

백서 파킨슨씨병 모형에 대한 동종 태자 중뇌 조직 이식시 Neurotrophic Factor가 이식 조직의 생존에 미치는 영향*

연세대학교 의과대학 신경외과학교실, 뇌연구소

미생물학교실, ** 병리학교실, *** 해부학교실****

정상섭 · 장진우 · 박용구 · 이원영** · 김태승*** · 이원택****

= Abstract =

Effects of Neurotrophic Factor on Fetal Mesencephalic Grafts in
Parkinsonian Rat Models

Sang Sup Chung, M.D., Jin Woo Chang, M.D., Yong Gou Park, M.D.,
Won Young Lee, M.D., ** Tai Seung Kim, M.D., *** Won Taik Lee, M.D.****
*Department of Neurosurgery, Microbiology, ** Pathology*** & Anatomy, **** Yonsei University,
College of Medicine, Seoul, Korea*

We investigated the usage of basic fibroblast growth factor administration to promote the survival of the dopaminergic neurons and behavioral efficacy of fetal mesencephalic grafts in rat parkinsonian models induced by 6-hydroxydopamine. The authors made partial lesioned rat parkinsonian models in which there was destruction of the dopaminergic nigrostriatal pathway & sparing of the mesolimbic pathway. A basic fibroblastic growth factor was given continuously by using osmotic minipump into the lateral ventricle of the rat parkinsonian model for 2 weeks. Twelve weeks after graft, all of the fetal mesencephalic grafts with basic fibroblast growth factor showed enhancement of the survival of dopaminergic neurons as well as activity of tyrosine hydroxylase in the caudate-putamen. Also, they accelerated the recovery in the grafted animals in test of apomorphine-induced rotational behavior when compare with that of the fetal mesencephalic grafts alone. The levels of tyrosine hydroxylase activity in the caudate-putamen were significantly enhanced in the fetal mesencephalic grafts with basic fibroblast growth factor and basic fibroblast growth factor alone compared with the control group. Those rats with fetal mesencephalic grafts with/without basic fibroblast growth factor or basic fibroblast growth factor alone showed the recovery in tests of apomorphine-induced rotational behaviors. Our study suggests that the basic fibroblast growth factor may be a neurotrophic factor for dopaminergic neurons, or may act indirectly by inducing the release of a dopaminergic trophic factor from other sources.

*본 연구 논문은 1993년도 한국학술진흥재단 대학부설연구소 연구과제 연구비에 의하여 연구되었음.

논문접수일: 1995년 6월 28일

심사통과일: 1995년 10월 7일

KEY WORDS : Parkinson's disease · Neurotrophic factor · 6-hydroxydopamine · Apomorphine · Basic fibroblast growth factor · Dopamine.

서 론

파킨슨씨병은 진전(tremor), 근육강직(rigidity) 및 운동완서(bradykinesia)의 임상적 증상과 조직병리학적으로 중뇌 흑질(substantia nigra, pars compacta)의 도파민성 신경세포의 감소를 특징적으로 나타내는 질환으로, 이에 대한 내과적 치료나 과거에 고식적으로 시행되어오던 시상파괴술등의 외과적 치료방법은 모두 병의 근원적인 치료방법보다는 증상의 완화 목적등으로 이용되어오던 방법들이다^{[10][21][29][30][33]}. 그러나 최근 파킨슨씨병에 대한 병리생태가 일부 밝혀지면서^{[21][30]}, 이에 대한 신경외과적 치료방법으로서 고식적인 시상파괴술 이외에 뇌세포의 이식 및 담창구파괴술등 다양한 치료 방법들이 연구되고 있다^{[8][21][29][33]}.

이러한 연구중 도파민성 신경세포의 이식을 통하여 파킨슨씨병을 치료하고자 하는 시도는 1985년 Backlund 등^[1]의 파킨슨씨병환자에 대한 자가 부신수질 선조체 이식수술과 1989년 Lindvall 등^[31]의 태아 도파민성 신경세포 이식 수술의 보고 이후 전세계의 많은 연구소에서 현재까지 광범위하게 시도되고 있다^{[2][3][4][10][13][18]}. 그러나 파킨슨씨병 환자에게 태아의 도파민성 신경세포를 이식한 후 일부 증상의 호전을 보였던 환자가 사망한 후, 부검 결과 이식 부위에서 도파민성 신경세포의 생존을 발견하지 못한 예들이 발견되고^[4], 많은 환자가 도파민성 신경세포의 이식수술 후 임상적으로 만족할만한 증상의 호전을 보이지 못하는 등 파킨슨씨병에 대한 도파민성 신경세포의 이식 수술은 아직 해결해야 할 많은 문제점을 지니고 있는 상황이다^{[2][3][4][10][13][18]}.

파킨슨씨병에 대한 뇌이식 수술의 문제점중 이식 후 증상 호전에 관여하는 중요한 인자의 하나가 본 연구의 대상인 향신경성인자(neurotrophic factor)로 현재 이에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다^{[12][24][27][44]}. 1986년 Kesslak 등^[27]은 이식 조직이란 단순히 숙주뇌(host brain)의 자발적인 회복을 돋는 향신경성 영향(neurotrophic influence)을 한다고 보고하였고, 1988년 Pezzoli 등^[43]은 도파민 비함유 신경조직을 신경성장인자(nerve growth factor)와 함께 선조체에 이식

시 비록 tyrosine hydroxylase 면역조직화학적 검사에 염색이 되는 신경섬유의 발아를 발견할 수는 없었으나 apomorphine 유발 회전운동검사에서 회전운동이 감소함을 확인하여, 뇌이식에 의한 증상 호전 효과에 신경성장인자등이 관여할 수 있다는 것을 제시하였다. 또한 Bankiewicz 등^[23]은 오히려 이식시 파킨슨씨병의 증상 호전은 이식 조직의 생존보다는 이식 조직에 의한 숙주뇌의 향신경성 영향으로 선조체에 도파민성 신경섬유가 발아된다고 주장하였으며, Wang 등^[49]은 신경조직의 순상시 성상세포(astrocyte)로부터 분비되는 향신경성인자의 하나인 interleukin-1을 주사하여 역시 숙주뇌로부터 도파민성 신경섬유의 발아와 이에 의한 증상의 호전을 관찰할 수 있었다고 하였다.

본 연구에서는 이러한 향신경성인자중 다양한 신경세포의 생존을 촉진시키는 것으로 알려진 염기성 섬유모세포 성장인자(basic fibroblast growth factor, bFGF)^{[15][38][46]}를 부분 손상 백서 파킨슨씨병 모형의 선조체에 동종 태자 중뇌 조직 세포현탁액과 함께 혹은 단독으로 Alzet osmotic minipump를 이용하여 2주간 지속적으로 주사함으로서, 이식 후 도파민성 신경세포의 생존에 미치는 영향과 숙주뇌의 변화를 관찰하며 동시에 apomorphine 유발 회전운동검사상 회전운동의 변화를 관찰하여, 염기성 섬유모세포 성장인자의 백서 파킨슨씨병 모형의 증상 호전에 미치는 영향을 관찰 및 확인하고자 하였다. 또한 향후 본 연구 결과를 기초로 파킨슨씨병 환자에 대한 뇌이식시 향신경성 인자의 이용 가능성에 대한 자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

1. 부분 손상 백서 파킨슨씨병 모형(partial lesioned rat parkinsonian model) 유발 과정

암수에 관계없이 건강한 180~200gm정도의 백서(Sprague-Dawley rat)를 1주일 이상 동일 환경에 적응시킨 후 sodium pentobarbital(30mg/kg)을 복강내에 주사하여 마취한 후 뇌정위 수술대(stereotactic frame, Narishige scientific instrument laboratory, Tokyo, Japan)을 이용하여 수술 현미경하에서 Paxinos 및

Watson⁴⁰의 백서 뇌 도보(rat brain atlas)에 근거하여 흑질(substantia nigra, pars compacta)에 해당되는 부위를 목표 지점(target)으로 정했다(Fig. 1). 부분적 손상으로 흑질만 주로 파괴시키고 복측 피개부를 보존시킨 파킨슨씨병 모형을 만들기 위하여 6-hydroxydopamine (2mg/ml)을 일반적인 모형⁴¹의 4μl보다 적은 3μl⁷⁸를 주사하였다.

2. 부분 손상(partial lesioned) 백서 파킨슨씨병 모형의 판정

6-hydroxydopamine의 주사 4주 경과 이후 부터 apomorphine(0.25mg/kg)을 피하로 주사하고 원주통(직경 30.5cm)에서 회전 반응률을 관찰하였다. 원주통에서 15분간의 적응기를 지난 후 30분간 분당 최소한 3회 이상의 회전을 보인 즉 30분간 최소 90회 이상의 병변 반대측의 축회전(pivotal rotation) 혹은 광회전(wide rotation)을 보인 경우를 1980년 Pycock⁴⁵의 기준에 따라 파킨슨씨병 모형이 완성된 것으로 간주하였다. 이상의 apomorphine 유발 회전운동검사를 4주 간격으로 총 3회 반복 시행하여 지속적으로 양성 반응을 보인 실험 동물을 부분 손상 백서 파킨슨씨병 모형이 완성된 것으로 간주하였다⁸.

3. 동종 백서 태자 중뇌 조직의 처리

임신 13~15 일째의 백서의 자궁을 절제하여 태자를 분리한 후 정수리-둔부간 거리(crown-rump length)가 12~15mm가 되는지 확인한 후 수술 현미경으로 무균 조작하에 중뇌를 분리하여 얻었고, 피펫과 망(mesh)을 이용하여 세포 혼탁액을 만들었다. 얻어진 세포 혼탁액은 trypan blue를 이용하여 세포 생존율(cell vi-

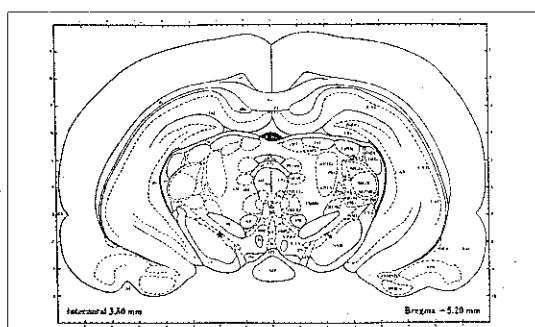


Fig. 1. Schematic view of the target point(*) in substantia nigra, pars compacta(SNpc) for 6-hydroxydopamine in rat brain atlas⁴⁸.

ability)을 확인하여, 세포 혼탁액 1μl 당 살아있는 세포(viable cell)가 최소 100,000개 이상되도록 혈구계산반(hemocytometer)을 이용하여 세포 혼탁액의 농도를 조절하였다.

4. 백서 파킨슨씨병 모형에의 태자 중뇌 조직 이식
백서 파킨슨씨병 모형을 sodium pentobarbital (30mg/kg)을 복강내에 주사하여 마취한 후 백서 파킨슨씨병 모형 유발시와 동일한 방법으로 무균조작하에 우측 선조체의 2부위(전정에서 전방으로 0.2mm, 시상 봉합선에서 우측으로 2.5mm, 뇌경막에서 깊이가 4.5mm 되는 지점과 전정에서 전방으로 0.1mm, 시상 봉합선에서 측방으로 2.7mm, 뇌경막에서 깊이가 4.5mm 되는 지점)에 10μl Hamilton 주사기를 이용하여 각각 5μl씩 세포 혼탁액을 주사하였다.

5. 백서 파킨슨씨병 모형에의 Alzet osmotic minipump의 삽입

백서 파킨슨씨병 모형을 sodium pentobarbital (30mg/kg)을 복강내에 주사하여 마취한 후 백서 파킨슨씨병 모형 유발시와 동일한 방법으로 무균조작하에 우측 측뇌실에 해당하는 부위의 두개골을 천공한 후 양측 두개골에 미세나사를 고정한 후 Alzet osmotic minipump (model 2002)를 우측 측뇌실에 삽입한 후 인조골(bone cement)을 이용하여 나사와 Alzet osmotic mini-

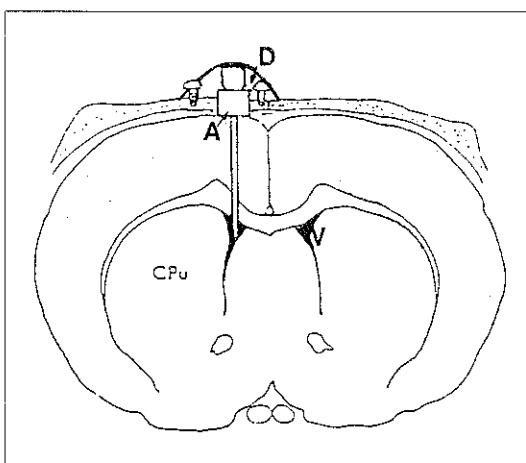


Fig. 2. Schematic drawing of Alzet osmotic minipump(A) for continuous administration of b-FGF or vehicle to the lateral ventricle(V). The cannula was maintained in position by dental cement(D), fixed to the skull by screws. CPu ; caudate-putamen.

pump를 융합하여 Alzet osmotic minipump를 두개골에 고정하였다(Fig. 2). Alzet osmotic minipump의 저장고(reservoir)는 백서의 경추부 피하에 고정하였다(Fig. 3). 염기성 섬유모세포 성장인자(Chemicon international INC, USA)의 주사량은 2주간 10 μ g/ml를 시간당 0.5 μ l의 속도로 측뇌실에 주사하였다.

6. 실험군 선정

백서 파킨슨씨병 모형의 실험군은 각군을 5마리씩으로 하였다. 제 1 실험군은 동종 태자 중뇌 세포 혼탁액만을 이식한 군을, 제 2 실험군은 동종 태자 중뇌 세포 혼탁액의 이식과 Alzet osmotic minipump를 이용하여 2주간 지속적으로 염기성 섬유모세포 성장인자를 함께 주사한 군을, 제 3 군은 Alzet osmotic minipump를 이용하여 2주간 지속적으로 염기성 섬유모세포 성장인자만을 주사한 군을, 제 4군은 대조군으로 역시 Alzet osmotic minipump를 이용하여 2주간 지속적으로 염기성 섬유모세포 성장인자와 동일한 양의 완충 식염수(buffered saline)을 주사하였다.

7. 중뇌조직 이식 후 백서 파킨슨씨병 모형의 apomorphine 유발 회전운동검사

이식 혹은 Alzet osmotic minipump의 삽입이 끝난 백서 파킨슨씨병 모형은 이식 4주, 8주, 12째에 수술전과 동일한 방법으로 백서의 회전운동 유발 검사를 하였다.

8. Tyrosine hydroxylase 면역조직화학적 염색

총 3회의 apomorphine 유발 회전운동검사를 모두 시행한 후 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 백서를 sodium pentobarbital(30mg/kg)로 마취를 한 후 심장을 통하여 생리적 식염수와 200ml의 10% 포르말린으로 관류한 후 뇌를 적출하여 10% 증성 포르말린액에 24시간 이상 고정하였다. 고정된 뇌를 vibratome를 이용하여 전정 부위부터 전방으로 이식 부위를 250 μ m간격으로 4절편을 50 μ m의 두께로 절단하였다. 세절된 조

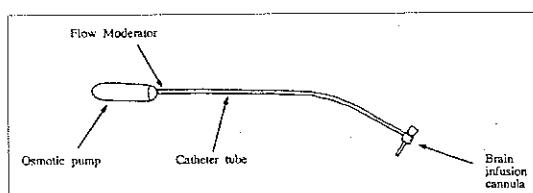


Fig. 3. Schematic drawing of the Kit for continuous infusion with Alzet osmotic minipump.

직은 labelled streptavidin-biotin(LSAB) Kit (DAKO, Copatum, Carpinteria, CA, USA)를 이용하여 면역조직화학염색을 하였으며 일차 항체로는 tyrosine hydroxylase에 대한 항체(Eugene tech international inc, Ramsey, NJ, USA)를 1:500으로 희석하여 사용하였다. 발색제로는 DAB(3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride)를 사용하였고 Meyer's hematoxylin으로 대조염색 후 광학 현미경으로 관찰하였다. 신경세포는 핵이 뚜렷히 확인되는 세포만을 계산하였다.

니슬 염색 검사는 뇌절편간의 여분 절편을 이용하였다. 50 μ m으로 세절된 조직을 스퍼레이드에 올려 실온에서 24시간 고정한 후 0.1% toluidine blue 수용액에 염색하였다. 염색 후 중류수에 행군 후 일반적인 조직 처리 방법을 이용하여 탈수 봉입하였다.

9. 통계 처리

각 실험군의 이식 전후의 apomorphine 유발 회전 운동의 변화는 비모수 검정 중 Mann-Whitney U 검정을 이용하였으며 P value 0.05 이하를 의미있는 통계적 유의 수준으로 하였다.

결 과

1. Apomorphine 유발 회전운동검사

위의 실험에서 동종 태자 중뇌조직 세포 혼탁액을 이식한 제 1 실험군의 백서는 이식 후 4주, 8주 및 12주의 총 3회 실시한 apomorphine 유발 회전운동검사에서 모두 이식 전에 비하여 평균 $42 \pm 5.8\%$ 의 통계적인 유의한 회전운동의 감소를 보였고, 동종 태자 중뇌조직 세포 혼탁액과 Alzet osmotic minipump를 이용하여 염기성 섬유모세포 성장인자를 2주간 지속적으로 주사하였던 제 2실험군의 백서는 수술 후 apomorphine 유발 회전운동검사에서 역시 이식 전에 비하여 평균 $54 \pm 7.4\%$ 의 현저한 회전운동의 감소를 보였다. 또한 Alzet osmotic minipump를 이용하여 염기성 섬유모세포 성장인자만을 2주간 지속적으로 주입하였던 제 3 실험군의 백서는 수술 후 apomorphine 유발 회전운동검사에서 제 1, 2 실험군에 비하여 호전은 적으나 이식전에 비하여 평균 $30 \pm 4.5\%$ 의 통계적인 유의한 회전운동의 감소를 보였다. 대조군인 제 4 실험군의 백서는 완충식 염수 주사 후 apomorphine 유발 회전운동검사에서 유

의한 회전운동의 호전을 관찰할 수 없었다(Fig. 4).

2. 조직형태학적 소견

Fig. 5는 6 μ g의 6-hydroxydopamine의 주사 후 완성된 부분 손상 백서 파킨슨씨병 모형의 중뇌 부위의 tyrosine hydroxylase 면역조직화학적 염색 소견(A)과 니슬 염색소견(B)으로 병변 동측 후질의 tyrosine hydroxylase의 항체에 양성반응을 보이는 신경세포의 거의 전부가 소실된 것이 관찰되나 양측 복측피개부의 도파민성 신경세포는 비교적 잘 보존된 소견을 관찰할 수 있다. Fig. 6은 역시 부분 손상 백서 파킨슨씨병 모형의 선조체 부위의 tyrosine hydroxylase 면역조직화학적 염색소견으로 병변 동측의 선조체에 tyrosine hy-

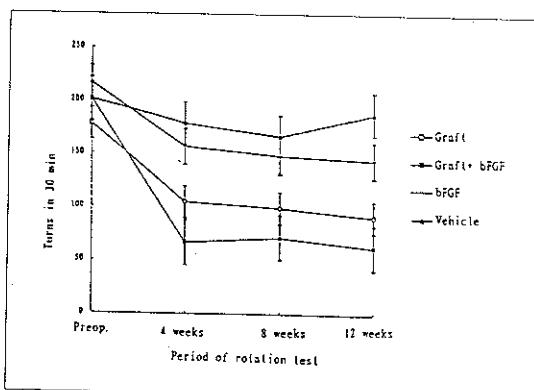


Fig. 4. Apomorphine-induced rotation test of rat parkinsonian model before and after graft (mean \pm S.E.M.)

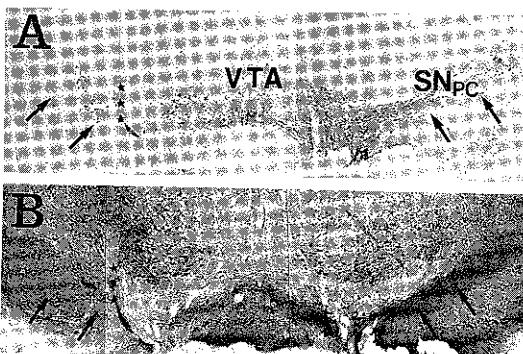


Fig. 5. Tyrosine hydroxylase(TH) immunohistochemical staining of partial lesioned rat parkinsonian model^[10]. A : Left substantia nigra pars compacta (SNpc) showed severe loss of TH-immunoreactive neurons, but left ventral tegmental area(VTA) was well preserved. B : Nissle staining of the same lesion confirmed the severe loss of neurons in the left SNpc. * ; needle tract.

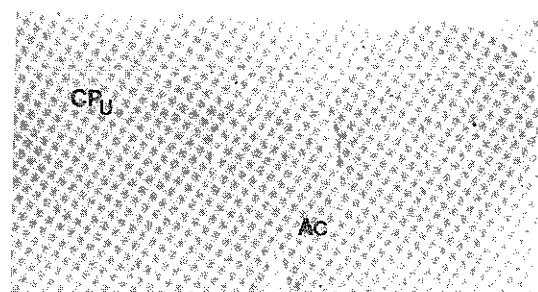


Fig. 6. Partial lesioned rat parkinsonian model showing faint TH-immunohistochemical staining of the right caudate-putamen(CPu) compared with the left non-lesion side. Ac : nucleus accumbens.

droxylase의 항체에 양성반응을 보이는 신경섬유가 감소되어있는 것을 관찰할 수 있다. 위의 실험에서 동종 태자 중뇌 세포 혼탁액을 이식한 제 1실험군의 5 마리 모두 이식 후 tyrosine hydroxylase 면역조직화학적 염색소견에서 선조체의 이식 부위에서 tyrosine hydroxylase의 항체에 양성 염색 반응을 보이는 신경세포를 관찰할 수 있었고, 이식 조직 주위의 선조체에서 tyrosine hydroxylase의 항체에 양성 염색 반응을 보이는 신경섬유의 발아를 발견할 수 있었으며(Fig. 7), 이식 후 도파민성 신경세포는 이식조직의 주변부위에 주로 생존하는 것을 관찰할 수 있었다.(Fig. 7B, 7C). 동종 태자 중뇌조직 세포 혼탁액과 Alzet osmotic mini-pump를 이용하여 염기성 섬유모세포 성장인자를 2주간 지속적으로 주사하였던 제 2실험군의 백서에서도 역시 수술 후 이식 조직 주위의 선조체에서 tyrosine hydroxylase의 항체에 양성 염색 반응을 보이는 신경섬유의 발아를 발견할 수 있었고(Fig. 8), tyrosine hydroxylase 면역조직화학적 염색소견에서 선조체의 이식 부위에서 tyrosine hydroxylase의 항체에 양성 염색 반응을 보이는 신경세포의 수가 동종 태자 중뇌조직 세포 혼탁액만을 이식한 경우에 비하여 평균 2.1 ± 0.7 배 많이 관찰되었다(Fig. 8). 그러나 선조체의 이식 부위에서 tyrosine hydroxylase의 항체에 양성 염색 반응을 보이는 신경세포의 수가 동종 태자 중뇌조직 세포 혼탁액만을 이식한 경우에 비하여 월등히 많음에도 불구하고 제 1실험군과 제 2실험군의 선조체에서 tyrosine hydroxylase의 항체에 양성 염색 반응을 보이는 도파민성 신경섬유의 발아에 의한 양성 염색정도의 양자간 차이는 구분할 수 없었다.

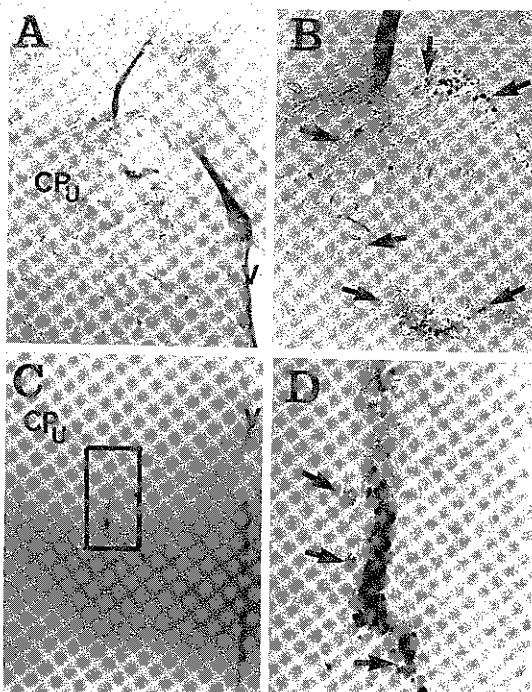


Fig. 7. Tyrosine hydroxylase staining after fetal mesencephalic tissue grafts alone. (A, C) : Low-power photograph showing TH-immunoreactive neurons (arrows) and also reappearance of TH-immunoreactive staining from the previously denervated caudate-putamen(CPu). (B,D) High-power photograph showing TH-immunoreactive neurons and outgrowth of TH-immunoreactive fibers (arrows). V ; lateral ventricle.

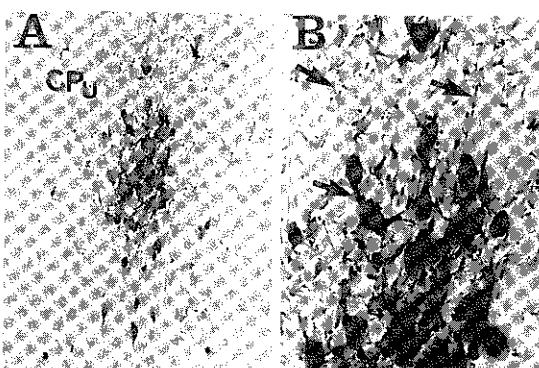


Fig. 8. Low and high-power photograph(A, B) after bFGF infusion with osmotic minipump and fetal mesencephalic tissue grafts showing well survived TH-immunoreactive neurons and outgrowth of TH-immunoreactive fibers(arrows). Caudate-putamen ; CPu.

Alzet osmotic minipump를 이용하여 염기성 섬유모세포 성장인자율 2주간 지속적으로 측뇌실내로 주사하였던 제 3실험군의 백서는 수술 후 tyrosine hydroxylase 면역조직화학적 염색소견에서 병변 부위의 선조체에서 신경섬유의 발아에 의한 tyrosine hydroxylase 면역조직화학적 양성 염색 반응의 증가를 관찰할 수 있었고(Fig. 9, Fig. 10) 또한 Alzet osmotic minipump 삽입부위의 대뇌 피질과 측뇌실에 이차적인 수술흔이 관찰되었다.

제 4실험군인, 대조군 백서는 매개체(vehicle) 주사후 tyrosine hydroxylase 면역조직화학적 염색소견상

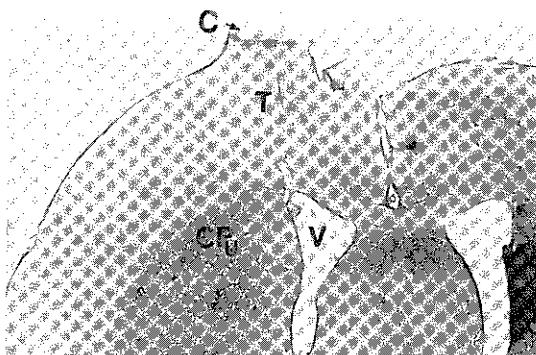


Fig. 9. Tyrosine hydroxylase immunohistochemical staining of the partial lesioned rat parkinsonian model after bFGF infusion with osmotic minipump showing the tract(T) and the change of the cortical surface(C) due to Alzet osmotic minipump. Also, denervated right caudate-putamen showing positive TH-immunoreactive staining. Caudate-putamen ; CPu, Lateral ventricle ; V.

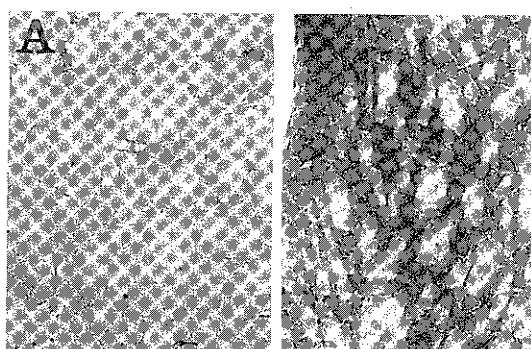


Fig. 10. High-power photograph of the partial lesioned rat parkinsonian model after bFGF infusion with osmotic minipump showing reappearance of TH-immunoreactive staining of the caudate-putamen(A). The density of the TH-immunoreactive staining is less than that of the 'non-lesioned side(B).

주사전 후 새로운 tyrosine hydroxylase의 항체에 양성 염색 반응을 보이는 신경섬유의 발아를 발견할 수 없었고, 단지 Alzet osmotic minipump삽입에 따른 이차적인 수술흔만을 관찰할 수 있었다.

고 찰

파킨슨씨병에 대한 도파민성 신경세포의 뇌이식 수술은 6-hydroxydopamine을 이용한 백서 파킨슨씨병 모형의 개발 이후 연구가 활발히 이루어져 이미 인간에서도 1985년 Backlund¹⁾에 의하여 처음으로 자가 부신수질 선조체 이식 수술이 처음으로 시도되었고, 1989년 Lindvall 등²¹⁾에 의하여 부신수질이 아닌 태아 도파민성 신경세포의 이식 수술이 시행되는 등 현재까지 전세계에서 많은 이식 수술 결과들이 보고되어 있는 상태이다<sup>9)10)
21)33)42)</sup>. 그러나 초기에 많은 연구자들이 기대하던 바와는 달리 인간에게의 도파민성 신경세포의 이식은 일부 이식된 도파민성 신경세포의 생존 및 이에의한 약간의 증상 호전을 밝혀졌으나 아직까지 많은 파킨슨씨병 환자에게 임상적으로 만족할 만한 결과를 보이고 있지는 못한 실정이다⁹⁾¹⁰⁾²¹⁾³³⁾⁴²⁾. 이러한 원인으로 파킨슨씨병 환자에 대한 뇌이식 후 생존하는 도파민성 신경세포의 수가 1%에서 5% 정도로 한정되어 있고⁶⁾, 또한 증상 호전에 최소 4명 내지 10명의 태아 중뇌조직이 필요하나³¹⁾, 일시에 이식할 수 있는 이식 세포의 양이 한정되어 있다는 점 등 많은 문제점들이 현재 제기되어 있다. 이와는 다른 파킨슨씨병에 대한 뇌이식의 효능에 대한 또 다른 근원적인 문제의 제기로 현재까지 알려진 이식에 의한 일부 증상의 호전이 실제로 이식된 도파민성 신경세포에 의하여 일어나는지 아니면, 숙주뇌등 기타요인이 증상의 호전에 영향을 미치는 것이 아닌지등에 대한 많은 반론들이 있다. 즉 태아 도파민성 신경세포의 이식 후 증상의 호전이 있었던 파킨슨씨병 환자가 사망 후 시행한 부검 결과 이식 부위에서 도파민성 신경세포의 생존을 발견하지 못한 예들이 발견되고⁴²⁾, 원숭이 파킨슨씨병 모형에게 도파민성 신경세포의 이식 대신 이식부위에 공동화(cavitation)만을 만든 경우에도 증상의 호전과 병리조직학적으로도 파괴된 선조체의 도파민성 신경섬유의 발아 소견이 관찰되었다²⁾³⁾²¹⁾⁴⁴⁾.

또한 1988년 Pezzoli 등⁴³⁾은 도파민 비함유 신경 조직을 신경성장인자와 함께 선조체에 이식시 비록 tyro-

sine hydroxylase 면역조직화학적 검사에 염색이 되는 신경섬유의 발아를 발견할 수는 없었으나 apomorphine 유발 회전운동검사에서 회전운동이 감소함을 확인하여 뇌이식에 의한 파킨슨씨병의 증상 호전에 도파민성 신경세포이외에 다른 인자 즉 향신경성 인자 등이 관여할 수 있다는 점을 관찰하였다.

따라서 현재 파킨슨씨병에 대한 뇌이식의 연구 동향은 이식된 도파민성 신경세포의 양을 늘릴 수 있는 방법 또는 대체시키는 방법과 향신경성 인자 등을 이용하여 도파민성 신경세포의 생존을 증가 혹은 숙주뇌의 기능을 복원시키는 방법 등을 각각으로 연구하고 있으며, 유전자치료기법 등이 주된 연구대상이 되고 있다¹³⁾¹⁸⁾²⁴⁾³¹⁾³⁷⁾.

최근의 향신경성 인자에 대한 연구 결과들로 1990년 Olson은³⁷⁾ 신경성장인자 투여후 이식된 부신수질세포의 생존 및 발아가 현저히 증가되는 것을 관찰하였고, 1994년 Wang 등⁴⁹⁾은 Interleukin-1의 선조체 주사는 부분손상 백서 파킨슨씨병 증상의 호전을 유도하며 조직학적으로 Interleukin-1 pellet는 GFAP(glial fibrillary acidic protein) 표현의 증가를 보이는 성상세포의 활성화를 유발하며, 활성화된 성상세포는 신경성장인자 유사 죽상 활성화 물질(nerve growth factor-like neurite-promoting compounds)을 분비한다고 하였다³⁸⁾. 현재까지 도파민성 신경세포의 생존에 영향을 주는 향신경성 인자들로는 신경성장인자, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), 염기성 섬유모세포 성장인자(bFGF), 산성 섬유모세포 성장인자(acidic fibroblastic growth factor, aFGF), 표피성장인자(epidermal growth factor) 등이 보고되어 있고 이러한 향신경성 인자는 신경세포의 분화, 죽상의 성장(neurite outgrowth), 세포의 죽음(cell death)에 관여하며, 또한 신경세포의 회복(neuronal repair), 신경세포의 기능 회복(restoring) 등에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다¹²⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁹⁾²⁰⁾²³⁾²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾²⁸⁾³²⁾.

본연구의 대상인 염기성 섬유모세포 성장인자는 다양한 신경세포의 생존을 촉진시키고 강력한 향신경성 인자의 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 섬유모세포 성장인자는 Gospodarowicz 등²²⁾에 의하여 산성(acidic)과 염기성(basic)의 두 가지 종류로 명명되었으며, 이들 두 종류의 섬유모세포 성장인자는 상호간에 아미노산 배열(amino acid sequence)이 55% 일치한다¹⁹⁾²⁰⁾⁴⁸⁾. 최근 이를 두 가지 섬유모세포 성장인자 외에도 섬유모세포

성장인자와 아미노산 배열이 42% 일치하고 섬유모세포 성장인자와 유사한 생물학적 활동을 보이는 INT-2³⁹. 섬유모세포 성장인자와 아미노산 배열이 50% 일치하는 FGF-5 및 섬유모세포 성장인자와 아미노산 배열이 39% 일치하는 keratinocyte growth factor(KGF)^{16,34} 등이 최근까지 확인 보고되어 있는 상태이다.

본연구에서는 이러한 염기성 섬유모세포 성장인자의 효과를 관찰하기 위하여 먼저 과거에 이용되던 기존의 백서 파킨슨씨병 모형과는 달리 혹질의 파괴만 있고 복측피개부는 잘 보존된 부분손상 파킨슨씨병 모형을 사용하였다^{7,8}. 기존의 백서 파킨슨씨병 모형⁴⁷은 혹질과 복측피개부의 도파민성 신경세포의 심한 파괴로 인하여 병리학적으로 인간 혹은 영장류 파킨슨씨병 모형의 소견과 많은 차이를 보이며, 이식 실험시 병변측의 혹질과 복측피개부의 심한 파괴로 인하여, 이식시 숙주뇌의 변화등에 의한 병리학적 혹은 임상적 증상의 변화를 관찰할 수 없는 문제점들이 발견되었다^{2,5,7,8,41}. 따라서 본연구에서는 향신경성 인자의 효과등을 관찰할 수 있는 방법으로 1991년 Carman 등⁷의 방법을 응용하여 혹질의 외측에 6 μ g의 6-hydroxydopamine을 주사하여 백서 파킨슨씨병 모형을 만들었다⁸.

실험결과에서 동종 태자 중뇌조직 세포현탁액을 이식한 제 1실험군 백서는 이식 후 이식 전에 비하여 평균 $42 \pm 5.8\%$ 의 통계적으로 유의한 회전운동의 감소를 보였고, tyrosine hydroxylase 면역조직화학적 염색소견에서도 선조체의 이식 부위에서 tyrosine hydroxylase의 항체에 양성 염색 반응을 보이는 신경세포를 관찰할 수 있었고, 신경세포의 생존은 이식조직의 중앙부가 아닌 주로 이식조직의 주변부위에서 관찰되었다. 또한 이식 조직 주위의 선조체에서 이식 수술전에는 관찰할 수 없었던 tyrosine hydroxylase의 항체에 양성 염색 반응을 보이는 신경섬유의 발아를 발견할 수 있었다. 이러한 소견은 즉 이식조직의 생존에 필요한 에너지원의 흡수가 용이한 주변조직에 주로 도파민성 신경세포가 생존하였다는 점으로 우리가 인위적으로 향신경성인 자들을 이식 조작과 함께 주입할 경우 도파민성 신경세포의 생존량을 증가시킬 수 있는 가능성이 있다고 생각할 수 있다.

본연구에서 동종 태자 중뇌조직 세포현탁액을 Alzet osmotic minipump를 이용하여 염기성 섬유모세포 성장인자를 2주간 지속적으로 함께 주사하였던 제 2실험군

백서 5 마리의 실험결과를 살펴보면 선조체의 이식 부위에서 tyrosine hydroxylase의 항체에 양성 염색 반응을 보인 신경세포의 수가 동종 태자 중뇌조직 세포현탁액만을 이식한 경우에 비하여 평균 $2.1 \pm 0.7\%$ 이상 많이 판찰되었다. 또한 이식 전에 비하여 평균 $54 \pm 7.4\%$ 의 회전운동의 감소를 보여 제 1 실험군의 $42 \pm 5.8\%$ 에 비하여 좀더 높은 회전율의 감소를 보였다. 이러한 결과는 기존에 알려진 이식 후 생존된 도파민성 신경세포와 백서의 apomorphine 유발 회전 운동 검사상 회전운동의 반비례적 상관관계^{7,13}가 있음과 일치하였다. 즉 위의 제 1, 2실험군의 결과를 통하여 저자들은 염기성 섬유모세포 성장인자에 의하여 도파민성 신경세포의 생존이 증가하고, 백서 파킨슨씨병 모형의 apomorphine 유발 회전운동의 감소가 촉진됨을 알 수 있었다. 그러나 이식 조직 주위의 선조체에서 tyrosine hydroxylase의 항체에 양성 염색 반응을 보이는 신경섬유 발아의 양자간 차이는 염색시마다의 염색정도의 차이등, 자체의 오차요인등으로 정확히 구분하여 판단할 수가 없었다.

Alzet osmotic minipump를 이용하여 염기성 섬유모세포 성장인자만을 2주간 지속적으로 주사하였던 제 3 실험군의 백서 5 마리 모두는 제 1, 2 실험군에 비하여 감소율은 적으나 역시 이식전에 비하여 평균 $30 \pm 4.5\%$ 의 회전운동의 감소를 보였다. 또한 선조체에서 경미하지만 주사전에 비하여 약간의 증가된 tyrosine hydroxylase의 항체에 양성 염색 반응을 보이는 신경섬유의 발아를 역시 발견할 수 있었다. 그러나 이의 대조군인 제 4 실험군 백서 5마리 모두는 완충식염수 주사 후 tyrosine hydroxylase의 항체에 양성 염색 반응을 보이는 신경섬유의 발아를 발견할 수 없었고, apomorphine 유발 회전운동검사에서도 역시 이식 후 유의한 회전운동의 감소를 관찰할 수 없었다.

이상의 결과를 통하여, 염기성 섬유모세포 성장인자는 백서 파킨슨씨병 모형에게의 도파민성 신경세포의 이식 시 도파민성 신경세포의 생존을 증가시키며 이에 의하여 동시에 apomorphine유발 회전운동의 감소를 촉진시킬 수 있다는 것을 알 수 있었고 뿐만 아니라, 도파민성 신경세포의 이식없이 단독으로 염기성 섬유모세포 성장인자만을 주사한 경우에도 병변측의 선조체에 도파민성 신경섬유의 발아를 야기시키며, 이에 의하여 역시 apomorphine유발 회전운동의 감소가 나타나는 것을 관찰 확인하였다. 이는 부분 손상모형의 경우 향신경성 인자

에 의하여 숙주뇌에 잔존하던 도파민성 신경세포의 활성화가 유발된다는 것을 의미한다고 할 수 있다.

이러한 염기성 섬유모세포 성장인자는 분화유발 활성도(mitogenic activity)와 함께 중추신경계에서 신경세포의 생존과 축삭의 확장 효과를 나타내며³⁵⁾⁴⁶⁾, 염기성 섬유모세포 성장인자의 도파민성 신경세포에 대한 효과는 1989년 Ferrari 등¹⁵⁾이 시험관내에서 도파민성 신경세포의 생존을 증가시킴을 보고한 후, 1990년 Otto 및 Unsicker³⁸⁾에 의하여 염기성 섬유모세포 성장인자가 마우스 생체내에서 도파민성 신경세포의 생존과 성장을 현저히 증가시키는 것을 발견하였다. 염기성 섬유모세포 성장인자의 백서에 대한 연구로 1990년 Steinbush 등⁴⁶⁾은 백서에게 도파민성 신경세포의 이식시 반복적 정위적 주사 방법으로 염기성 섬유모세포 성장인자를 투여하여 도파민성 신경세포의 발아와 도파민성 신경섬유의 발아가 증가하는 것을 보고하였다. 그러나 이러한 방법은 지속적인 주입이 어렵거나, 실제로는 반복적 정위적 주사에 따른 수술부위등의 이차적인 감염등의 문제들로 임상에서 이용하기가 어렵고, 이러한 수기에 의한 즉 염증세포등 타 인자(기타 향신경성인자등)의 관련 가능성들이 있기에 결과의 분석시 단순이 염기성 섬유모세포 성장인자의 효과를 관찰하는데에 문제가 있을 가능성이 있다고 생각된다.

저자들은 1991년 Hadjiconstantinou 등²³⁾과 1992년 Cumming 등¹¹⁾과 실험방법과 유사한 저장고를 이용한 방법 즉 Alzet osmotic minipump를 이용한 지속적 염기성 섬유모세포 성장인자의 주입법을 사용하였다. 이러한 향신경성인자의 뇌내의 직접적인 주입 방법들과는 달리 Fisher 및 Gage 등은 유전자 조작을 이용하여, 백서에서 섬유모세포 성장인자를 분비하는 세포를 배양하여 도파민성 신경세포와 함께 이식시 이식 부위에서 도파민성 신경세포의 생존이 최고 10배까지 현저히 증가하는 것을 관찰 보고하여 유전자 치료법을 이용한 향신경성인자의 주입의 가능성을 제시하였다¹⁸⁾.

염기성 섬유모세포 성장인자는 현재까지 알려진 바로는 성상세포¹⁵⁾, 신경세포¹⁷⁾등이 생성에 관여하나, 주된 염기성 섬유모세포 성장인자의 생성은 신경세포에서 이루어진다고 알려져 있다. 염기성 섬유모세포 성장인자는 내피세포(endothelial cell)의 증식 효과가 있다고 알려져 있으나 아직 뇌이식시 이식조직의 생장에 어떻게 영향을 미치는지 명확히 알려져있지 않으며¹⁹⁾ 이 염기성

섬유모세포 성장인자는 도파민성 신경세포 이외에도 섬유모세포(fibroblast), 내피세포(endothelial cell), 근모세포(myoblast), 연골세포(chondrocyte)와 골모세포(osteoblast)등에 대해서도 세포 증식에 영향을 미치는 것이 밝혀졌다²²⁾³²⁾.

결 론

본실험을 통하여 도파민성 신경세포의 생존에 향신경성 인자의 하나인 염기성 섬유모세포 성장인자가 중요한 역할을 하는 것을 관찰하였고, 또한 섬유모세포 성장인자에 의하여 이식시 백서 파킨슨씨병 모형의 증상 호전이 촉진됨을 관찰하였다. 따라서 본연구를 통하여 향신경성인자가 파킨슨씨병에 대한 뇌이식 수술시 이식된 신경세포의 생존과 이에 의한 증상호전에 중요한 역할을 할 수 있음을 알 수 있었고, 향후 향신경성 인자의 임상적응용에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

References

- 1) Backlund EO, Granberg PO, Hamberger B, et al : *Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism. First clinical trials.* J Neurosurg 62 : 169-173, 1985
- 2) Bankiewicz KS, plunkett RJ, Jacobowitz DM, et al : *The effect of fetal mesencephalon implants on primate MPTP-induced parkinsonism. Histochemical and behavioral studies.* J Neurosurg 72 : 231-24, 1990
- 3) Bankiewicz KS, Plunkett RJ, Jacobowitz DM, et al : *Fetal nondopaminergic neural implants in parkinsonian primates.* J Neurosurg 74 : 97-104, 1991
- 4) Björklund A : *Neural transplantation-an experimental tool with clinical possibilities.* TINS 14 : 319-322, 1991
- 5) Björklund A, Stenevi U : *Reconstruction of the nigrostriatal pathway by intracerebral nigral transplants.* Brain Res 177 : 555-560, 1979
- 6) Brundin P, Barbin G, Strecker RE, et al : *Survival and function of dissociated rat dopamine neurons grafted at different developmental stages or after being cultured in vitro.* Dev Brain Res 39 : 233-243, 1988
- 7) Carman LS, Gage FH, Shults CW : *Partial lesion of the substantia nigra : Relation between extent of le-*

- sion and rotation behavior. *Brain Res* 553 : 275-283, 1991
- 8) Chang JW, Chung SS, Park YG, et al : *The study of apomorphine-induced rotational behavior in partial lesioned rat parkinsonian models with 6-hydroxydopamine. Abstract, Soc for Neurosci* : 1328, 1994
 - 9) Chung SS, Kim SH, Yoon DH : *Stereotactic transplantation of adrenal medullary tissue in Parkinson's disease. Stereotac Funct Neurosurg* 54+55 : 272-276, 1989
 - 10) Chung SS, Park YG, Chang JW, Cho J : *Long-term follow-up results of stereotactic adrenal medullary transplantation in Parkinson's disease. Stereotac Funct Neurosurg* 62 : 2141-147, 1994
 - 11) Cummings BJ, Yee GJ, Cotman CW : *bFGF promotes the survival of entorhinal layer II neurons after perforant path axotomy. Brain Res* 591 : 271-276, 1992
 - 12) Date I, Felten SY, Felten DL : *Cografts of adrenal medulla with peripheral nerve enhance the survivability of transplanted adrenal chromaffin cells and recovery of the host nigrostriatal dopaminergic system in MPTP-treated young adult mice. Brain Res* 537 : 33-39, 1990
 - 13) Dunnett SB : *Transplantation of embryonic dopamine neurons : what we know from rats. J Neurol* 238 : 65-74, 1991
 - 14) Ferrara N, Ousley F, Gospodarowicz D : *Bovine brain astrocytes express basic fibroblast growth factor, a neurotrophic and angiogenic mitogen. Brain Res* 462 : 223-232, 1988
 - 15) Ferrari G, Minozzi M-C, Toffano G, et al : *Basic fibroblast growth factor promotes the survival and development of mesencephalic neurons in culture. Dev Biol* 133 : 140-147, 1989
 - 16) Finch PW, Rubin JS, Miki T, et al : *Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. Science* 245 : 752-755, 1989
 - 17) Finkelstein SP, Apostolidis PJ, Caday CG, et al : *A factor from the injured lower vertebrate CNS promotes outgrowth from human fetal brain neurons. Brain Res* 448 : 346-350, 1988
 - 18) Fisher LJ, Gage FH : *Intracerebral transplantation : Basic and clinical applications to the neostriatum. FASEB* 8 : 489, 1994
 - 19) Giacobini MMJ, Hoffer BJ, Zerbe G, et al : *Acidic and basic fibroblast growth factors augment growth of fetal brain tissue grafts. Exp Brain Res* 86 : 73-81, 1991
 - 20) Giulian D, Lachman LB : *Interleukin-1 stimulation of astroglial proliferation after brain injury. Science* 228 : 497-499, 1985
 - 21) Goetz CG, Delong MR, Penn RD, et al : *Neurosurgical horizons in Parkinson's disease. Neurology* 43 : 1-7, 1993
 - 22) Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L : *Molecular and biological characterization of fibroblast growth factor : an angiogenic factor which also controls the proliferation and differentiation for mesoderm and neuroectoderm derived cells. Cell Differ* 19 : 1-17, 1986
 - 23) Hadjiconstantinou M, Fitkin JG, Dalia A, et al : *Epidermal growth factor enhances striatal dopaminergic parameters in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mouse. J Neurochem* 57 : 479-482, 1991
 - 24) Hefti F, Hartikka J, Knusel B : *Function of neurotrophic factors in the adult and aging brain and their possible use in the treatment of neurodegenerative diseases. Neurobiol Aging* 10 : 515-533, 1989
 - 25) Hyman C, Hofer M, Barde YA, et al : *BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. Nature* 350 : 230-232, 1991
 - 26) Korfali E, Doygun M, Ulus IH, et al : *Effects of neuronotrophic factors on adrenal medulla grafts implanted into adult rat brains. Neurosurgery* 22 : 994-998, 1988
 - 27) Kesslak JP, Brown L, Steichen C, et al : *Adult and embryonic frontal cortex transplants after frontal cortex ablation enhance recovery on a reinforced alteration task. Exp Neurol* 94 : 615-626, 1986
 - 28) Kushima Y, Nishio C, Nonomura T, et al : *Effects of nerve growth factor and basic fibroblast growth factor on survival of cultured septal cholinergic neurons from adult rats. Brain Res* 598 : 264-270, 1992
 - 29) Laitinen LV, Bergenheim T, Hariz MI : *Leksell's posteroverentral pallidotomy in the treatment of Parkinson's disease. J Neursurg* 76 : 53-61, 1992
 - 30) Langston JW : *Current theories on the cause of Parkinson's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatr* 52

(Special Suppl) : 12-17, 1989

- 31) Lindvall O, Björklund A : *Transplantation strategies in the treatment of Parkinson's disease : Experimental basis and clinical trials.* Acta Neurol Scand 126 : 197-210, 1989
- 32) Maciag T, Cerundolo J, Isley S, et al : *An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus : identification and partial characterization.* Proc Natl Acad Sci 76 : 5674-5678, 1979
- 33) Madrazo I, Franco-Bourland R, Aguilera M, et al : *Development of human neural transplantation.* Neurosurgery 29 : 165-177, 1991
- 34) Marchese C, Rubin J, Ron D, et al : *Human keratinocyte growth factor activity on proliferation and differentiation of human keratinocytes : differentiation response distinguishes KGF from EGF family.* J Cell Physiol 1 : 326-332, 1990
- 35) Morrison RS, Sharma A, Devillis J, et al : *Basic fibroblast growth factor supports the survival of cerebral cortical neurons in primary culture.* Proc Natl Acad Sci USA 83 : 7537-7541, 1986
- 36) Nieto-Sampedro M, Manthrope M, Barbin G, et al : *Injury-induced neuronotrophic activity in adult rat brain : correlation with survival of delayed implants in the wound cavity.* J Neurosci 3 : 2219-2229, 1983
- 37) Olson L : *Grafts and growth factors in CNS.* Stereotact Funct Neurosurg 54+55 : 250-267, 1990
- 38) Otto D, Unsicker K : *Basic FGF reverses chemical and morphological deficits in the nigrostriatal system of MPTP-treated mice.* J Neurosci 10 : 1912-1921, 1990
- 39) Paterno GD, Gillespie LL, Dixon MS, et al : *Mesoderm inducing properties of INT-2 and kFGF.* Development 106 : 79-83, 1989
- 40) Paxinos G, Watson C : *The rat brain in stereotaxic coordinates.* 2nd Ed., New York Academic Press, 1986
- 41) Perlow MJ, Freed WJ, Hoffer BJ, et al : *Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system.* Science 204 : 643-647, 1979
- 42) Peterson DI, Price ML, Small CS : *Autopsy findings in a patient who had an adrenal-to-brain transplant for Parkinson's disease.* Neurology 39 : 235-238, 1989
- 43) Pezzoli G, Fahn S, Dwork A, et al : *Non-chromaffin tissue plus nerve growth factor reduces experimental parkinsonism in aged rats.* Brain Res 459 : 398-403, 1988
- 44) Plunkett RJ, Bankiewicz KS, Cummins AC, et al : *Long-term evaluation of hemiparkinsonian monkeys after adrenal autografting or cavitation alone.* J Neurosurg 73 : 918-926, 1990
- 45) Pycock CJ : *Turning behaviour in animal.* Neuroscience 5 : 461-514, 1980
- 46) Steinbusch HWM, Vermeulen RJ, Tonnaer JADM : *Basic fibroblastic growth factor enhances survival and sprouting of fetal dopaminergic cells implanted in the denervated rat caudate-putamen : preliminary observations.* Prog Brain Res 82 : 81-86, 1990
- 47) Ungerstedt U, Arbuthnott GW : *Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system.* Brain Res 24 : 485-493, 1970
- 48) Waliche PA : *Basic and acidic fibroblast growth factors have trophic effects on neurons from multiple CNS regions.* J Neurosci 8 : 2618-2627, 1988
- 49) Wang J, Bankiewicz KS, Plunkett RJ, et al : *Intrastriatal implantation of interleukin-1.* J Neurosurg 80 : 484-490, 1994
- 50) Wichmann T, Delong MR : *Pathophysiology of parkinsonian motor abnormalities.* Adv Neurol 60 : 53-61, 1993