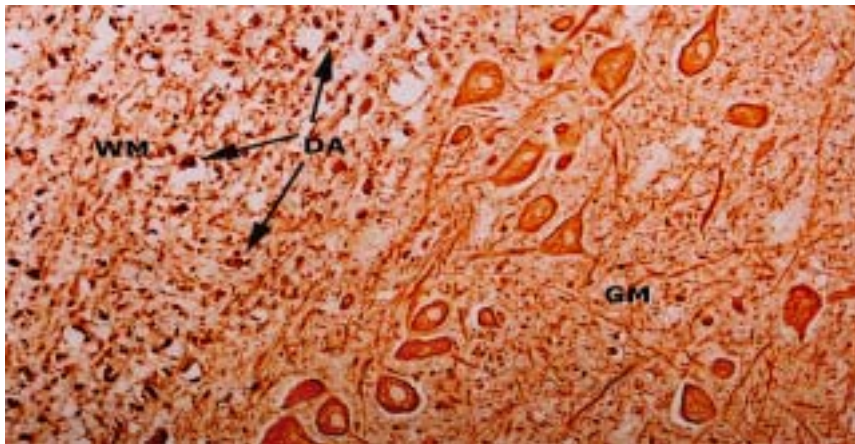


그림 12. 손상 직후 후각망울 이식군 척수의 손상부와 손상 원위부의 신경세사단백질(neurofilament protein) 면역조직화학염색 소견. 백색질에는 신경원섬유가 뭉쳐 퇴행성 변화를 보이는 구조가 많이 관찰되는 반면 회색질에는 이러한 퇴행성 변화가 거의 나타나지 않는다. DA: 퇴행성 축삭(degenerating axon), GM: 회색질(gray matter), WM: 백색질(white matter).

5. Tyrosine hydroxylase 면역조직화학 소견

Norepinephrine 생합성의 속도제한효소인 tyrosine hydroxylase는 척수 신경원에서는 발견되지 않고 청색반점핵(nucleus locus ceruleus)를 비롯한 뇌간의 A 세포군에서 집단으로 발견된다. 이들을 항원으로 하는 면역조직화학방법으로 염색한 결과 정상대조군에서는 외측섬유단(lateral funiculus)의 뒤쪽으로 하행하는 신경섬유의 집단으로 관찰되었다(그림 13). Tyrosine hydroxylase 양성 신경섬유는 완전히 연속된 선 형태의 구조가 아니라 구슬이 연결되어 있는 듯한 형태로 나타난다.

척수를 절단한 실험대조군의 손상 원위부에서는 이 효소에 활성을 보이는 섬유다발이 나타나지 않았고, 근위부에서도 신경세포가 없는 부분에는 거의 나타나지 않았다(그림 14). 척수를 손상시킨 3주일 후, 또는 직후 후각망울을 이식한 동물에서는 손상 근위부에 tyrosine hydroxylase 양성 신경섬유가 뚜렷하였고(그림 15), 손상 원위부에서도 이 효소에 활성을 보이는 신경섬유가 나타나기는 하였지만 그 형태는 정상대조군의 경우와는 달리 구슬이 연결되어 있는 모양을 뚜렷하게 이루지 못하고 점들이 흩어져 있는 형태로 나타나는 경우가 많았다(그림 16).



그림 13. 정상대조군의 tyrosine hydroxylase 면역조직화학염색 소견. 신경섬유는 구슬이 연결되어 있는 듯한 형태로 나타난다. TH: Tyrosine hydroxylase 양성신경섬유

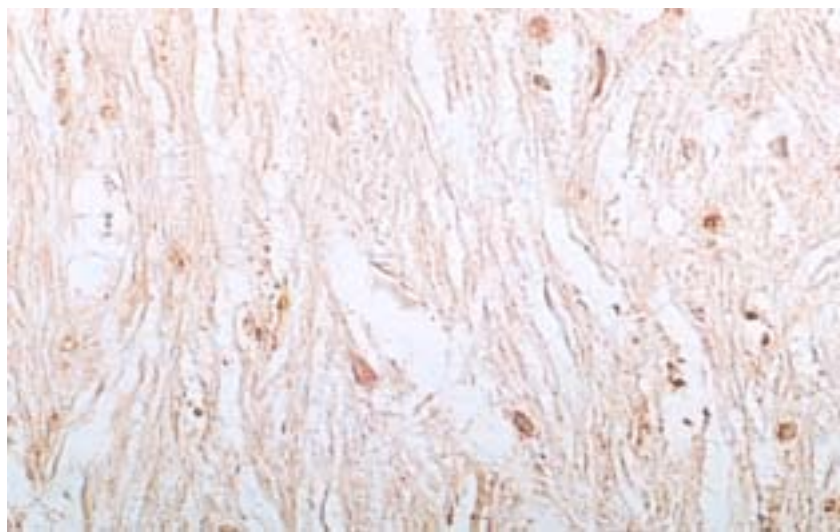


그림 14. 척수가 절단된 실험대조군의 tyrosine hydroxylase 면역조직화학염색 소견으로 양성 신경섬유가 관찰되지 않는다.



그림 15. 손상 직후 후각망울 이식군의 손상 근위부 tyrosine hydroxylase 면역조직화학염색 소견으로 양성 신경섬유가 뚜렷하게 나타난다. TH: Tyrosine hydroxylase 양성신경섬유

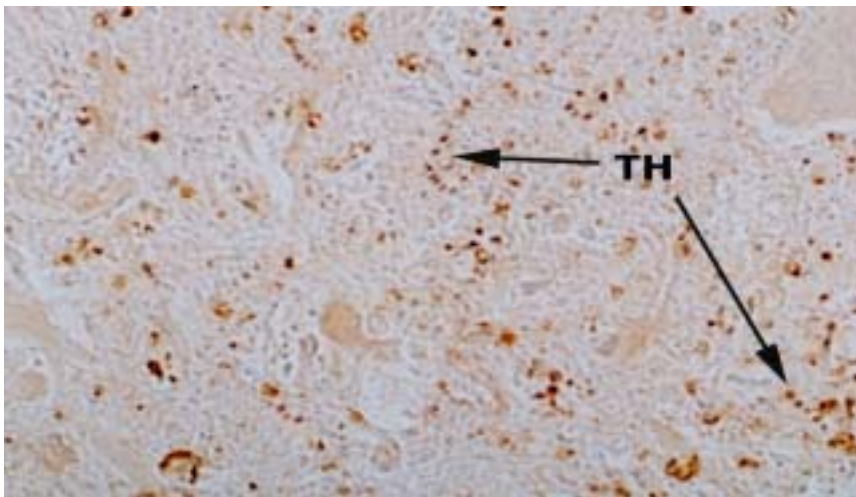


그림 16. 손상 3주일 후 후각망울 이식군의 손상 원위부 tyrosine hydroxylase 면역조직화학염색 소견으로 양성 신경섬유는 구슬이 연결되어 있는 모양을 뚜렷하게 이루지 못하고 점들이 흩어져 있는 형태로 나타난다. TH: Tyrosine hydroxylase 양성신경섬유.

IV. 고 찰

손상된 척수를 재생시키기 위해 수많은 시도가 있어 왔다.⁹⁾ 1980년대 초 David 와 Aguayo 가 말초신경 조직을 손상된 중추신경계에 이식한 후 일부 신경섬유가 재생되어 자라 나오는 것을 관찰하였다.¹⁷⁾ 이는 중추신경계 주위의 환경이 손상된 축삭의 성장에 좋지 않은 영향을 미친다는 것을 의미한다.¹⁸⁾

Schnell 등¹⁹⁾과 Bregman 등²⁰⁾은 중추신경계에서 축삭의 재생을 막는 신경돌기성 장억제단백질(neurite growth inhibitory protein)에 대한 항체를 손상된 척수에 처리하여 축삭이 성장하고 증상이 호전된다고 보고했다. Oudega와 Hagg는 중추신경계에는 결핍되어 있는 신경성장인자가 손상된 척수 축삭의 성장을 촉진한다는 결과를 발표했으며,²¹⁾ Tuszynski 등은 유전자 조작을 통해 신경성장인자(nerve growth factor)를 생산하는 섬유모세포를 만들고 이를 척수에 이식하여 신경돌기가 성장하는 것을 관찰했다.²²⁾ Ye 등 역시 여러 신경영양인자들(neurotrophic factors)이 손상된 척수의 재생을 촉진한다는 보고를 했다.²³⁾ Kalderon과 Fuks는 손상된 척수 부위에 X선을 조사하여 재생을 억제하는 물질을 내는 세포를 제거함으로써 손상된 척수 부위의 재생을 촉진할 수 있다는 결과를 발표하였다.²⁴⁾ Guest 등은 말초신경계의 슈반세포를 손상된 척수에 이식하였고,²⁵⁾ Menei 등은 유전자 조작을 통해 뇌기원신경영양인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)를 생산하는 슈반세포를 손상 부위에 이식하였으며,²⁶⁾ Xu 등은 슈반세포로 이루어진 이식 조직을 사용하여 손상 원위부로 축삭이 자라나는 것을 관찰하였다.^{4,27)}

그렇지만 이들은 축삭이 자라나는 결과만을 관찰했을 뿐 뚜렷한 기능의 회복을 관찰한 것은 아니었다. Cheng 등은 성숙한 동물에서 척수 손상시 절단된 척수 사이를 여러 개의 늑간신경 말초신경조직을 이식하고 산성섬유모세포성장인자(acidic fibroblast growth factor)를 함유한 접착물질로 이어줘 기능적인 회복이 있었다는 보고를 하였고,⁷⁾ Olson 등도 이를 확인하였다.⁸⁾ 또한 Ramon-Cueto 등은 유일하게 신경원이 재생되는 조직인 후각상피의 섬유다발인 후각망울의 신경아교

세포(olfactory bulb ensheathing glia)를 절단된 척수 사이에 넣어 하행신경섬유의 재생이 일어나고 기능적으로 회복되었다는 보고를 하였다.^{9,10)}

본 실험에서도 후각망을 조각을 완전히 가로절단된 척수에 이식하여 기능적인 회복을 관찰할 수 있었다. 또한 tyrosine hydroxylase로 표지된 하행 norepinephrine 경로의 재생도 관찰할 수 있었다. 또한 손상 부위의 회색질에 있는 척수 전각신경세포의 회복에도 큰 영향을 주는 것으로 관찰되었다.

후각상피의 감각신경세포는 유일하게 신경세포체 자체가 재생이 되고 축삭이 성장하여 후각망울로 들어가 이곳의 신경원과 기능적인 시냅스를 형성할 수 있는 유일한 신경세포이다.^{11,12)} 후각신경의 신경아교세포인 후각주위아교세포(olfactory ensheathing glia)는 후각상피와 후각망울 부위에 있는 신경아교세포로 손상 부위에서 사멸한 신경세포를 도와 재생이 가능할 수 있도록 해줄 수 있다고 생각되고 있어 신경 재생 연구에 사용되고 있다.^{15,28)} 이 세포는 별아교세포와 슈반세포의 특징을 함께 갖고 있으며,^{14,29)} 후각상피의 감각신경세포의 재생에만 영향을 줄 뿐만 아니라 다른 중추신경계 손상 부위에서 축삭의 재생을 촉진한다고 보고되고 있다.^{14,15,16)} 이 세포는 신경성장인자, 뇌기원신경영양인자(BDNF), 아교세포계열기원신경영양인자(glia cell line-derived neurotrophic factor) 등 여러 성장인자를 분비한다.³⁰⁾ 또한 이 세포의 유전자를 주위의 세포로 이동시킬 수 있는 능력이 있다는 보고도 있다.³¹⁾

후각주위아교세포는 주로 손상된 신경원의 축삭을 재생시키는 세포로 연구되고 있지만,^{14,15,16,28)} 후각상피의 감각신경세포가 사멸한 후 기저세포가 감각신경세포로 분화하는 것을 도와주는 역할도 하므로,^{11,12)} 전각신경원을 보호하고 사멸한 전각세포 대신 주위의 세포가 전각신경세포로 분화할 가능성도 있다. 후각망울의 신경세포가 전각신경세포로 분화할 가능성을 배제할 수는 없지만, 실제 조직을 넣어준 부분에서는 전각신경세포가 관찰되지 않았고, 신경세포의 형태가 후각망울의 승모세포(mitral cell)와는 전혀 다른 형태의 세포인 것으로 보아 후각망울의 신경세포는 아닌 것으로 추정되었다.

척수를 손상시킨 실험대조군에 비해 후각망울 조직을 이식한 동물에서 재생과정은 매우 뚜렷한 차이를 보였으나, 척수 손상 3주일 후 후각망울 이식군에 비해서는 척수 손상 직후 후각망울 조직을 이식한 경우 오히려 재생이 상대적으로는 잘 일어나지 않는 소견을 보였다. 이는 바로 후각망울을 이식한 경우에 염증이나 혈관의 파괴로 인한 혈액 공급의 부족 등에 그 원인이 있을 것으로 추측되었다.

또한 후각망울 이식군에서 tyrosine hydroxylase 양성 신경섬유가 손상 원위부로 자라는 현상이 확인되었으나 그 형태는 완전하지 못했다. 그 이유는 전체 재생기간이 다른 연구에 비해⁹⁾ 짧아 완전한 회복을 보이지는 못한 것으로 생각된다.

최근 재생을 촉진하는 조직 이식의 개발에 의해 척수손상을 극복할 수 있고 재생이 성공적으로 이루어질 수 있으리라는 낙관적인 추측이 나타나고 있으며,^{5,6)} 본 실험에서도 이러한 낙관적인 전망을 보강해주는 결과를 얻었다. 특히 재생을 촉진하는 후각망울 조직의 이식에 대한 생화학적, 신경학적 연구가 계속되어 이의 기전이 앞으로 더 밝혀져야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 흰쥐에서 척수를 완전하게 가로절단하여 손상시킨 후, 절단된 척수 사이를 유일하게 신경원이 재생되는 조직인 후각상피의 섬유다발이 들어가는 후각망울 조직을 이식하여 이어준 다음 기능의 회복이 일어난 실험동물의 척수에 어떠한 형태학적 변화가 오는지를 관찰하였다.

후각망울 조직을 넣어준 척수손상 동물에서는 마비된 뒷다리에 운동이 일어나 회복된 양상이 일부에서 나타났으며, H-E 염색과 Nissl 염색에서는 손상된 부위가 크게 감소했고, 근위부와 원위부에 모두 정상적인 회색질의 전각신경세포가 나타났다. 백색질도 섬유다발로 이어졌으며, tyrosine hydroxylase 양성 신경원이 원위부 쪽으로 성장하는 현상을 관찰할 수 있었다.

참고문헌

- 1) Burney RE, Maio RF, Maynard F, Karunas R: Incidence, characteristics, and outcome of spinal cord injury at trauma centers in North America. *Arch Surg* 1993;128:596-9.
- 2) Ramon y Cajal S (trans. by May RM) *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*. New York: Oxford Univ Press; 1928.
- 3) Nicholls J, Saunders N: Regeneration of immature mammalian spinal cord after injury. *Trends Neurosci* 1996;19:229-34.
- 4) Xu XM, Guerard V, Kleitman N, Bunge MB: Axonal regeneration into Schwann cell-seeded guidance channels grafted into transected adult rat spinal cord. *J Comp Neurol* 1995;351:145-60.
- 5) Fawcett JW, Geller HM: Regeneration in the CNS: optimism mounts. *Trends Neurosci* 1998;21:179-80.
- 6) Kocsis JD. Restoration of function by glial cell transplantation into demyelinated spinal cord. *J Neurotrauma* 1999;16:695-703.
- 7) Cheng H, Cao Y, Olson L: Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function. *Science* 1996;273(5274):510-3.
- 8) Olson L, Cheng H, Zetterstrom RH, Solomin L, Jansson L, Gimenez-Llort L, Hoffer BJ, Perlmann T: On CNS repair and protection strategies: novel approaches with implications for spinal cord injury and Parkinson's disease. *Brain Res Rev* 1998;26:302-5.
- 9) Ramon-Cueto A, Plant GW, Avila J, Bunge MB: Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J Neurosci* 1998;18:3803-15.
- 10) Ramon-Cueto A, Cordero MI, Santos-Benito FF, Avila J: Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron* 2000;25:425-35.

- 11) Costanzo RM: Regeneration of olfactory receptor cells. *Ciba Found Symp* 1991;160:233-42.
- 12) Astic L, Saucier D: Neuronal plasticity and regeneration in the olfactory system of mammals: morphological and functional recovery following olfactory bulb deafferentation. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:538-45.
- 13) Cowan CM, Roskams AJ: Apoptosis in the mature and developing olfactory neuroepithelium. *Microsc Res Tech* 2002;58:204-15.
- 14) Doucette R: Glial cells in the nerve fiber layer of the main olfactory bulb of embryonic and adult mammals. *Microsc Res Tech* 1993;24:113-30.
- 15) Doucette R: Olfactory ensheathing cells: potential for glial cell transplantation into areas of CNS injury. *Histol Histopathol* 1995;10:503-7.
- 16) Ramon-Cueto A, Santos-Benito FF: Cell therapy to repair injured spinal cords: olfactory ensheathing glia transplantation. *Restor Neurol Neurosci* 2001;19:149-56.
- 17) David S, Aguayo AJ Axonal elongation into peripheral nervous system bridges after central nervous system injury in adult rats. *Science* 1981;214:931-3.
- 18) Bovolenta P, Wandosell F, Nieto-Sampedro M: CNS glial scar tissue: a source of molecules which inhibit central neurite outgrowth. *Prog Brain Res* 1992;94:367-79.
- 19) Schnell L, Schneider R, Kolbeck R, Barde YA, Schwab ME Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature* 1994;367:170-3.
- 20) Bregman BS, Kunkel-Bagden E, Schnell L, Dai HN, Gao D, Schwab ME: Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature* 1995;378:498-501.
- 21) Oudega M, Hagg T. Nerve growth factor promotes regeneration of sensory axons into adult rat spinal cord. *Exp Neurol* 1996;140:218-29.
- 22) Tuszynski MH, Peterson DA, Ray J, Baird A, Nakahara Y, Gage FH: Fibroblasts genetically modified to produce nerve growth factor induce robust neuritic ingrowth after grafting to the spinal cord. *Exp Neurol* 1994;126:1-14.

- 23) Ye JH, Houle JD: Treatment of the chronically injured spinal cord with neurotrophic factors can promote axonal regeneration from supraspinal neurons. *Exp Neurol* 1997;143:70-81.
- 24) Kalderon N, Fuks Z: Severed corticospinal axons recover electrophysiologic control of muscle activity after x-ray therapy in lesioned adult spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:11185-90.
- 25) Guest JD, Rao A, Olson L, Bunge MB, Bunge RP: The ability of human Schwann cell grafts to promote regeneration in the transected nude rat spinal cord. *Exp Neurol* 1997;148:502-22.
- 26) Menei P, Montero-Menei C, Whitemore 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;10:607-21.
- 27) Xu XM, Chen A, Guerard V, Kleitman N, Bunge MB: Bridging Schwann cell transplants promote axonal regeneration from both the rostral and caudal stumps of transected adult rat spinal cord. *J Neurocytol* 1997;26:1-16.
- 28) Ramon-Cueto A, Avila J: Olfactory ensheathing glia: properties and function. *Brain Res Bull* 1998;46:175-87.
- 29) Ramon-Cueto A, Valverde F: Olfactory bulb ensheathing glia: a unique cell type with axonal growth-promoting properties. *Glia* 1995;14:163-73.
- 30) Woodhall E, West AK, and Chuah MI: Cultured olfactory ensheathing cells express nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, glia cell line-derived neurotrophic factor and their receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;88:203-13.
- 31) Ruitenber MJ, Plant GW, Christensen CL, Blits B, Niclou SP, Harvey AR, Boer GJ, Verhaagen J: Viral vector-mediated gene expression in olfactory ensheathing glia implants in the lesioned rat spinal cord. *Gene Ther* 2002;9:135-46.

Abstract

Morphological study of the effects of olfactory bulb transplants after complete spinal cord transection in rats.

Kil Byung Lim

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University
(Directed by Professor Kyung Ah Park)*

In the olfactory bulb, normal and transected olfactory axons are able to enter, regenerate, and reestablish lost synaptic contacts with their targets, throughout the lifetime of the organism. It was expected that studies of olfactory bulb ensheathing glia would provide important advances for the field of neural regeneration.

Purpose of this study was to analyze morphologically the effects of olfactory bulb transplants into the cord after complete transection. Forty Sprague-Dawley rats were used in this study. Spinal cord of the rats were transected after laminectomy followed by insertion of chopped olfactory bulb tissues immediately and 3 weeks after the operation.

In this study, transplants of olfactory bulb were successfully used to promote functional and structural recovery after complete spinal cord transection. The areas of damaged spinal cord were greatly diminished after olfactory bulb transplantation. Nearly normal anterior horn cells were observed immediately distal to the transected region. Tyrosine hydroxylase immunoreactive descending fibers were observed in the distal region beyond transected area.

KeyWords : spinal cord injury, transection, anterior horn cell, neurofilament protein, tyrosine hydroxylase, immunohistochemistry