

흰쥐의 궁둥신경 압케손상 후 운동훈련이 근육 재생에 미치는 영향에 관한 조직화학적 연구

조 현 래, 유 기 수

동아대학교 의과대학 해부학교실

간추림 : 말초신경병증에서 운동이 뼈대근육 재생에 미치는 영향에 대해 논란이 많다. 본 연구의 목적은 흰쥐의 궁둥신경에 압케손상을 준 뒤 일정기간 트레드밀에서 달리기운동을 시켜 운동이 근육재생에 효과가 있는지를 밝힐 목적으로 시행하였다.

1개월(체중 150~180 g)된 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐의 궁둥신경을 노출시킨 다음 지혈집게로 3분간 압케손상을 주었다. 각 실험군 별로 하루 60분 씩 주 5회 운동을 시켰으며, 트레드밀의 경사도는 10도, 속도는 20m/분이었다. 궁둥신경 압케손상 후 12일(5일간 운동), 19일(10일간 운동), 26일(15일간 운동), 33일(20일간 운동) 및 61일(40일간 운동)에 흰쥐를 희생시켜 장딴지근을 절취하여 냉동절편을 만들었으며 근육섬유에 대한 느린 미오신(slow myosin) 면역조직화학적 염색과 NADH-TR 효소조직화학 염색을 통상적인 절차에 따라 시행하였다.

압케손상 후 12일째와 19일째에서 실험군의 흰쥐들이 대조군의 흰쥐보다 근육섬유의 위축이 심하였고, 33일째에서 실험군의 흰쥐들은 각진 모양의 근육 섬유들이 관찰되었으며, 61일째에서 정상근육에 가깝게 회복되었으나 대조군의 흰쥐는 그렇지 못했다.

압케손상 후 26일째 운동군에서 II형 섬유의 중심에서 재신경지배가 되는 것이 관찰되었다. 손상 후 33일째에는 거대한 II형 섬유들이 관찰되었고, 재신경지배근육의 특성이라 할 수 있는 동일 근육섬유 군집현상이 나타났고, 61일째에는 정상근육에 가까운 근육섬유의 조성비를 보였다. 대조군에서는 손상 후 33일째에 거대한 II형 섬유들이 보이기 시작하였으나, 61일째에는 정상근육에 이르지 못하는 못하였다.

이상의 결과로 흰쥐의 궁둥신경에 압케손상을 준 후 트레드밀을 이용한 달리기 운동은 근육재생에 효과적인 도움을 준다고 생각된다.

(2009년 6월 5일 접수, 2009년 6월 16일 수정접수, 2009년 6월 22일 게재승인)

찾아보기 낱말 : 궁둥신경 압케손상, 근육재생, 트레드밀 운동, 미오신, NADH-TR

서 론

뼈대근육은 손상 요인에 따라 근육섬유의 변성, 위축 및 재생시의 조직화학적 변화가 다양한 것으로 알려져 있다(Carlson 1973, Grounds 등 1992). 뼈대근육을 지배하는 신경을 절단하거나 압케손상을 주면 일차적으로 신경에 괴사가 일어나며 이차적으로 근육섬유의 변성이 일어난다(Kapoukranidou 등

2005). 외상으로 인한 말초신경손상이나 소아마비, 근육병 등 신경근육질환에서 적용할 수 있는 치료 방법은 제한되어 있으며, 임상에서 흔히 전기자극이나 운동이 적용되고 있다. 그러나 전기 자극에 의해 근육수축을 유발하여 충분한 장력을 발생시키기 어렵기 때문에 역학적 부하(mechanical loading)를 이용하는 것이 더 효과적이며 그 중 운동이 기본적인 치료방법의 하나로 알려져 있다(Dobkin 2008).

실험동물을 이용한 운동치료에 대한 연구는 보통 흰쥐나 마우스를 이용하며 운동방법으로는 트레드

교신저자 : 유기수(동아대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편 : ksyoo@dau.ac.kr

밀과 수영법을 사용하고 있다. 대부분의 연구자들이 축삭의 과성장, 직경이나 수의 증가, 근육 내 크레아틴 양의 증가, 근육의 무게 증가 등의 결과를 통해 운동치료의 효과에 대하여 긍정적으로 보고 있지만 (McAllister 등 1997), van Meeteren 등(1998)은 운동 강도가 높은 트레드밀훈련이나 운동 강도가 낮은 수영은 손상된 신경의 회복에 부정적인 영향을 주는 것으로 보고하고 있으며, Herbison 등 (1982)도 흰쥐에서 신경 손상 후 과도한 운동을 시키면 근육 단백질의 감소와 함께 근력이 감소한다고 보고하여 상반된 견해를 보인다.

근육의 재생과정은 근육발생 과정을 반복한다. 근육이 손상되면 근육형질막과 기저막사이에 위치한 근육위성세포 (myosatellite cell)가 근육모세포 (myoblast)로 분화된다. 근육모세포들은 융합되어 근육대롱세포 (myotube)를 형성하고 이어 성숙한 근육섬유로 재생된다 (Best와 Hunter 2000).

뼈대근육은 신체의 움직임과 운동의 실행기관이기 때문에 뼈대근육의 약화는 운동을 제한시키고, 운동의 제한은 뼈대근육의 약화를 심화시키는 악순환을 되풀이한다. 따라서 근육섬유의 약화 방지 및 뼈대근육의 능력 향상을 목적으로 운동을 실시한다. 뼈대근육을 강화시키는 운동의 유형은 크게 지구력 운동과 웨이트 트레이닝으로 구분하며, 운동의 2가지 유형 중 유산소 운동 즉 지구력 운동은 뼈대근육 내 모세혈관 및 사립체의 밀도와 수를 증가시킬 뿐만 아니라 근육섬유의 성장이나 전환을 유도한다 (Satin과 Gollnick 1983). 지구력 트레이닝에 의해 성장과 재생이 유도되는 동안 뼈대근육 섬유에서는 근육섬유의 전구세포인 근육위성세포가 활성화 된다. 즉, 위성세포는 운동을 하는 동안 증식과 분화가 이루어져 근육모세포 및 근육대롱세포를 형성하고, 내재하고 있는 근육섬유 속으로 융합됨으로써 근육섬유의 성장 및 재생을 촉진하게 된다 (Kadi 등 1998).

뼈대근육을 구성하는 근육섬유는 어떠한 형태의 근육원섬유를 많이 가지고 있느냐에 의하여 적색근육 (red muscle)과 백색근육 (white muscle)으로 나눌 수 있다. 생리학적 또는 조직화학적 측면에서 근육

섬유를 구분하려고 할 때에는 산과 알카리에서 활성화되는 섬유들을 근육원섬유의 ATPase의 활성도에 따라 느린 미오신 (slow myosin)으로 구성된 I형 섬유 (type I fiber)와 빠른 미오신 (fast myosin)으로 구성된 II형 섬유 (type II fiber)로 구분한다 (Brooke와 Kaiser 1970).

단일 뼈대근육 내 섬유형에 따라서도 탈신경 위축의 정도가 다른 것으로 보고되고 있는데, Jaweed 등(1975)은 압박 후 2주까지의 탈신경 초기에는 느린 근육인 가자미근의 경우 I형 섬유는 II형 섬유보다 약간 더 또는 같은 정도로 위축된 반면 빠른 근육인 장딴지빗근의 II형 섬유는 I형 섬유보다 많이 위축되었음을 보고하였다.

근육수축의 정도와 양상은 이를 지배하는 신경신호의 유형이나 신경에 가해지는 직접적인 전기 자극에 의해 변화하여 근육섬유의 성질에 많은 영향을 미친다는 사실이 여러 연구에 의해서 입증되고 있다. 빠른 운동단위에 의해 지배를 받던 근육섬유 일지라도 근육이 느린 운동단위를 동원시키는 신경 자극을 지속적으로 받게 된다면, 자극을 받는 근육섬유의 성질은 느린 운동단위의 성질을 갖게 되는 반면에 느린 운동단위로 구성된 근육섬유에 고주파의 자극을 지속한다면 해당 근육섬유는 빠른 운동단위의 특성으로 전환된다고 보고하고 있다 (Ausoni 등 1990). 또한 6주간의 전기자극 트레이닝에 의하여 MHC (myosin heavy chain) mRNA isoform들이 빠른 근육섬유에서 느린 근육섬유로 변화된다고 보고하고 있다 (Brownson 등 1992).

Jansson 등(1978)은 지구성 운동을 실시한 연구에서 II형 섬유가 I형 섬유로 변환된다고 하였다. 또한 지구성 운동을 많이 하는 마라톤 선수들은 주로 I형 섬유의 비율이 높으며, 스프린트 훈련을 많이 하는 단거리 선수들은 II형 섬유가 상대적으로 많다고 보고하였다 (Costill 1976).

이에 본 연구자들은 흰쥐 궁둥신경에 압제손상을 준 후 트레드밀을 이용하여 지구력 운동훈련을 시킨 뒤 시기에 따른 탈신경근육의 회복과 성장과정에서 근육섬유의 형태적, 면역조직화학적, 효소조직화학적 변화를 관찰하여 운동훈련이 이 탈신경근육

의 재생에 미치는 영향을 밝혀 임상에서 운동치료 프로그램을 수립하는 데 도움을 주고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험동물은 항온 항습이 유지되고 12시간마다 밤낮이 교체되며 사료와 물을 자유로이 섭취할 수 있는 동일한 조건하에서 사육한 생후 1개월(150~180g)된 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley) 22마리를 실험군(10마리)과 대조군(10마리) 그리고 정상군(2마리)으로 사용하였다.

2. 운동방법과 실험군

실험군 흰쥐들을 이중 트레드밀(Dual treadmill, model DJ2-2429, 대종기기)을 이용하여 신경손상 후 1주일 동안은 하루에 30분 씩 18m/분 속도로 적응 훈련을 시켰다. 각 실험군 별로 하루 60분 씩 주 5회 운동을 시켰으며, 트레드밀의 경사도는 10도, 속도는 20 m/분(50%의 Vo_2 max)이었다(Garvin과 Wanger 2001).

실험군은 궁동신경 압케손상 후 경과한 일수를 기준으로 손상 후 12일(5일 운동)군, 손상 후 19일(10일 운동)군, 손상 후 26일(15일 운동)군, 손상 후 33일(20일 운동)군, 손상 후 61일(40일 운동)군으로 분류하였고, 각 실험군마다 2마리 씩 운동시켰다. 각 실험군의 대조군으로 압케손상을 준 후 운동을 시키지 않은 흰쥐 2마리 씩을 사용하였다. 또한 압케손상과 운동을 시키지 않은 흰쥐 2마리를 정상군으로 사용하였다.

3. 압케손상방법 및 근육조직 절취

3.5% chloral hydrate (1 mL/100 g)로 복강내 주사하여 동물을 마취시킨 뒤 오른쪽 궁동부분의 피부를 절개하여 궁동신경을 노출시켰다. 궁동뼈절절 수준에서 궁동신경을 지혈집계의 끝에서 5mm 안쪽에 표식을 하여 동일한 압력(4.7 kg/cm²)으로 30초간

연속적 적용하여 압케손상을 주었다(De Koning 등 1986).

손상 후 12, 19, 26, 33, 61일째에 희생시켜 각 근육의 조직을 절취하였다. 근육조직은 흰쥐의 오른쪽 장딴지근을 이용하였고, 각 근육은 이눈곳(origin)과 닿는곳(insertion)의 중간부위를 선택하였다.

4. 조직절편제작

3.5% chloral hydrate (1 mL/100 g)를 복강내 주사하여 흰쥐를 마취시킨 상태에서 근육을 절취한 후 즉시 gum tragacanth를 이용하여 콜크로 된 받침대에 접촉시켰다. 근육조직을 액체질소(liquid nitrogen)로 미리 -160°C로 냉각한 isopentane에 넣어 약 10초간 동결고정하였다. 동결고정된 근육조직편을 동결절편기(cryocut, Reichert-Jung, Germany)를 사용하여 약 6μm 두께로 조직절편을 만들고 절편을 poly-L-lysine coated slide에 부착시켰다. 조직절편을 40°C의 조직 신전기(slide warmer)에서 40분 정도 충분히 건조시킨 다음 아세톤(4°C)으로 15분간 고정하였고, 이를 다시 조직 신전기에서 2시간 이상 건조시켰다.

5. 염색

H & E 염색을 하기 위하여 조직절편을 paraformaldehyde(PFA)에 5분 동안 고정 시킨 후, PBS로 10분 동안 2회 세척한 후에 Harris hematoxylin solution에 5분 염색한 후 흐르는 물에 수세하였다. 조직을 1% HCl에 1초간 담갔다 재빨리 꺼내 흐르는 물에 수세한 후, 암모니아수로 30초간 중화시킨 다음 흐르는 물에 5분간 수세하였다. 이어서 Eosin solution에 1분간 염색시킨 후 흐르는 물로 수세하였고, 50% 에틸알코올에서 1분, 100% 에틸알코올에 1분씩 탈수 시키고 100% xylene에 5분간 투명과정을 거치게 한 다음 Canada balsam으로 봉입하였다.

면역조직화학적 염색을 하기 위하여 조직절편을 0.02 M 인산염 완충액(phosphate buffered saline; PBS, pH. 7.4)에서 약 10분 동안 2회 세척한 후 조직 내 과산화효소의 활성을 차단하기 위해 0.3% 과

산화수소(H₂O₂)가 포함된 메틸알코올을 첨가시킨 용액에서 20분간 처리하고, PBS로 10분간 3회 세척한 다음 5% 정상 말혈청(normal horse serum)에 30분간 유치하였다. 그 후 조직절편을 세척하지 않고 가볍게 털어 낸 다음 일차항체인 mouse anti-rat slow myosin antibody (희석비율 1 : 200, Sigma)를 4°C에서 14~16시간 동안 각각 적용시켰다.

일차항체를 적용시킨 뒤 PBS로 10분씩 3회 세척하였고, 이어서 이차항체인 biotinylated horse anti-mouse IgG (희석비율 1 : 200, Vector Lab)를 실온에서 1시간 동안 적용시켰다. 그 후 조직절편들을 PBS로 10분씩 3회 수세한 다음 30분 전에 미리 만들어 실온에 방치해 놓은 ABC (avidin-biotin horseradish peroxidase complex)용액 (Vector Lab)을 실온에서 1시간 동안 적용시켰다. 이어서 이들 조직절편을 PBS로 10분씩 3회 세척한 후, 0.05 M Tris-HCl buffer (Tris buffer, pH 7.6)에 0.05% 3,3'-DAB (diaminobenzene tetrahydrochloride; Sigma Co, USA)와 0.01% 과산화수소가 혼합된 용액으로 처리하여 약 10분간 실온에서 발색시켰다. 조직절편의 정색상태를 현미경하에서 확인한 후 Tris buffer, PBS 및 증류수로 각각 10분간씩 차례로 세척한 다음, Harris hematoxylin으로 대조염색을 하고, 통상적인 과정을 거쳐 Permount (Polysciences, Warrington, PA, USA)로 봉입하였다.

대조실험에서는 상기 면역염색과정 중 일차항체 적용과정을 생략하거나 ABC 용액 적용과정을 생략하였고, 이 과정을 거친 표본에서는 어떤 면역반응성도 나타나지 않아 면역염색의 특이성을 확인하였다.

또한, 효소조직화학적 염색을 하기 위하여 조직절편을 실온에서 20분 정도 말린 후 NADH-TR (nicotinamide adenine dinucleotide tetrazolium reductase)에 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 Acquimount (Polysciences)로 봉입하였다.

6. 검 경

근육조직의 검경은 광학현미경 (Axiophot, Zeiss)

으로 시행하였고, 사진은 디지털 카메라 (Axicam, Zeiss)로 촬영하였다.

결 과

1. 형태학적 변화

정상적인 장딴지근의 가로 절단된 근육섬유의 모서리는 각을 이루고 있었으나 (Fig. 1a), 신경손상으로 인해 위축된 근육섬유는 둥근모양을 하고 있었다 (Figs. 2a-6a). 신경손상 후 12일째와 19일째의 근육섬유에서 위축된 근육섬유 수는 실험군 (Figs. 2d-6d)보다 대조군에서 더 많았고 직경도 더 작았다 (Figs. 2a-6a). 위축된 근육섬유들은 대부분 중심핵 (central nucleus)을 갖고 있었다 (Figs. 2a-6a).

신경손상 후 33일째의 실험군 근육섬유는 정상에 가까운 형태를 취하고 있으나 (Fig. 5d) 대조군의 근육섬유에서는 둥근 모양을 하고 있었고 (Fig. 5a), 61일째의 실험군 근육섬유는 정상근육에 매우 가까운 형태였으나 (Fig. 6a), 대조군의 근육섬유에서는 몇 개의 각진 모양의 근육섬유가 관찰되었으나 정상근육에 도달하지는 못하였다 (Fig. 6a).

2. 면역조직화학적 변화

1) 정상군

정상적인 장딴지근의 가로 단면 조직절편에서 보이는 I형 섬유에서 느린 미오신 양성반응을 보이며, I형 섬유는 어둡게 염색되었고, II형 섬유는 밝게 염색되었다. 근육섬유들이 바둑판 모양 (checkerboard pattern)으로 서로 섞여 있음을 볼 수 있었다 (Fig. 1b).

2) 손상 후 12일(운동 5일)군

궁둥신경 압케손상 후 12일째 (5일간 운동)에서 대조군의 근육섬유는 심하게 위축된 근육섬유들을 갖고 있었으며, 가장자리가 불규칙한 예각 형태로 위축되었다. 또한 II형 섬유가 수적으로 감소되었다 (Fig. 2b). 실험군은 대조군에 비해 위축된 근육섬유

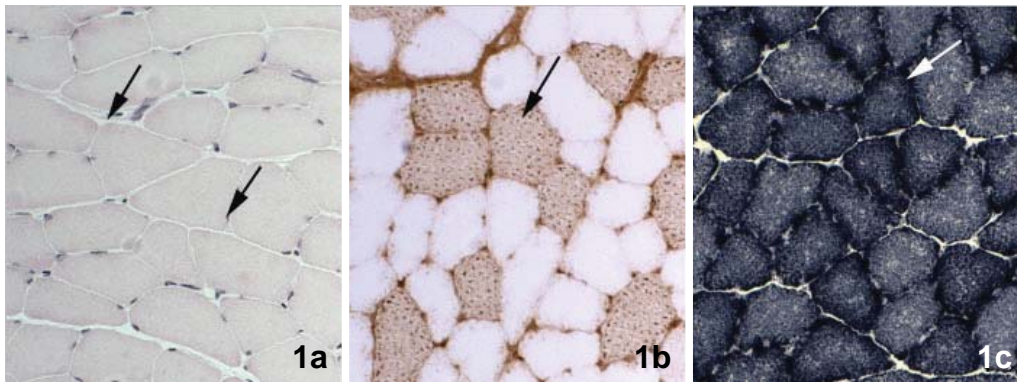


Fig. 1. Cross sectional muscle fibers of normal gastrocnemius muscle. It showed that the muscle fibers were angular form (1a, arrows). Strong reactive myofibers were type I fibers (arrow) and pale reactive myofibers were type II fibers (1b). More darkly stained fibers were type I fibers (arrow) and less darkly stained fibers were type II fibers (1c). H & E (1a), slow myosin (1b), NADH-TR (1c). Original magnification. $\times 250$.

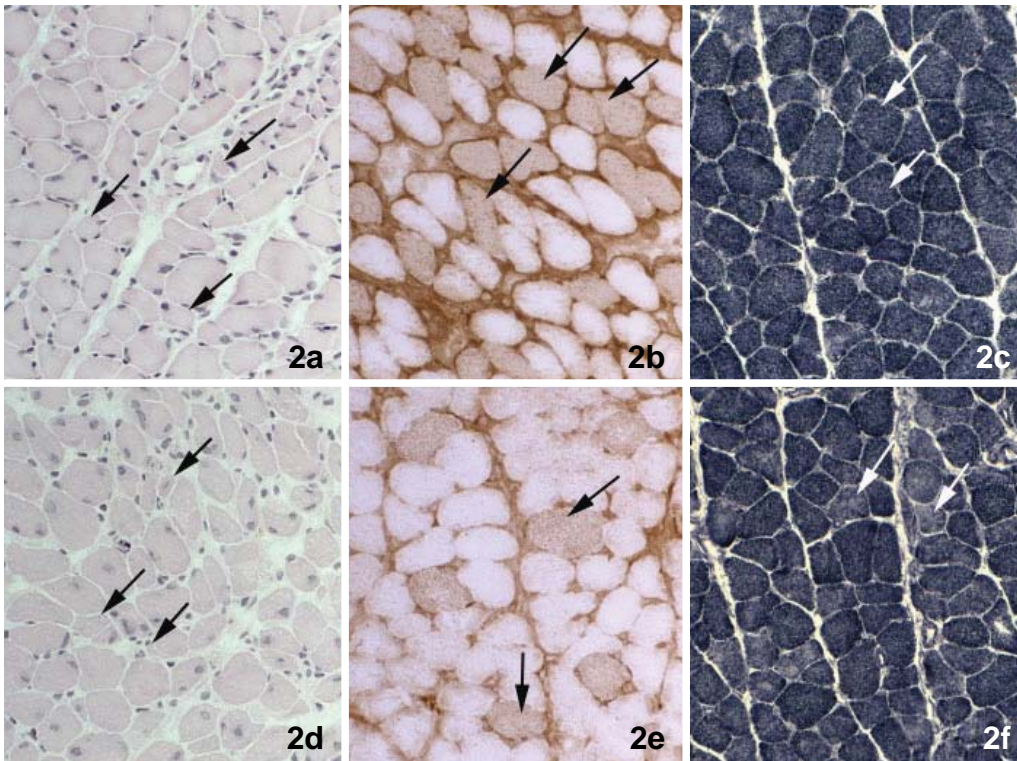


Fig. 2. Cross sectional muscle fibers of gastrocnemius muscle at 12th day after sciatic nerve crush injury. It showed that the muscle fibers were atrophy in the experimental group (2d, arrows) more than in the control group (2a, arrows). The experimental group showed that type I fiber were more atrophy (2e, arrows) than control group (2b, arrows). Weakly reactive type II fibers stained in experimental group (2f, arrows) but more darkly stained type II fibers in control group (2c, arrows). H & E (2a, 2d), slow myosin (2b, 2e), NADH-TR (2c, 2f). Original magnification. $\times 250$.

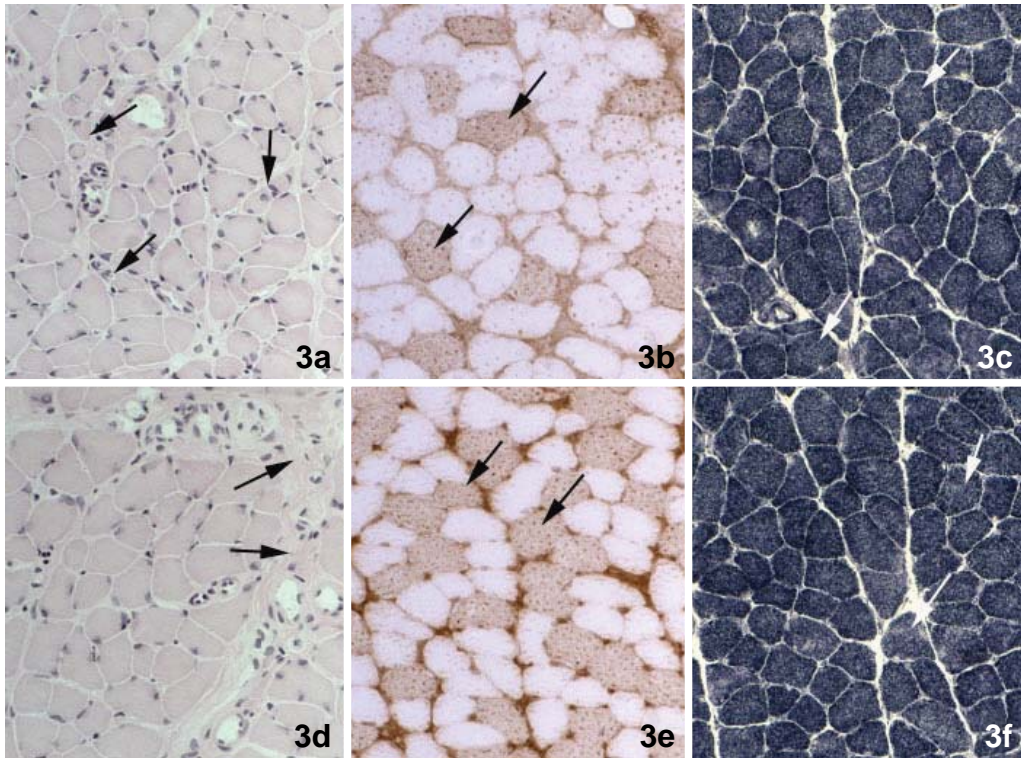


Fig. 3. Cross sectional muscle fibers of gastrocnemius muscle at 19th day after sciatic nerve crush injury. It showed that some of muscle fibers were splitted in experimental group (3d, arrows) more than control group (3a, arrows). The experimental group showed that type I fiber were more atrophy (3e, arrows) than control group (3b, arrows). The control group showed that type II fibers were mitochondria activity increased (3c, arrows) more than experimental group (3f, arrows). H & E (3a, 3d), slow myosin (3b, 3e), NADH-TR (3c, 3f). Original magnification. $\times 250$.

가 적게 관찰되었고, I형 섬유의 수가 적었다 (Fig. 2e).

3) 손상 후 19일 (운동 10일)군

압케손상 후 19일째 (10일간 운동)에서 대조군에서는 12일째보다 I형 섬유들의 수가 줄어들어 상대적으로 많은 II형 섬유들을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3b). 실험군에서는 12일째보다 II형 섬유의 수가 감소하여 I형과 II형 섬유의 수가 비슷하게 관찰되었고 I형 섬유들이 강하게 반응된 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3e).

4) 손상 후 26일 (운동 15일)군

압케손상 후 26일째 (15일간 운동)에서 대조군은 I

형 섬유에서 강하게 염색되었으나 몇 개의 위축된 I형 섬유들이 보였으며, I형과 II형 섬유들의 직경이 작은 것과 큰 것들이 균일하지 않게 관찰되었다 (Fig. 4b). 실험군에서는 양성 반응을 보이는 I형 섬유가 감소되어 보였고, 거대한 II형 섬유들이 관찰되었다 (Fig. 4e).

5) 손상 후 33일 (운동 20일)군

압케손상 후 33일째 (20일간 운동)의 대조군에서는 거대한 II형 섬유들이 보였으나, 분리된 근육섬유도 관찰되었으며 I형 섬유가 많이 감소된 것이 관찰되었다 (Fig. 5b). 실험군에서는 형태적으로 정상에 가까운 근육섬유도 일부 관찰되었고 대조군에 비해

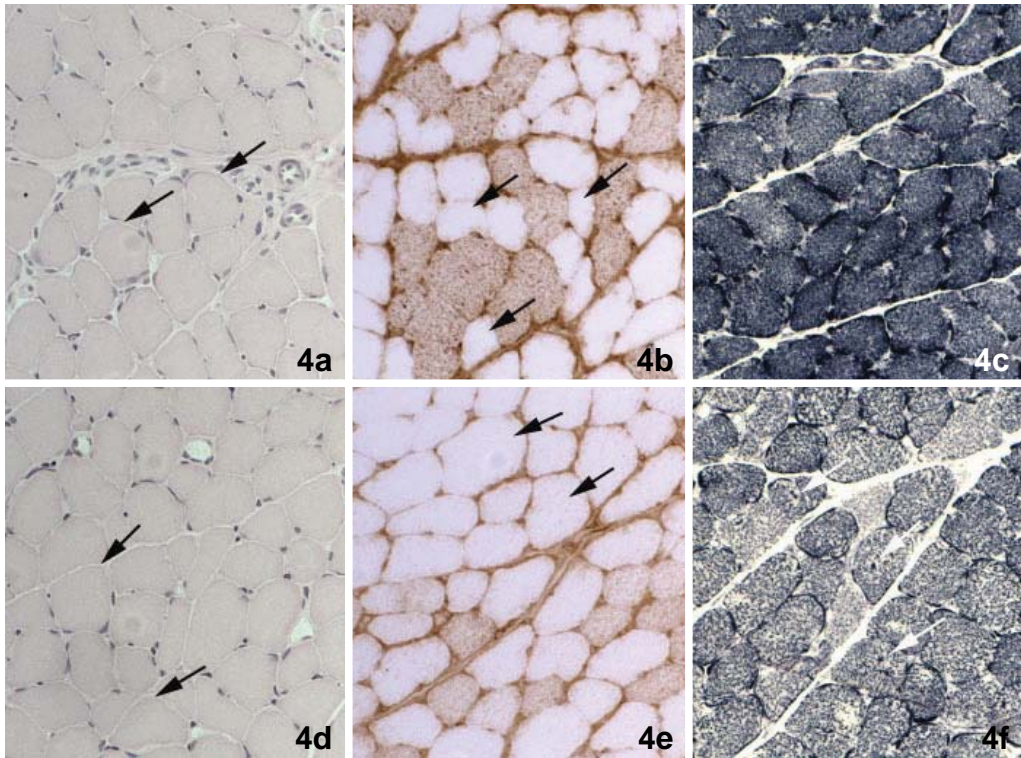


Fig. 4. Cross sectional muscle fibers of gastrocnemius muscle at 26th day after sciatic nerve crush injury. It showed that the muscle fibers is angular form in experimental group (4d, arrows) more than control group (4a, arrows). The control group showed that type II fiber were atrophy (4b, arrows), however in the experimental group observed giant fibers (4e, arrows). Nerve reinnervation is observed on target fibers (4f, arrows) in the experimental group, but not in the control group (4c). H & E (4a, 4d), slow myosin (4b, 4e), NADH-TR (4c, 4f). Original magnification. $\times 250$.

I형 섬유들의 근집현상이 관찰되어 정상 근육섬유에 가깝게 회복되었다(Fig. 5e).

6) 손상 후 61일(운동 40일)군

압케손상 후 61일째 (40일간 운동)의 대조군에서는 거대한 I형 섬유들이 보였고, 33일째에 비해 II형 섬유들이 직경의 크기도 감소하고 수도 감소된 것이 관찰되었다(Fig. 6b). 실험군에서는 형태적으로 정상에 가까운 근육섬유들로 관찰되었고 대조군에 비해 II형 섬유들의 근집현상이 관찰되고 직경의 크기도 균일하고, 근육섬유들의 조성비도 정상 근육섬유에 가깝게 회복되고 있었다(Fig. 6e).

3. 효소조직화학적 변화

1) 정상군

정상적인 장딴지근의 가로 단면 조직절편에서 보이는 I형 섬유들은 NADH-TR 반응 활성도에 의해 사립체의 수가 많아 진하게 염색되어 있는 것이 보이며, II형 섬유들은 다소 밝게 염색되어 구분되었다(Fig. 1c).

2) 손상 후 12일(운동 5일)군

신경 압케손상 후 12일째 (5일간 운동)에서 대조군의 II형 섬유에서 사립체의 활성도가 증가하여 어둡게 관찰되었다(Fig. 2c). 실험군은 대조군에 비해 II형 근섬유들이 많이 관찰되었으나, 대조군보다 사

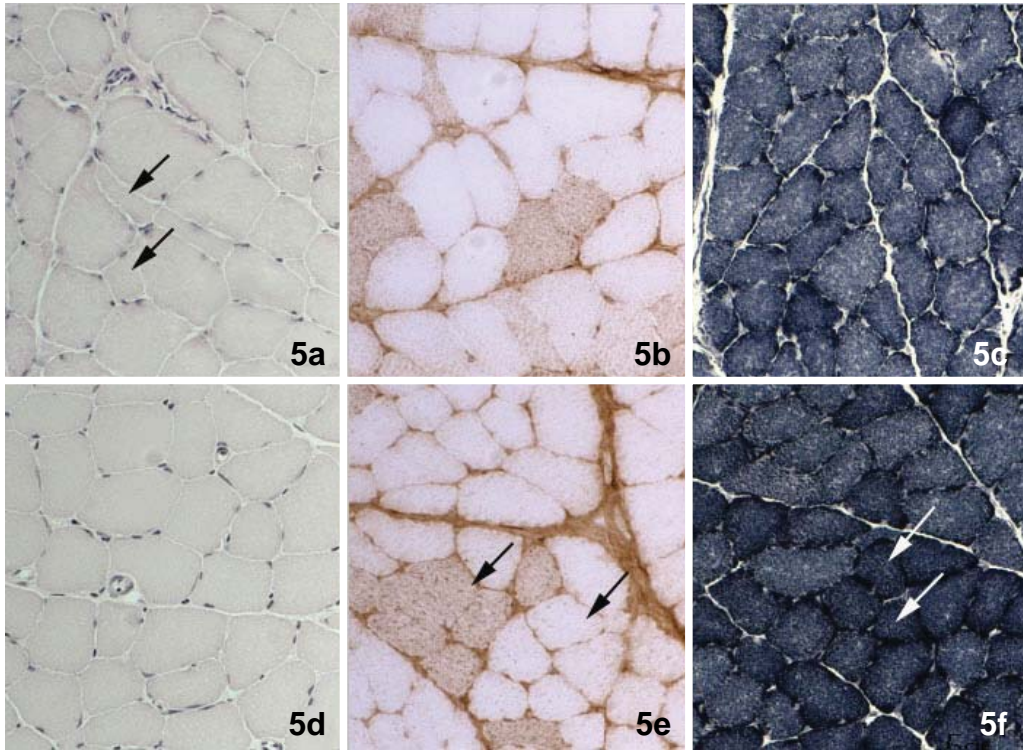


Fig. 5. Cross sectional muscle fibers of gastrocnemius muscle at 33rd day after sciatic nerve crush injury. Some of atrophic fibers is observed in control group (5a, arrows) more than experimental group (5d). In the experimental group showed that fibers type grouping is observed (5e, arrows) and intense reactive type I fibers (5f, arrows). H & E (5a, 5d), slow myosin (5b, 5e), NADH-TR (5c, 5f). Original magnification. $\times 250$

립체의 활성도가 감소되어 I형 섬유와 II형 섬유들이 밝게 염색되어져 관찰되었다(Fig. 2f).

3) 손상 후 19일(운동 10일)군

신경 압박손상 후 19일째(10일간 운동)에서 대조군에서는 12일째보다 I형 섬유들이 상대적으로 사립체의 활성도가 줄어들어 보다 덜 어둡게 염색되었으며. 위축되는 II형 섬유의 가장자리에 사립체가 많이 활성화 된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3c). 실험군에서는 대조군보다 II형 섬유에서 사립체의 활성도가 감소하여 밝게 관찰되었다(Fig. 3f).

4) 손상 후 26일(운동 15일)군

압박손상 후 26일째(15일간 운동)에서 대조군은 I형 섬유에서 사립체의 활성도가 증가하여 강하게

염색되었으나 염색되지 않은 중심핵이 관찰되었다(Fig. 4c). 실험군에서는 사립체의 활성도가 현저히 감소되어 근육섬유가 약하게 염색되었고, 표적 근육 섬유(target myofiber) 중심에 재신경 지배가 되는 것이 관찰되었다(Fig. 4f).

5) 손상 후 33일(운동 20일)군

압박손상 후 33일(20일간 운동)의 대조군에서는 실험군보다 사립체의 활성도가 감소되어 관찰되었다(Fig. 5c). 실험군의 근육섬유들에서 정상에 가까운 사립체의 활성도가 일부 관찰되었고 대조군에 비해 어느 정도 I형 섬유와 II형 섬유의 사립체의 활성도가 구분이 되는 것이 관찰되어 정상 근섬유에 가깝게 회복되었다(Fig. 5f).

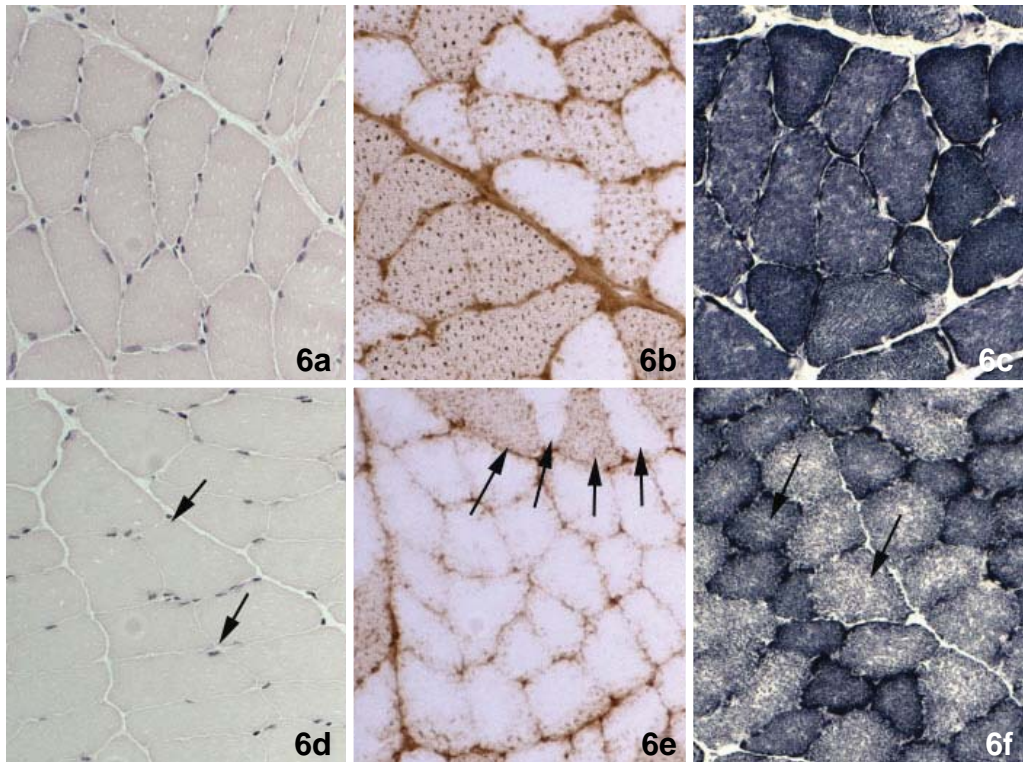


Fig. 6. Cross sectional muscle fibers of gastrocnemius muscle at 61st day after sciatic nerve crush injury. Muscles of the experimental group showed nearly normal of angular form (6d, arrows), checked-board pattern (6e, arrows) mitochondria activity (6f, arrows). However control group did not nearly normal (6a, 6b, 6c). H & E (6a, 6d), slow myosin (6b, 6e), NADH-TR (6c, 6f). Original magnification. $\times 250$.

6) 손상 후 61일(운동 40일)군

압케손상 후 61일째 (40일간 운동)의 대조군에서는 거대한 I형 섬유들에서 사립체의 활성도가 증가된 것이 보였고, 33일째에 비해 II형 섬유들이 더 어둡게 염색되어 관찰되어 정상근육과는 다른 양상을 보였다 (Fig. 6c). 실험군에서는 정상에 가까운 사립체의 활성도가 관찰되어 I형 섬유들은 어둡게 염색되고 II형 섬유들 밝게 염색되어 정상 근육섬유에 가깝게 회복되었다 (Fig. 6f).

고 찰

말초신경 손상에 가장 널리 사용되는 방법은 궁

동신경 압케손상인데 (Nakamura 등 2001) 신경의 압케손상은 지혈집계를 이용하였을 때 일관성이 높은 것으로 알려져 있으며, 본 연구에서도 각 실험동물에 대하여 동일한 궁동신경 손상모델을 적용하기 위해 선행 연구에서 (De Koning 등 1986) 제시한 절차에 따라 궁동신경에 압케 손상을 주었다.

근육섬유 원래의 크기를 유지하기 위해서는 매일 아주 적은시간, 최소의 수축력이라도 발생시켜야만 하는데 (Carter 2005), 탈신경이나 고정 후 근육신장이 근육위축을 방지하는 것으로 알려져 있다. 궁동신경이 손상된 후에도 흰쥐의 엉덩 근육들에 대한 신경지배는 잔존하므로 엉덩관절의 움직임이 가능하여 쥐들의 다리운동이 손상 직후에도 가능하며, 운동 시 탈신경근육이 신장되어 운동의 영향을 받

게 된다(Irintchev 등 1991). 본 연구의 궁둥신경 압쇄손상 후부터 트레이드밀을 이용해 1주일의 적응기간을 가진 운동군에서도 처음 예상과는 달리 트레이드밀 운동을 수행하는 데 무리가 없었다.

Bedford 등 (1979)은 트레이드밀을 이용한 흰쥐의 운동의 강도를 저강도 운동은 최대산소섭취량(VO_2 max)의 45~50%, 중강도 운동은 최대산소섭취량의 66~70%, 고강도 운동은 최대산소섭취량의 80%로 분류하였으며 본 연구에서는 Garvin 등 (2001)이 사용한 운동 방법을 수정하여 최대산소섭취량의 50%의 저강도 운동을 적용하였다.

말초신경의 병변 및 손상으로 근육에 대한 신경 지배가 차단되면 탈신경 위축이 특징적으로 나타나며, 탈신경근육은 손상 후 2~3주까지 급격히 위축되다가 신경재지배가 이루어지면서 서서히 회복된다. 탈신경위축이 일어나는 기전은 근육이 탈신경되면 혈관 수축성의 마비가 동반되며 그로 인해 혈관 내 울혈, 응혈 또는 혈전이 생기게 되고 이로써 근육에 영양장애가 생겨 근육위축이 유발되는 것으로 설명된다(Sunderland 1990). 또한 Stockert (1995)는 탈신경에 따른 근육 수축 기능의 상실을 직접적인 탈신경 위축의 한 원인으로 제시하였다. 신경이 압쇄손상되면 근육섬유들은 일반적으로 손상 2일 후 작은 분절로 나뉘게 되며 이는 손상 후 2일째부터 백혈구나 단핵구가 증가되기 때문이며(Kapoukranidou 등 2005), 근육섬유들은 포식작용에 의해 2주간에 걸쳐 지속적으로 제거된다(Hughes 1974). 본 연구에서도 신경손상 후 12일째와 손상 후 19일째까지 실험동물에서 근육섬유가 심하게 위축되는 것이 관찰되었으며, 대조군보다 운동군에서 위축의 정도가 더 심하게 나타났다. Herbison 등 (1973)의 연구에서도 궁둥신경 손상 후 운동을 시행하여 근육단백질 함량을 조사한 결과 신경 재생의 초기에 과도한 운동량이 가해질수록 근육단백질이 심하게 감소한 반면 근육 내 비섬유소원성 단백질은 증가하여 회복에 부정적인 영향을 미친다고 보고하였다. 이러한 보고에 비추어 볼 때 본 연구에서 신경손상 후 12일째와 19일째에 나타난 근육섬유의 심한 위축현상은 신경 재생기의 뼈대근육에 기능할 수 있는 운

동단위가 적을 때 운동량이 과도하게 가해지면서 근육단백질이 소실되어 나타난 결과로 생각된다. 또한 신경손상 후 적절한 자극은 신경말단과 근육에서 영양성 인자(trophic factors)의 분비를 자극해 새로 형성되는 신경근접합부의 적응성을 증가시키는 데 반해 과도한 운동은 오히려 축삭과 수초의 변화와 발아의 지연을 초래하기 때문인 것으로 생각된다.

근육의 재생은 태아에서의 근육발생 과정을 반복하지만 이를 위해서는 근육섬유를 둘러싸는 바닥막이 완전하고 혈관 및 근육위성세포가 존재할 때 가능하다. 이런 조건이 갖추어진 상황에서 근육의 재생은 근육위성세포가 활동을 개시함으로써 시작된다. 재생되는 시기는 근육모세포시기(myoblastic stage)로 구분된다(Maley 1995). 피사가 일어난 부위를 따라 근육형질막에 근접한 부위에서 단핵성의 근육모세포(myoblast)들이 증식한다. 대부분의 경우는 정상적인 근육형질막과 근육위성세포가 관찰되기도 하지만 곧 근육섬유와는 분리되어 고립된다. 또한, 어떤 경우에는 온전한 근육핵이 손상된 근육섬유에서 관찰되기도 한다. 활동적인 근육위성세포에는 크고 둥글며 진한 핵이 있다. 이 세포는 이전의 근육섬유에서 분리된 후 근육형질막과 기저막사이에 위치하게 된다. 이들 세포들에서는 가끔 유사분열이 관찰되며 이들은 단핵성 근육모세포로 빠르게 증식된다. 재생 초기에 근육형질이 호염기성인 것은 근육모세포질 내에 RNA가 풍부하기 때문이다(Bomemann 등 1999, Kapoukranidou 등 2005).

단핵 근육모세포(mononuclear myoblast)가 융합하여 근육대롱세포를 형성하는 동안 손상된 근육섬유의 끝에서는 근육형질섬(sarcoplasmic bud)이 마치 위쪽같이 나와 다른 손상 부위와 연결되며 근육모세포는 위쪽의 표면을 덮게 된다. 띠모양의 근육모세포는 다핵성이며 근육형질에 싸여 있다. 근육핵 주위에서 근육원섬유가 관찰된다. 다른 근육섬유와 연결되면 더 이상 유사분열이 일어나지 않는다(Carlson 1973, Grounds 1992, Kapoukranidou 2005). 근육대롱세포가 성숙한 근육섬유로 전환되는 동안 근육핵은 주변부로 이동하고 근육세사(myofila-

ment)는 두꺼워지고 길어져 근육원섬유가 된다. 근육원섬유가 증가되는 기전은 발생단계에서의 근육 발생 과정과 흡사하다.

압케손상된 말초신경은 손상 직후부터 왈러변성(Wallerian degeneration)이 일어나지만, 시간이 경과함에 따라 손상부위부터 목표 기관까지의 재생이 일어나게 된다(Waller 1850). 말초신경재생의 가장 마지막 단계인 말이집 형성은 신경 손상 14일 후부터 진행되며, 진행속도는 상당히 느린 것으로 보고되고 있다(Seo 등 2004). Kapoukranidou 등(2005)은 28일된 흰쥐의 궁동신경에 압케손상을 주면 2일 이내에 척수의 운동신경세포의 72% 정도가 사멸하는 것을 확인하였고, Herbison 등(1974)은 성숙한 흰쥐의 궁동신경에 압케손상을 준 후 신경전달속도를 측정할 결과 3주부터 회복되기 시작하여 6주에는 정상치의 80% 정도까지 회복된다고 보고하였다. 또한, Dubowitz (1967)는 실험동물에서 근육에 재신경지배가 일어날 때 거대섬유(giant fiber) 등과 같은 비정상적인 근육섬유가 관찰된다고 하였다. 본 연구에서도 운동군에서 신경손상 후 26일째에 II형 섬유에 재신경지배가 일어나고 II형의 거대섬유들이 나타났다. 그러나 대조군에서는 손상 후 33일째에 II형 거대섬유들이 관찰되어 운동군보다 시기가 지연되었다.

Irintchev와 Wernig(1987)은 정상 신경지배근에서 개별적인 운동단위를 형성하는 신경섬유들은 무작위로 혼합된 모자이크를 만들면서 광범위하게 서로 섞여 근육을 지배하므로 근육은 동일 섬유형끼리 모여 있지 않고 바둑판 모양으로 서로 다른 근육섬유형이 섞여 있게 된다고 하였다. 그러나 탈신경근육에서는 동일 근육섬유형끼리 군집을 이루고 있는 특징적인 소견을 보인다고 하였으며 궁동신경을 동결시키는 방법으로 흰쥐의 가자미근을 탈신경시킨 후 조직화학적 변화를 살펴 본 결과 재신경지배되고 있는 가자미근에서 I형 섬유의 수적 감소와 II형 섬유의 수적 증가를 관찰하여 이를 재신경지배 초기 운동 단위의 재배열 때문인 것으로 해석하였다. 또 손상 12주 후에 동일한 근섬유형 군집현상(fiber type grouping)이 뚜렷하게 나타난다고 하였다. Chung

등(1983)은 궁동신경에 충격 손상을 준 후 장딴지근과 가자미근에서 신경이 재생되는 시기에 따른 근육섬유형의 변화를 관찰한 결과, 신경 충격손상 후 초기에 근육다발사이에서 급성 염증세포와 대식세포의 침윤이 일어나고 핵이 정상에 비해 동그랗게 되며, 손상 60일 후부터는 근육섬유형의 군집현상이 일어난다고 하였다. 본 연구에서도 운동군에서 신경손상 후 26일째에 II형 섬유의 수가 증가되어 군집현상이 나타나기 시작하며 손상 후 33일째에는 보다 뚜렷한 근육섬유 군집현상을 관찰할 수 있었다. 이는 선행연구와는 달리 신경손상의 방법과 손상 후 저장도 운동을 적용시킨 차이에 의해 탈신경근에 대한 재신경지배의 초기 신호로 생각되는 동일 근육섬유형의 군집현상이 더 빠르게 나타나는 것으로 판단된다.

신경의 조절은 근육의 표현형 발현(phenotype expression)에 가장 두드러진 영향을 미치므로 근육 섬유의 형질은 신경-근육의 연결 변화로 달라질 수 있다(Costill 등 1976). 탈신경시에 일어나는 근육섬유형의 선택적 위축에 의해 근육섬유의 조성비가 변화할 수 있음을 보고한 연구들이 있다. Jaweed 등(1975)은 탈신경시기(denervation phase)인 2주 정도까지는 근육섬유 위축이 I형과 II형 섬유에서 모두 비슷하게 발생하며 이 시기에는 I형 섬유의 위축이 조금 더 심하게 나타나고, 이에 따라 II형 섬유의 수가 정상에 비해 더 증가된다고 하였다. 신경 손상 후 2~3주가 경과하면서 근육섬유의 크기는 다시 증가하기 시작하여 약 6주가 경과한 후에는 정상 근육섬유 직경의 약 90% 정도에 도달하고 II형 섬유의 수도 3주가 경과하면서 감소한다고 보고하였다. 본 연구에서도 손상 후 12일째까지의 장딴지근의 가로 절단면에서 I형 섬유가 실험군에서 더 심하게 위축되고 수도 감소되어 근육섬유의 조성비가 변화하여 탈신경 초기에 시작한 운동은 부정적이었음을 제시하였다. 또한 본 연구에서는 실험군에서 신경손상 후 33일째에는 조성비가 정상근육에 가까워졌으며, 손상 후 61일째에는 정상근육과 거의 동일한 근육섬유형의 조성비를 보였다.

이러한 결과를 종합해보면 신경의 압케손상 후

운동을 적용시킨 결과 신경손상 후 12일(운동 5일)째의 근육섬유의 조성비가 차이를 나타내고 손상 후 19일째(운동 10일)에는 운동을 시키지 않은 흰 쥐보다 더 심하게 위축되어 부정적인 효과를 나타내었다. 반면 신경손상 후 26일째(운동 15일)부터는 표적 근육섬유에 재신경지배가 일어나 거대한 근육섬유들이 나타나고 동일 근육섬유형의 군집현상이 나타났으며 61일째(운동 40일)에서는 정상근육에 가깝게 재생되었다. 따라서 본 연구의 결과는 말초신경 질환에서 치료적 운동을 적용하는 데 있어 운동의 시기와 기간을 고려하는 데 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 또한 뼈대근육은 말초신경의 손상으로 인해 근육병증이 쉽게 일어나는 조직이며 운동장애가 빈번히 유발되기 때문에 근육병증 환자의 사회복귀를 도와주는 재활의학 및 물리치료 분야의 연구에 기초적 자료가 되리라 생각된다.

참 고 문 헌

- Ausoni S, Gorza L, Schiaffino S, Gundersen K, Lomo T : Expression of myosin heavy chain isoforms in stimulated fast and slow rat muscles. *J Neurosci* 10: 153-160, 1990.
- Bedford TG, Tipton CM, Wilson NC, Oppliger RA, Gisolfi CV : Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures. *J Appl Physiol* 47: 1278-1283, 1979.
- Best TM, Hunter KD : Muscle injury and repair. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 11: 251-266, 2000.
- Bomemann A, Maier F, Kuschel R : Satellite cells as players and targets in normal and diseased muscle. *Neuropediatrics* 30: 167-175, 1999.
- Brooke MH, Kaiser KK : Muscle fiber types: how many & what kind. *Arch Neurol* 23: 369-379, 1970.
- Brownson C, Little P, Jarvis JC, Salmons S : Reciprocal changes in myosin isoform mRNAs of rabbit skeletal muscle in response to the initiation and cessation of chronic electrical stimulation. *Muscle Nerve* 15: 694-700, 1992.
- Carlson BM : The functional morphology of regenerating and transplanted mammalian muscles. *J Physiol* 231: 57-58, 1973.
- Carter GT : Rehabilitation management of peripheral neuropathy. *Semin Neurol* 25: 229-37, 2005.
- Chung WJ, Chung IH, Park KA, Shin TS : Histochemical studies of skeletal muscles after crushing injury on sciatic nerve in rats. *Yonsei Med J* 16: 358-372, 1983. (in Korean)
- Costill DL, Daniels J, Evans W, Fink W, Krahenbulhl G, Saltin B : Skeletal muscle enzymes and fiber composition in male and female track athletes. *J Appl Physiol* 40: 149-154, 1976.
- De Koning P, Brakkee JH, Gispen WH : Methods for producing a reproducible crush in the sciatic and tibial nerve of the rat and rapid and precise testing of return of sensory function: Beneficial effects of melanocortins. *J Neurol Sci* 74: 237-246, 1986.
- Dobkin BH : Training and exercise to drive poststroke recovery. *Nat Clin Pract Neurol* 4: 76-85, 2008.
- Dubowitz V : Pathology of experimentally re-innervated skeletal muscle. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 30: 99-110, 1967.
- Garvin TP, Wanger PD : Effect of short-term exercise training on angiogenic growth factor gene reponse in rats. *J Appl Physiol* 90: 1219-1226, 2001.
- Grounds MD, Gattett KL, Lai MC, Wright WE, Beilharz MW : Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. *Cell Tissue Res* 267: 99-104, 1992.
- Herbison GJ, Jaweed MM, Ditunno JF, Scott CM : Effect of overwork during reinnervation of rat muscle, *Exp Neurol* 41: 1-14, 1973.
- Herbison GJ, Jaweed MM, Scott CM, Ditunno JF : Muscle weight and protein content of rat skeletal muscle following sciatic nerve crush. *Arch Phys Med Rehabil* 55: 241-246, 1974.
- Herbison GT, Jaweed MM, Ditunno JF : Reinnervating rat skeletal muscle: effect of 35% grade treadmill exercise. *Arch Phys Med Rehabil* 63: 313-316, 1982.
- Hughes JT : Pathology of muscle. *Major Probl Pathol* 4: 1-218, 1974.
- Irintchev A, Carmody J, Wernig A : Effects on recovery of soleus and extensor digitorum longus muscle of prolonged wheel running during a repeated nerve damage. *Neuroscience* 44: 515-519, 1991.
- Irintchev A, Wernig A : Muscle damage and repair in volun-

- tarily running mice: strain and muscle differences. *Cell Tissue Res* 249: 509-521, 1987.
- Jansson E, Sjödin B, Tesch P : Changes in muscle fiber type distribution in man after physical training. A sign of fiber type transformation. *Acta Physiol Scand* 104: 235-237, 1978.
- Jaweed MM, Herbison GJ, Ditunno JF : Denervation and reinnervation of fast and slow muscles. A histochemical study in rats. *J Histochem Cytochem* 23: 808-827, 1975.
- Kadi F, Hägg G, Häkansson R, Holmner S, Butler-Browne GS, Thornell LE : Structural changes in male trapezius muscle work-related myalgia. *Acta Neuropathol* 95: 352-360, 1998.
- Kapoukranidou D, Gougoulas N, Hatzisotiriou A, Fardi D, Albani M, Kalpisis I : Assessment motorneuron death during development following neonatal nerve crush and Mg^{2+} treatment. *Med Sci Monit* 11: BR373-379, 2005.
- Maley MA, Davies MJ, Grounds MD : Extracellular matrix, growth factors, genetics: their influence on cell proliferation and myotube formation in primary cultures of adult mouse skeletal muscle. *Exp Cell Res* 219: 169-179, 1995.
- McAllister RM, Delp MD, Laughlin MH : A review of effects of hypothyroidism on vascular transport in skeletal muscle during exercise. *Can J Appl Physiol* 22: 1-10, 1997.
- Nakamura Y, Shimizu H, Nishijima C, Ueno M, Arakawa Y : Delayed functional recovery by vincristine after sciatic nerve crush injury : a mouse model of vincristine neurotoxicity. *Neurosci Lett* 304: 5-8, 2001.
- Satin B, Gollnick PD : Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism and performance. *Handbook of Physiology*. Am Physiol Soc, pp 555-631, 1983.
- Seo TB, Han IS, You BG, Jeong IG, Yoon JW, Namgung U : Induction of Cdc2 protein by sciatic nerve injury and up-regulation by exercise in rat. *Society for Neurosci Abstr* 618: 8, 2004.
- Stockert BW : *Peripheral neuropathies*, 3rd ed., Neurological rehabilitation. St. Louis, Mosby, pp 360-374, 1995.
- Sunderland S : *The anatomy and physiology of nerve injury*. *Muscle Nerve* 13: 771-784, 1990.
- van Meeteren NL, Brakkee JH, Helders PJ, Gispen WH : The effect of exercise training on functional recovery after sciatic nerve crush in the rat. *J Peripher Nerv Syst* 3: 277-282, 1998.
- Waller A : Experimental on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alternations produced thereby in the structure of their primitive fiber. *Philos Trans R Soc London* 140: 423-429, 1850.

Abstract

Effect of Exercise Training on Histochemical Muscle Recovery after Sciatic Nerve Crush in Rat

Hyun-Rae Cho, Ki-Soo Yoo

Department of Anatomy, College of Medicine, Dong-A University

It is constant controversy that exercise influence muscle regeneration in peripheral neuropathy.

The aim of this experiment is to show that treadmill running exercise under well-controlled conditions is to improve of regeneration in rat gastrocnemius muscles after sciatic nerve crushing injury.

Male Sprague-Dawley rats (1 month old, weight 150 ~ 180 g) were submitted to bouts of exercise on a treadmill up a 10 degrees decline and speed is 20 m/min for 60 min per day and gastrocnemius muscles were analysed at different exercise periods (5, 10, 15, 20 and 40 days) by immunohistochemistry in comparison with injured non-exercised muscles.

Rats were sacrificed at 12th (5 days exercise), 19th (10 days exercise), 26th (15 days exercise), 33rd day (20 days exercise), 61st day (40 days exercise) after sciatic nerve crushing injury.

It showed that type II myofibers (target fibers) on center area had reinnervation at sciatic nerve crush injury at 26th day in exercise rats, as at 33rd day appeared giant type II myofibers, myofibers grouping observed in regenerative muscle character, component ratio of closed normal muscle showed at 61st day.

Giant type II myofibers showed at 33rd day in non-exercise rats, however did not nearly normal muscle at 61st day.

Therefore we concluded that treadmill running exercise is able to improve regeneration processes in gastrocnemius muscles after sciatic nerve crushing injury of rats.

Key words : Sciatic nerve crushing injury, Muscle regeneration, Treadmill exercise, Myosin, NADH-TR