

*Hymenochirus boettgeri*의 공동신경 절단이 뒷다리뼈 발육에 미치는 영향에 대한 연구

손 장 신, 김 형 태

전북대학교 의학전문대학원 해부학교실

간추림 : 본 연구는 *Hymenochirus boettgeri*의 공동신경 절단이 뒷다리 뼈 성장에 어떤 영향을 주는지 알아보고자 시도하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

실험동물은 각각 Stage 63과 66 때 공동신경을 절단하여, 각각 6과 7주 후, 그리고 12와 13주 후에 alcian blue와 alizarine red로 염색하여 영상분석기로 넙다리뼈의 길이와 평면적, 정강뼈의 길이를 측정하였다.

첫째로, 단순한 피부절개는 뼈의 성장이나 발육에 영향을 주지 않으며, 둘째로 공동신경 절단은 넙다리뼈와 정강뼈의 길이 성장에 영향을 주어 2~9%의 감소를 보여주었고, 셋째로, 공동신경 절단은 넙다리뼈의 단위평면적에도 영향을 주었다. 넷째로, 신경절단된 넙다리뼈의 골화과정의 지연이 형태학적으로 관찰되었다.

이상의 결과는 다른 연구자들의 연구와 종합해 볼 때 공동신경의 절단은 넙다리뼈와 정강뼈의 성장에 직접적인 영향을 준다고 사료된다. 또한 이러한 다리뼈의 성장의 감소는 골화과정의 지연과 뼈성장과정의 임계시기의 상실에 의한 것이라 사료된다.

찾아보기 낱말 : 신경절단, 뼈발육, *Hymenochirus boettgeri*, 공동신경

시 론

다리의 발육과 성장에 있어서 구성조직의 상호관계성은 여러 연구자들에 의해 연구되고 있다. 이를테면 신경과 같은 특별한 조직이 다리의 발육과 성장에 필요한 어떤 성장인자를 생산하고 분비하여 근육과 같은 다른 조직에 영향을 줄 수 있다는 것은 확인되었다(Destipande 1976, Markelonis와 Oh 1979, Davis과 Kiernan 1980, Markelonis 등 1980, Davis 1983).

다리의 분화 이후에 말초신경의 다리 성장과 발육에 대한 영향은 별로 주목받지 못하였다. 많은 연구자들의 관심이 주로 다리의 분화과정 중 신경의 중요성에 대하여 국한되었기 때문이다(Hamburger 1928, Nicholas 1933, Hamburger와 Waugh 1940,

Strecker과 Stephens 1983). 또한 신경절단의 모델은 다리의 분화 이전에는 주로 척수 등 중추신경계의 절제나 절단에 국한되기 때문에 실제로 그 영향의 결과가 상당한 차이를 보이는 반면에, 분화 이후의 시기에 다리로 가는 신경의 절제 또는 절개는 국소조직의 하나로서의 신경이 다른 조직의 성장에 대해 어떠한 영향을 미치는가를 관찰할 수 있다. 따라서 개구리에서 분화과정 이후의 신경절단의 모델은 신경의 다리 성장과 발육에 관한 직접적인 영향에 대한 관찰이 가능하다(Dietz 1989).

신경절단과 관련되어 그 결과를 달리하는 여러 보고가 있다. 어떤 연구자들(Tower 1937, Gillespie 1954, Popiela 1976)은 신경절단이 다리의 발육에 영향을 주지 못한다고 하였고, 일부 연구자들(Hamburger 1939, Hamburger와 Waugh 1940, Armstrong 1946, Dietz 1989)은 신경절단이 뼈의 크기에 영향을 준다고 하였다. 아주 드물게 신경절단후에 뼈의

성장이 증가하였다는 보고도 있다(Ring 1961). 그러나 많은 연구들이 다리분화 이전에 이루어진 신경절단의 영향에 관한 연구였고(Hamburger 1939, Hamburger와 Waugh 1940, Popiela 1976, Strecker과 Stephens 1983), 다리의 분화가 끝난 후 미성숙상태의 실험동물을 이용한 연구는 그리 많지 않다(Howell 1917, Tower 1937, Armstrong 1946, Dietz 1987, 1989).

본 연구는 뒷다리가 분화된 후에 성숙단계에 있는 *Hymenochirus*의 궁둥신경 절단이 뒷다리 뼈의 성장에 어떤 영향을 주는지를 알아보고자 시도되었다.

재료 및 방법

본 연구에 사용된 재료는 서아프리카에서 서식하고 있는 개구리인 *Hymenochirus boettgeri*이다. 이들은 통상적인 판매자를 거쳐 구입한 후 실험실내에서 배양하고 또 거기서 직접 얻은 개구리를 이용하였다. 여기에 사용된 개구리의 수는 모두 101마리였고, 이들은 모두 4군으로 분류하였으며 이들의 숫자는 아래와 같다(Table 1과 2).

Nieuwkoop와 Faber (1967)의 발생 및 발육단계 분류에 의해 Stage 63과 66때 신경절단을 시행하였다. Stage 63은 꼬리의 길이가 몸길이의 유사해지며, 입가장자리가 눈의 앞쪽에 위치하며 앞다리가 심장

의 머리쪽 절반 수준에 머무르는 것을 특징으로 하고 있다. Stage 66의 특징은 꼬리가 흡수되는 때이며, 배쪽(ventrally)에서는 꼬리의 끝이 전혀 보이지 않게 되는 시점이다.

정상군(normal group)은 가짜수술군(sham group)과 신경절단군(denervation group)과 같은 시기에 부화한 것을 같은 기간동안 배양한 개구리들이다.

신경절단군은 오른쪽 궁둥신경(좌골신경, sciatic nerve)을 절단한 개구리들이다. 신경절단을 위한 마취는 염소성분이 제거된 수돗물로 희석된 0.01% MS-222 (Sigma Chemical Co., USA)액 안에 *Hymenochirus*를 집어넣어 시행하였다. 같은 마취액안에서 담겨진 상태에서 오른쪽 넓적다리의 엉덩관절 근처에서 등쪽 피부를 절개한 후, 넓적다리근육사이에서 궁둥신경을 찾아 이들을 1 mm 정도를 떼어냄으로서 신경절단을 시행하였다.

또한 신경절단군에 대하여 피부절개에 의한 영향을 확인하기 위하여 가짜수술군을 따로 만들었다. 가짜수술군은 신경절단군에서와 같은 마취액으로 마취한 후에 신경절단군의 수술부위와 같은 쪽인 오른쪽 넓적다리의 엉덩관절 부위에 피부절개만 시행한 것으로 Stage 66에만 시행하였다. 이들 모든 과정은 입체경(stereoscope)하에서 시행하였다.

Stage 66때 수술한 개구리들은 전용면적과 물량 등이 같은 환경아래에서 6주와 12주씩 배양되었고 이들을 각각 Group I과 III로 분류하였다. 또한 Stage 63에 수술한 개구리도 같은 조건하에서 배양되었고 이들은 7주와 13주 동안 배양되어 각각 Group II와 IV로 분류하였다. 통상적으로 Stage 63에서 66까지의 배양기간은 약 1주 정도 소요되기 때문에 실제로 Group I과 II는 수술한 시점만 다를 뿐 관찰하려는 시점의 성장 시기는 비슷하였다. 수술한 모든 개구리는 수술부위의 뒷다리의 움직임이 없는 마비를 보여주었고 배양후에 이들의 마비는 부분적인 운동이 가능한 경우가 있었지만 대부분 마비가 유지되었다.

배양된 개구리는 0.1% MS-222에 마취한 후에 10% 중성으로 완충된 포르말린액에 적어도 1주 이상 고정하였다. 고정된 후에 피부와 내장 그리고 안구를 제거한 다음, 2일 이상 증류수로 수회 반복하

Table 1. Numbers and groups of control, sham and surgery animals

	Group I	Group II	Group III	Group IV
Control	8	5	8	9
Sham	5	—	5	—
Surgery	14	12	20	14

Table 2. Classification of the groups

	Group I	Group II	Group III	Group IV
Operation stage	66	63	66	63
Culture duration after operation (weeks)	6	7	12	13

여 세척한 후에 알콜로 탈수하였다. 탈수한 후에 알콜과 초산 혼합액에 용해된 alcian blue로 연골이 균등하게 염색될 때까지 4시간에서 24시간 동안 염색하였다. 염색을 유지고정하기 위하여 100% 알콜에 하루 동안 넣었다가 붕사(borax) 포화액에 3시간 동안 유지하였고 다시 H₂O₂를 조금 넣은 2% KOH용액에 앞뒤다리가 약간 흐느적거리고 근육조직이 투명해질려는 시점까지 수일간 유지하였다. 이들을 다시 Trypsin 용액에 개구리의 앞뒤다리가 흐느적거릴 때까지 수일간 유지하였다. 이들은 다시 0.5% KOH 용액에 포화된 (진한 자줏빛을 띠는 정도) alizarin red에 1일에서 3일간 앞뒤다리 뼈가 붉게 염색될 때까지 유지한 후에 증류수로 희석된 glycerine (glycerine: 증류수비율 1:3, 1:1, 3:1)으로 clearing 한 후에 glycerine에 담가 보관하였다. 이들의 모든 방법은 Dinerkus과 Uhler (1977) 그리고 Hanken과 Wassersug (1981)의 방법을 기초로 하였다.

모든 재료는 디지털카메라 (DSC-F707, Sony, Japan) 의해 모두 엎드린 자세 (prone position)로 촬영되었다. 이들의 사진자료는 영상분석기 (anaySIS[®] Auto, Soft Image System GmbH, Germany)을 이용하여 넓다리뼈의 길이와 면적, 그리고 정강뼈의 길이가 측정되었다. 측정된 값은 모두 평균값과 표준편차로 계산되었고, 왼쪽에 대한 오른쪽 (수술부위)의 비율을 계산하여 정상군에 대한 가짜수술군과 신경절단군을 각각 비교검토하였다. 각 군사이에는 통계상의 비교를 위해 Student "t"-test가 시행되었고, P 값이 0.05 이하인 경우에 한하여 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

모든 관찰이 끝난 개구리 중 신경절단군에서 2마리를 선택한 후에, 넓다리뼈 (대퇴골, femur)를 다시 함수시켜 glycol methacrylate resin에 포매한 후 이들을 Supercut (Leica 2165, Austria)을 이용하여 5 μm 두께의 절편을 얻어 toluidine blue로 염색한 다음 광학현미경으로 관찰하였다.

결 과

본 연구에서 관찰되는 모든 신경절단군은 수술부위의 다리의 운동장애와 육안적으로 구분되는 다리의 길이성장의 장애가 관찰되었다 (Figs. 1~10).

1. 넓다리뼈 길이

넓다리뼈의 길이의 평균비율값과 통계적 값은 Table 3과 같다. Group I의 경우 넓다리뼈의 길이의 양쪽비율 평균값은 정상군이 100.58 (±1.59)이었고, 같은 시기의 가짜수술군은 100.83 (±1.05, 이하 괄호는 표준편차)이었으며 신경절단군은 93.71 (±3.34)이었다. 정상군과 가짜수술군의 비교에서는 차이를 보이지 않았고 ($p < 0.7648$), 정상군과 신경절단군 사이에서는 통계적 유의하였다 ($p < 0.0001$). Group II의 경우 정상군의 양쪽 넓다리뼈 길이비율은 100.11 (±1.11)이었고 신경절단군은 95.70 (±2.66)이었으며 이들 또한 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.0034$).

Group III의 경우 넓다리뼈 길이의 평균비율은 정상군이 100.99 (±0.77), 가짜수술군이 101.95 (±

Table 3. Ratio of right to left femur length

Classify		Group I	Group II	Group III	Group IV
Control	Ratio	100.58 (1.59)	100.11 (1.11)	100.99 (0.77)	100.05 (1.54)
	Ratio	100.83 (1.05)	—	101.95 (0.85)	—
Sham	P value	0.7648	—	0.0599	—
	Significant difference	No	—	No	—
Surgery	Ratio	93.71 (3.34)	95.70 (2.66)	96.12 (2.10)	96.06 (3.28)
	P value	<0.0001	0.0034	<0.0001	0.0021
	Significant difference	Yes***	Yes**	Yes***	Yes**

Significant difference: comparison between control and relevant groups values are expressed as the mean +/- SEM (n=5~20).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ when compared with the control using a Students t-test.

0.85) 그리고 신경절단군은 96.12 (±2.10)이었다. 수술후 6주된 Group I과 마찬가지로 정상군과 가짜수술군에서는 차이를 보이지 않았고 ($p < 0.0599$), 정상군과 신경절단군은 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.0001$). Group IV의 경우는 넙다리뼈 길이의 평균 비율이 정상군은 100.05 (±1.54)이었고 신경절단군이 96.06 (±3.28)이었으며 이들은 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.0021$).

2. 정강뼈의 길이

신경절단군의 정강뼈 (tibia)의 길이는 입체경하에서 쉽게 그 차이를 구분할 수 있었다. 모든 평균값과 통계적 수치는 Table 4와 같다.

Group I의 정상군의 왼쪽에 대한 오른쪽 정강뼈 (경골, tibia)의 비율 평균값은 100.71 (±0.80)이었고 가짜수술군은 100.36 (±0.83)이었으며 신경절단군은 94.05이었다. 넙다리뼈의 경우에서와 마찬가지로 정상군과 가짜수술군사이의 통계적 차이는 없었고, 정상군과 신경절단군 사이에서는 통계적 차이 ($p < 0.0001$)를 보여주었다. Group II에서는 정상군과 신경절단군의 평균값은 각각 100.31 (±1.71)과 96.15 (±2.36)이었고 이들은 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.0017$).

Group II에서는 정상군과 가짜수술군, 신경절단군의 정강뼈의 왼쪽에 대한 오른쪽의 비율은 각각 100.77 (±0.69), 100.74 (±0.79) 그리고 98.12 (±1.84)이었다. 정상군과 가짜수술군의 통계적 차이 ($p < 0.8783$)는 없었고, 정상군과 신경절단군 사이에는 통계적 차이 ($p < 0.0001$)를 보여주었다. Group IV

의 경우, 정상군과 신경절단군의 평균값은 각각 99.98 (±1.72)과 98.12 (±1.84)이었고 이들은 통계적인 차이 ($p = 0.0474$)를 보여주었다.

정강뼈의 왼쪽-오른쪽의 길이비율 평균값은 넙다리뼈의 경우보다 약간 높은 수치를 보였고 Group I과 II에서 보다 Group III와 IV에서 약간 더 높았다.

3. 넙다리뼈의 평면적

넙다리뼈의 평면적은 alizarine red와 alcian blue로 각각 염색된 뼈와 연골을 영상분석기에서 삼색감지 프로그램을 이용하여 선택된 부위를 산출한 후, 이들을 왼쪽에 대한 오른쪽의 값의 비율을 계산하여 평균값을 각 군별로 산출하였다 (Table 5).

Group I에서 정상군과 가짜수술군, 신경절단군의 왼쪽에 대한 오른쪽의 평면적비율의 평균값은 각각 99.26 (±0.73)과 100.09 (±0.69), 90.43 (±1.51)이었다. 정상군에 대한 가짜수술군의 비교는 통계적으로 차이를 보이지 않았으며 ($p < 0.4579$), 정상군과 신경절단군 사이의 비교에서는 통계적으로 유의하였고 ($p < 0.0004$), Group II의 경우에서도 정상군과 신경절단군은 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.0011$).

Group III에서는 정상군의 평균값은 101.13 (±0.40)이었고, 가짜수술군은 101.13 (±0.75)이었으며 신경절단군은 96.08 (±0.49)이었다. 정상군과 가짜수술은 통계적으로 차이를 보이지 않았고 ($p < 0.4956$), 정상군과 신경절단군은 차이를 보였다 ($p < 0.0001$). Group IV에서는 정상군과 신경절단군의 평균값은 각각 99.75 (±0.41)과 95.73 (±1.08)이었고, 두 값의 비교에서 Group III에서와 마찬가지로 통계

Table 4. Ratio of right to left tibia length

Classify		Group I	Group II	Group III	Group IV
Control	Ratio	100.71 (1.80)	100.31 (1.71)	100.77 (0.69)	99.98 (1.72)
	Ratio	100.36 (0.83)	—	100.74 (0.79)	—
	P value	0.6911	—	0.8783	—
Significant difference		No	—	No	—
Surgery	Ratio	94.05 (2.43)	96.15 (2.36)	98.12 (1.84)	98.22 (1.94)
	P value	<0.0001	0.0017	<0.0001	0.0473
	Significant difference	Yes***	Yes**	Yes***	Yes*

Significant difference: comparison between control and relevant groups values are expressed as the mean +/- SEM (n=5~20).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ when compared with the control using a Students t-test.

Table 5. Ratio of right to left femur area

Classify		Group I	Group II	Group III	Group IV
Control	Ratio	99.26 (0.73)	100.11 (0.70)	101.13 (0.40)	99.75 (1.41)
	Ratio	100.09 (0.69)	—	101.68 (0.75)	—
Sham	P value	0.4579	—	0.4956	—
	Significant difference	No	—	No	—
Surgery	Ratio	90.43 (1.51)	95.61 (0.65)	96.08 (0.49)	95.73 (1.08)
	P value	0.0004	0.0011	< 0.0001	0.0091
	Significant difference	Yes***	Yes**	Yes***	Yes**

Significant difference: comparison between control and relevant groups values are expressed as the mean +/- SEM (n=5~20).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ when compared with the control using a Students t-test.

적으로 유의하였다 ($p < 0.0091$).

4. 넓다리뼈의 현미경적 관찰

이미 alcian blue와 alizarine red로 염색된 조직의 일부인 Group III중 두 경우에서 넓다리뼈를 세로로 절단하여 절편을 얻은 후 toluidine blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 왼쪽과 오른쪽의 넓다리뼈 뼈몸통(diaphysis)의 골수 공간과 연골이 공존하는 골화가 진행중이었으며 뼈끝(epiphysis)은 대부분 연골세포로 구성되어 있었고 뼈끝판(epiphyseal plate)의 형성은 몸쪽(근위부, proximal)과 먼쪽(원위부, distal) 모두에서 관찰할 수 없었다. 세로로 절단한 치밀뼈의 형태도 왼쪽과 오른쪽의 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 왼쪽의 몸쪽 몸통의 연골은 대부분 비대층으로 채워져 있어서 뼈끝과 구분이 되어 있었으며, 뼈끝의 일부에서는 골화과정이 관찰되었다(Fig. 11). 오른쪽의 경우는 뼈몸통의 몸쪽의 연골이 예비층, 증식층 및 비대층이 구분되는 전형적인 발육단계의 연골을 보여주었고, 뼈끝도 모두 연골세포로 구성되어 있었다(Fig. 12).

고 찰

Humburger (1928)는 척수의 일부를 절제 또는 절개한 후에 신경차단모델을 만들어서 신경차단된 다리의 길이가 10% 이하의 감소를 보였다고 보고하였고, Strecker와 Stephens (1983)는 닭배자 모델에서 5% 이하의 감소를 보인다고 보고한 바 있다. 그러나

Poliela (1976, 1978)은 *Amblystoma maculatum* 배아의 중추신경 수준에서 신경차단된 모델에서 다리 성장에 대한 영향이 없다고 보고하였다. Dietz (1989)는 *Rana pipiens*의 신경절단 모델에서 정강뼈신경이 절단된 쪽의 정강뼈 성장이 5~17%의 감소한다고 보고하였다. 본 연구에서는 궁둥신경이 절단된 뒷다리의 넓다리뼈는 2~6%가량 감소하였고 정강뼈의 경우는 4~9%가량 감소하였다. 다만 신경절단후 6주(Group I)와 7주(Group II)된 경우가 12주(Group III)와 13주(Group IV)된 경우보다 그 비율차이가 심하였던 점은 시간이 경과하면서 그 비율의 폭이 좁아졌음이 넓다리뼈와 정강뼈 모두에서 관찰되었다. 이러한 결과는 신경절단에 의한 뼈성장의 지연이 시간이 지나면서 회복되는 과정을 보여주는 것으로 사료되나, 본 연구의 기간내에서는 정상군과 통계적 유의를 보여주고 있다.

뼈의 불사용 위축(disuse atrophy)은 주로 신경절단, 건절개, 관절절제, 관절의 고정 등에 의해 일어나며, 이들은 골내막의 재흡수에 의한다고 보고되었다(Howell 1917, Tower 1937, Gillespie 1954, Ring 1961). 본 연구에서 관찰된 신경절단된 뒷다리는 대부분 운동이 불가능한 마비를 보였으며(일부는 부분적인 회복을 보였음에도 불구하고) 근육의 성장도 반대편에 비하여 줄었던 점(결과내용에는 없음)은 뼈의 성장에 신경절단의 직접적인 영향과 더불어 근육의 마비에 의한 불사용 위축의 가능성도 배제하지 않을 수 없다고 사료된다. 지금까지의 연구들은 다리의 신경은 성장인자를 생산하고 분비하는 기능을 통해 다른 조직의 성장에 일차적인 영향을

줄 것으로 추측하였고, 근육마비나 관절의 운동불능 등의 이차적인 문제를 야기함으로써 불사용 위축을 일으킬 수 있다고 추측하고 있다. Dietz (1989)는 표범개구리 (*Rena pipiens*)의 신경절단 모델에서 정강뼈의 세로절단 절편을 관찰한 바, 대부분의 경우에서 겉질(cortex)의 협소(narrowing)가 관찰되지 않아 불사용 위축은 아닐 것으로 추측하였다. 이에 대한 더 구체적인 접근을 위해서는 다리분화후 성장과정에서 이루어진 신경절단 모델과 더불어 근육이나 관절의 손상 모델을 개발하여 함께 연구비교하여야 할 부분이라고 사료된다. 한편, 본 연구에서 피부절개에 의한 성장에 대한 영향을 비교하기 위하여 시행하였던 가짜수술군은 정상군과 차이를 보이지 않아서 단순한 피부절개는 뼈의 성장에 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다.

신경과 같은 특별한 조직이 다리의 발육과 성장에 필요한 어떤 성장인자를 생산하고 분비하여 근육과 같은 다른 조직에 영향을 줄 수 있다는 보고들은 다리의 발육과 성장에 대한 구성조직의 상호관계성을 제시하였다 (Destipande 1976, Markelonis와 Oh 1979, Davis과 Kiernan 1980, Markelonis 등 1980, Davis 1983, Popiela 등 1984). 정상적인 성장에서 이러한 인자들의 중요성은 아직 알려져 있지 않지만 (Toenen과 Edger 1985), 국소적으로 생산된 성장인자들의 중요성은 몇몇 연구자들 (Kream과 Kream 1983, Canalis 1985, Gilbert 1985)에 의해 제시되고 있다. 본 연구의 자료로서는 신경의 직접적이고 일차적인 영향과 다른 조직의 기능마비(근육마비와 근위축, 관절의 부동 등)에 의한 이차적인 영향에 관해 구분할 수 없으나 신경절단이 뼈의 성장과 성숙에 직접적인 영향을 줄 것으로 추측된다. 신경의 일차적인 영향과 이차적인 영향을 모두 고려해야만 함에도 불구하고, 만일에 신경의 뼈성장에 대한 일차적인 영향이 사실이라면 신경의 과도한 활동은 뼈의 국소적인 이상발육을 유발할 수도 있음을 추측할 수 있고 임상에서 관찰되는 특별성 다리 성장장애와 같은 성장장애의 발생에 대한 기전을 어느 정도 이해하게 될 수도 있을 것으로 추측된다.

Dietz (1987)는 단위평면적당 골세포의 숫자는 정

상군과 신경절단군에서 차이는 없으나 골세포 농도는 신경이 절단된 쪽에서 더 높다고 보고하였다. 또한 Dietz (1987, 1989)는 신경절단된 다리에서 연골원기(cartilage anlage)의 지속과 연골에 대한 뼈의 비율에 대한 관찰을 통해 신경절단이 뼈의 성장지연을 일으킨다고 추측한 바 있다. 본 연구에서 광학현미경으로 관찰한 신경절단군의 양쪽의 넙다리뼈의 비교에서 넙다리뼈 뼈몸통의 몸쪽내 연골의 골화과정이 차이를 보여주었으며 이는 Dietz (1987, 1989)의 연구와도 상통한다. 본 연구에서 넙다리뼈의 평면적에 대한 비율은 약 4~10%의 감소를 보였던 점은 세포의 치밀도에 영향을 받았을 것으로 사료되나 본 연구에서 관찰된 광학현미경적 소견은 alcian blue와 Alizarin red로 염색된 후 다시 포매하여 관찰한 조직이기 때문에 그 조직의 보존이 좋지 못하였던 점을 감안한다면 추후 여기에 대한 연구가 뒤따라야 할 것으로 사료된다.

Dietz (1989)는 신경절단에 의한 뼈성장의 영향은 신경절단 시점이 빠를수록 그리고 신경절단의 정도에 따라 영향을 준다고 하였고, 뼈의 성장중에 특정 시기에 뼈의 길이를 결정하는 임계시기(critical period)가 있을 것으로 추측하였다. 본 연구에서는 Stage 63과 66 두 시기에 수술을 시행하였고 관찰시점은 비슷한 성장시기에 관찰하였다. 본 연구만으로서 성장시기의 임계시기는 알 수 없으나 본 연구에서 성장함에 따라 양쪽의 발육차이가 점차 줄었던 점은 추후 성장이 끝난 후까지 관찰하는 것이 필요할 것으로 사료되며, 보다 다양한 시기에 신경절단을 시행할 수 있다면 뼈성장의 임계시기도 추정할 수 있으리라 생각된다.

Gillespie (1954)와 Ring (1961) 등은 거의 성숙단계에 있는 실험동물에서 신경절단이 뼈의 길이에 영향을 주지 못한다고 보고하였다. 본 연구에서 보여주는 *Hymenochyris*의 뼈의 성장에 대한 신경절단의 연구모델은 Stage 63과 66 모두에서 그 결과를 얻을 수 있었던 점은 추후 이와 관련된 연구에서 신경절단의 시기의 적절성을 제공해 줄 수 있다고 생각한다. 그러나 본 연구에서도 예비실험중에 분화과정중에 있는 뒷다리의 신경절단을 시도해 보았으나 단순한 입체경하에서 신경만을 찾아 절단하는

것은 쉽지 않아 혈관과 같은 신경이외의 조직에서 손상을 입혔던 관계로 본 연구에서는 Stage 63과 66 두 시기에 수술한 것들만을 실험결과에 사용하였다. 따라서 이와 같은 신경절단과 뼈 성장에 관한 연구는 다른 조직의 손상을 최소화하면서 적절한 뼈의 성장시기의 선택이 중요하다고 생각된다.

참 고 문 헌

- Armstrong MD : Bone growth in paralyzed limbs. Proc Soc Exp Biol Med 61: 358-362, 1946.
- Canalis E : Effects of growth factors on bone cell replication and differentiation. CORR 193: 246-263, 1985.
- Davis HL : Trophic action of nerve extract on denervated skeletal muscle in vivo : dose dependency, species specificity, and timing of treatment. Exp Neurol 80: 383-394, 1983.
- Davis HL, Kiernan JA : Neurotrophic effects of sciatic nerve extract on denervated extended digitorum longus muscle in the rat. Exp Neurol 69: 124-134, 1980.
- Destipande SS, Albuquerque EX, Guth L : Neurotrophic regulation of prejunctional and postjunctional membrane at the mammalian motor endplate. Exp Neurol 53: 151-165, 1976.
- Dietz FR : Effect of peripheral nerve on limb development. J Orthop Res 5: 576-585, 1987.
- Dietz FR : Effect of denervation on limb growth. J Orthop Res 7: 292-303, 1989.
- Dingerkus G, Uhler LD : Enzyme clearing of Alcian blue stained whole small vertebrate for demonstration of cartilage. Stain Technol 52: 229-232, 1977
- Gilbert SF : Mechanisms of cellular differentiation: progressive determination, In: Developmental Biology, Sunderland, Massachusetts : Sinauer Associates, pp 237-268, 1985.
- Gillespie JA : The nature of the bone changes associated with nerve injuries and disuse. J Bone Joint Surg Br 36: 464-473, 1954.
- Gray DH, Kath JM : A histochemical study of muscle in clubfoot. J Bone Joint Surg Br 63: 417-423, 1981.
- Hamburger V : Die Entwicklung experimentell erzeugter nervenloser und schwach innervierter extremitäten von Anuren, Archiv Entw-Mech 114: 272-363, 1928 (cited from Dietz). 1987.
- Hamburger V : The Development and innervation of transplanted limb primordia of chick embryos. J Exp Zool 80: 347-385, 1939.
- Hamburger V, Waugh M : The primary development of the skeleton in nerveless and poorly innervated limb transplants of chick embryos. Physiol Zool 13: 367-379, 1940.
- Hanken J, Wassersug R : The visible skeleton. Functional Photography 44: 22-26, 1981.
- Howell JA : An experimental study of the effect of stress and strain on bone development. Anat Rec 13: 233-253, 1917.
- Kream R, Kream B : The bone-regulating hormones : An update. Hosp Pract 47-53, 1983.
- Markelonis G, Oh TH : A sciatic nerve protein has a trophic effect on development and maintenance of skeletal muscle cells in culture. Proc Natl Acad Sci USA 76: 2470-2474, 1979.
- Markelonis G, Oh TH, Derr D : Stimulation of protein synthesis in cultured skeletal muscle by a trophic protein from sciatic nerves. Exp Neurol 70: 598-612, 1980.
- Nicholas JS : The correlation of movement of nerve supply to transplanted limb of amblystoma. J Comp Neurol 57: 253-283, 1933.
- Nieuwkoop PD, Faber J : Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin), 2nd Ed. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1967.
- Popiela H : In vivo limb tissue development in the absence of nerves : A quantitative study. Exp Neurol 53: 214-226, 1976.
- Popiela H : Trophic effects of adult peripheral nerve extract on muscle cell growth and differentiation in vitro. Exp Neurol 62: 405-416, 1978.
- Popiela H, Taylor D, Ellis S, Beach R, Festoff B : Regulation of mitotic activity and the cell cycle in primary chick muscle cells by neurotrophin. J Cell Physiol 119: 234-240, 1984.
- Ring PA : The influence of the nervous system upon the growth of bones. J Bone Joint Surg 43: 121-140, 1961.
- Strecker TR, Stephens TD : Peripheral nerves do not play a role in limb skeletal morphogenesis. Teratology 27: 159-167, 1983.
- Thoenen H, Edgar D : Neurotrophic factors. Science 229: 238-242, 1985.

Tower SS : Trophic control of non-nervous tissues by the nervous system: A study of muscle and bone innervated

from an isolated and quiescent region of spinal cord. J Comp Neurol 67: 241-267, 1937.

Legends for Figures

Group I. Frogs 6 weeks after stage 66, stained alcian blue and alizarin red. × 4

Fig. 1. A frog 6 weeks for control. Both hind limbs are alike.

Fig. 2. A frog for sham operated (skin incision only). Both hind limbs are alike.

Fig. 3. A frog for surgery. See the shortened right hind limb compared with left one.

Group II. Frog 7 weeks after stage 63, stained with alcian blue and alizarin red. × 4

Fig. 4. A frog for control.

Fig. 5. A frog for surgery. See the shortened right hind limb compared with left one.

Group III. Frog 12 weeks after stage 66, stained with alcian blue and alizarin red. × 3

Fig. 6. A frog for control.

Fig. 7. A frog for sham. This is similar to Fig. 6.

Fig. 8. A frog for surgery. See the straightening and shortening of the right hind limb. compared with left one.

Group IV. Frog 13 weeks after stage 63, stained with alcian blue and alizarin red. × 3

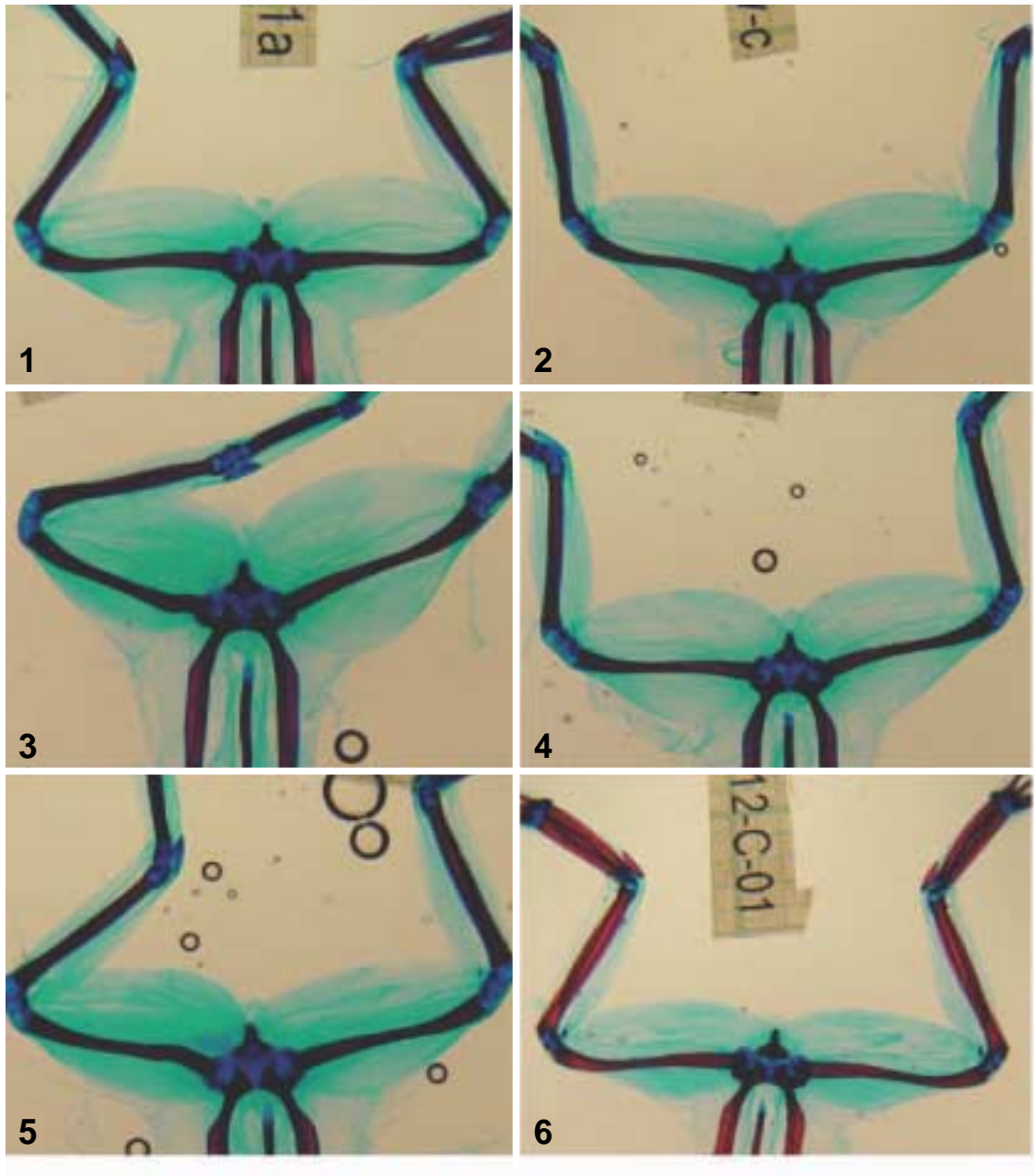
Fig. 9. A frog for control.

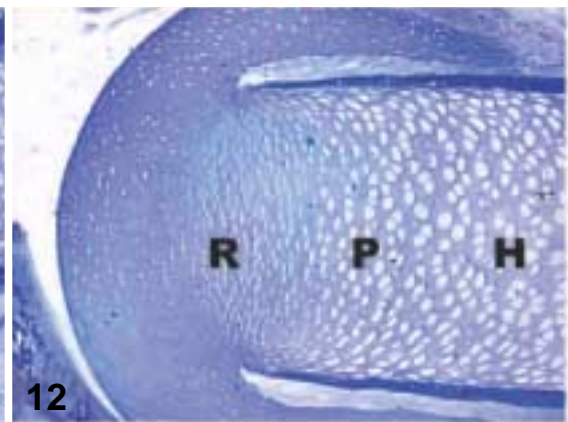
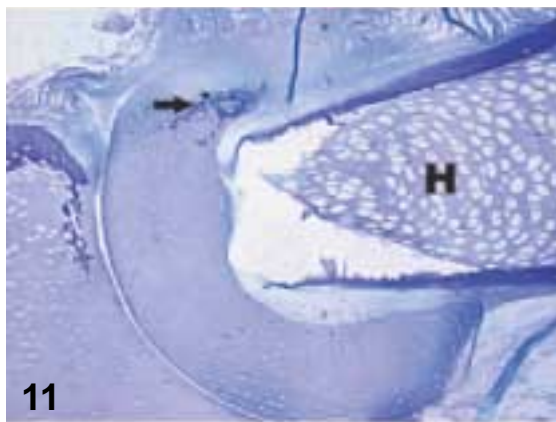
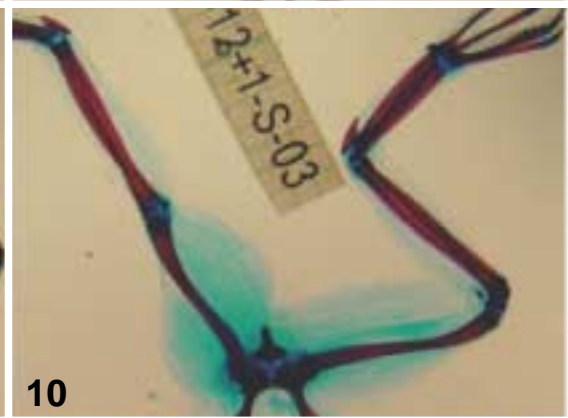
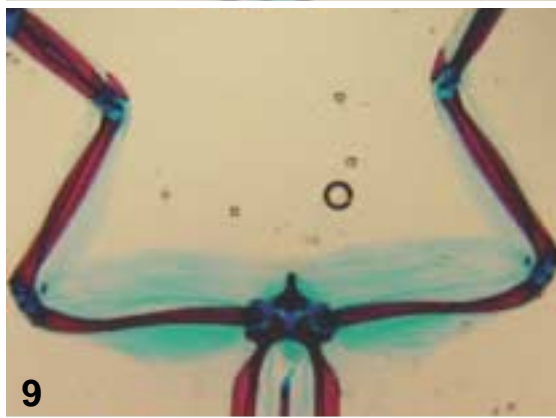
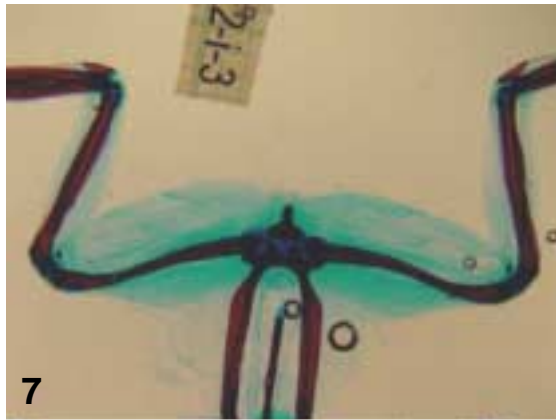
Fig. 10. A frog for surgery. See the straightened and shortened right hind limb compared with left one.

Light Microscopic View

Fig. 11. The proximal end of left (normal) femur of frog 12 weeks after stage 66 for surgery. Cartilage of proximal end of femur showed hypertrophied zone (H). Ossified cells (arrow) are shown in femoral head. Stained with toluidine blue. × 100

Fig. 12. A frog 12 weeks after stage 66 for surgery. Cartilage of proximal end of femur shows the reserve (R), proliferative (P) and hypertrophied (H) zones. Stained with toluidine blue. × 100





Abstract

Effects of Sciatic Denervation on Growth of Hind Limb Bones in *Hymenochirus boettgeri*

Jang-Shin Sohn, Hyoung-Tae Kim

Department of Anatomy, Medical School, Chonbuk National University

The effect of peripheral nerve on limb growth and maturation has received little attention after the limb differentiation stage. This study investigated the effects of paralysis (loss of function) on growth of bones in the hind limb of *Hymenochirus boettgeri*.

Complete denervation of the right sciatic nerve was performed at stages 63 and 66, animals were sacrificed after 6 and 7 (Groups I and II) and 12 and 13 (Groups III and IV) weeks. Denervation was assessed by degree of paralysis. Specimens were cleared and double stained with alcian blue and alizarin red for cartilage and bone. Length and area of right and left femurs and length of right and left tibia were measured by using an image analyzer program after photographing, and the ratio of right to left femur length and area was calculated.

There were no gross morphological differences between the control and sham groups. In the experimental groups, the ratio of femur length was 93.71% and 95.70% in Group I and II, and 96.12% and 96.06% in Group III and IV. The ratio of tibia length was 94.05% and 96.15% in Group I and II, and 98.12% and 98.22% in Group III and IV. The ratio of femur area was 90.43% and 95.61% in Group I and II, and 96.08% and 95.73% in Group III and IV. Comparison between control and experimental groups showed statistically significant ($p < 0.05$). There was a histologically maturational delay in proximal end of denervated hind limb, comparing with opposite side.

These results suggested that denervation of sciatic nerve affect directly the growth and maturation of hind limb bones in *Hymenochirus boettgeri* and loss of critical period of bony maturation after denervation.

Key words : Denervation, Bone Growth, *Hymenochirus boettgeri*, Sciatic nerve