

쥐의 말초신경손상모델로서의 공동신경절단모델과 L5 척수신경절단모델의 비교연구

송대용, 이지혜, 유하늘, 박채리, 우란숙, 홍성엽¹, 전영희², 구형남³, 백태경

울지대학교 의과대학 해부학 및 신경과학교실, ¹가톨릭대학교 의과대학 응급의학교실,

²영남대학교 의과대학 소아청소년과학교실, ³국립과학수사연구원 법의학부 법의학과

(2011년 10월 31일 접수, 2011년 12월 2일 수정접수, 2011년 12월 8일 게재승인)

간추림 : 연구자들은 L5 척수신경만을 선택적으로 절단하고 L5 척수분절을 다른 척수 부위와 구별하여 연구함으로써 기존의 공동신경절단 모델의 단점을 보완할 수 있는 새로운 말초신경절단 모델을 제안하고자 이 연구를 수행하였다.

300~350 g Sprague Dawley계 흰쥐를 이용하여 4개의 실험군으로 나누어 연구하였다. 1. 공동신경 절단군: 공동신경이 온종아리신경과 정강신경으로 나뉘는 오금부위에서 공동신경을 절단한 군. 2. L5 절단군: L5 척수신경이 L5 척수사이구멍을 통과하여 출현하는 부위에서 L5 척수신경만을 선택적으로 절단한 군. 3. 접합군: L5 척수신경 절단 후 바로 봉합한 군. 4. 대조군: 시술 과정은 동일하게 수행하였으나 신경에 손상을 가하지 않은 군. 그리고 일부 실험동물의 경우에는 L5 척수분절을 확인하기 위하여 L5 척수신경을 절단한 후 FluoroGold를 주입하였다.

L4와 L6의 척수신경뿌리를 기준으로 L4~L6 척수분절을 절단하고, 40 μm의 두께로 관상절편을 제작한 결과 평균 180개 정도의 조직절편을 얻을 수 있었다. 이 중, 약 50개의 절편에서 FluoroGold에 양성반응을 보이는 척수운동신경세포가 관찰되어 L5 척수분절범위는 50개의 절편, 즉 2mm로 하였다. L5 척수분절은 Cresyl violet 염색에서도 형태적으로 L4 및 L6 척수분절과 구별할 수 있었다. 시술 2주 및 4주 후에 동물을 희생하여 L5 척수운동신경세포의 수를 계수한 결과, 대조군과 비교하여 L5 절단군에서 약 8%의 신경세포 수 감소가 확인되었다. 접합군과 공동신경 절단군은 대조군과 비교하여 유의할 만한 변화를 보이지 않았다.

본 연구를 통해 제시한 L5 척수신경절단 모델은 L5 척수운동신경세포에서 기원하는 거의 대부분의 축삭을 절단하고, L5 척수분절에만 국한하여 연구를 수행한다는 점에서 기존의 공동신경절단 모델을 기반으로 한 연구 방법에 비해 매우 신뢰도가 높은 연구방법이라 제안하는 바이다.

찾아보기 낱말 : 말초신경절단, L5 척수신경, 척수운동신경세포, FluoroGold, Cresyl violet

서 론

말초신경 손상 및 재생기전을 연구하기 위해 가장 보편적으로 사용되어온 실험동물은 설치류이며, 특히

공동신경절단술 (sciatic nerve axotomy model)은 주변 근육에 상해를 가하지 않고, 비교적 손쉽게 모델을 제작할 수 있다는 장점으로 인해 가장 보편적으로 사용되어 왔다 (Aguayo 1985, Kobbert와 Thanos 2000, Gordon 등 2003, IJkema-Paassen 등 2004). 이러한 장점에도 불구하고, 축삭절단에 따른 척수운동신경세포의 축삭절단반응, 특히 세포사멸 및 재생과 관련된 기존 연구들은 그 결과가 서로 상반되는 커다란 문제점을 가지고 있다. 예를 들어, Wu (1993)나 Li 등 (1995)은 공동신경절단에 의해서는 척수운동신경세포의 사멸이 유도되지 않는다고 보고한 바 있다. 그러나 동일한 모델을

*이 논문은 2007년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단 (KRF-2007-331-E00007)과 2009년도 울지대학교 교내연구 (EJRG-09-004-12E02) 지원에 의하여 수행된 것임.

저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.

저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.

교신저자: 백태경(울지대학교 의과대학 해부학 및 신경과학교실)

전자우편: tkbaik@eulji.ac.kr

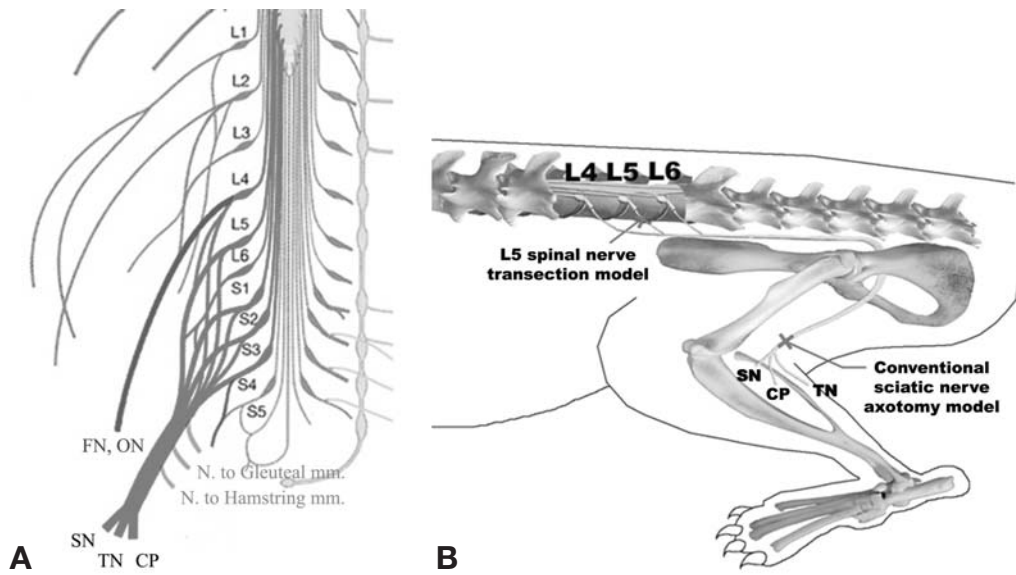


Fig. 1. Schematic diagram of the formation and branches of the lumbosacral plexus (A) and the severe point in the conventional sciatic nerve axotomy model and new L5 spinal nerve transection model (B). CP, common peroneal nerve; FN, femoral nerve; ON, obturator nerve; SN, sural nerve; TN, tibial nerve.

기반으로 특정약물의 신경보호 효과를 보고자 한 다른 연구들은 공동신경절단이 척수운동신경세포의 사멸을 유도한다는 전제하에 연구를 수행하였다(Sendtner 등 1992, Chan 등 2003, Hart 등 2004).

기존 연구들의 이와 같은 상반된 결과는 다음과 같이 해석할 수 있다. 공동신경절단 모델에서 축삭절단이 이루어지는 부위는 L4~S3에 존재하는 척수운동세포 증 많은 신경세포들이 이미 자신의 특이 표적장기에 신경 지배를 마친 후다. 즉 L4~S1에서 기원하는 신경인 넙다리신경(femoral nerve), 폐쇄신경(obturator nerve), 볼기의 근육들을 지배하는 신경(nerve to gluteal muscles), 그리고 넙다리뒤근육을 지배하는 신경(nerve to hamstring muscles) 등은 축삭절단이 이루어지는 지점 이전에 이미 분지하여 자신의 표적장기를 지배하고 난 후다(Fig. 1; Woodburne와 Brukel 1988, Kobbert와 Thanos 2000). 따라서 공동신경절단 모델의 경우 L4~S1 척수분절 내에는 축삭이 절단된 운동신경세포들과 절단되지 않은 운동신경세포들이 혼재되어 있다. 그러므로 실험재료의 근소한 샘플링(sampling) 차이가 결과적 오류를 동반할 가능성이 높다. 또한 가장 빈번히 사용되는 실험동물인 쥐의 경우 공동신경이 L4, L5, L6, S1, S2, S3의 6개 척수분절(특히 L4~S1)에서 기원하는데, 이렇게 광범위한 척수부위를 분석하는 것은 연구자에 따른 편견을 유발할 가능성이 높다.

이에 연구자들은 특정 척수분절만을 대상으로 한 말

초신경절단 모델이 신뢰도 높은 결과를 도출할 수 있다고 판단하였으며, 이에 Kim과 Chung (1992)이 통증 연구를 위해 고안하였던 동물통증모델을 변형한 L5 척수신경절단 모델의 적용가능성을 조사하였다. 공동신경을 형성하기 위해 L4~S3 척수분절에서 기원한 척수뿌리(spinal roots)들은 척주관(vertebral canal) 내를 하행하며 말꼬리(cauda equina)를 형성하고, 각각의 척추높이에서 척추사이구멍(intervertebral foramen)을 통해 척주관 내를 빠져 나오게 된다. 이때 앞뿌리와 뒤뿌리가 합쳐지며 해당 척추높이의 척수신경을 형성하고, 척주관을 빠져나온 척수신경은 짧은 거리를 단독으로 주행하다 주위에 존재하는 다른 척수신경들과 합쳐지면서 신경얼기(nerve plexus)를 형성한다(Woodburne와 Brukel 1988, Kobbert와 Thanos 2000). 이에 저자들은 Fig. 1에 도시하였듯이 공동신경을 형성하는 L4~S3까지의 척수신경들이 신경얼기를 형성하기 전에 단일 척수신경만을 선택적으로 절단한다면 기존 공동신경절단 모델의 단점을 보완할 수 있는 새로운 말초신경절단 모델이 될 수 있다는 판단 하에 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 동물의 사육 및 관리

모든 실험동물의 사육·관리 및 실험방법의 적용은

동물보호법(법률 제8282호) 및 미국 국립보건원에서 제시한 기준에 의거하여 수행하였으며(NIH Publication No. 8023, revised 1996), 을지대학교 동물실험윤리위원회 연구심의를 통과한 후 이루어졌다(EUIACUC-09-08). 특히 전 실험과정에 걸쳐 실험동물의 고통을 최소화 할 수 있는 모든 조치를 취하였으며, 필요 이상의 실험동물을 사용하는 것을 자제하였다. 실험동물로는 체중 300~350 g 내외의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 모든 실험동물은 먹이와 물이 자유롭게 공급되는 조건에서 20~22°C의 실내기온 및 습도가 유지되며 12시간의 밤-낮 주기가 일정하게 관리되는 사육실에서 사육하였다. 실험동물에게는 수술 전날 저녁까지 먹이와 물을 자유롭게 공급하였으며, 수술 전날 밤부터 수술 당일까지는 먹이공급을 중단하였으나, 물은 지속적으로 공급하였다.

2. 실험설계

실험동물은 총 4개의 군으로 나누어 실험하였다. 1. 궁둥신경 절단군(Sc-Tx group): 궁둥신경이 온종아리신경과 정강신경으로 나뉘는 오금부위에서 궁둥신경을 절단한 군. 2. L5 절단군(L5-Tx group): L5 척수신경이 L5 척수사이구멍을 통과하여 출현하는 부위에서 L5 척수신경만을 선택적으로 절단한 군. 3. 접합군(Su group): L5 척수신경 절단 후 바로 접합한 군. 4. 대조군(Sham group): 시술 과정은 L5 절단군과 동일하게 수행하였으나 신경에 손상을 입히지 않은 군. 또한 척수신경 손상 후 시간 경과에 따른 변화양상을 살피기 위해 각 실험군은 다시 2주군과 4주군으로 세분화하여 연구하였다. 각 군당 4~5마리의 실험동물을 배정하였다.

한편, L5 척수분절 범위를 확인하기 위하여 5마리의 실험동물에 대해서는 L5 척수신경만을 선택적으로 절단한 후 역행성추적자인 FluoroGold를 투여하였다.

3. 신경절단 및 접합

피부개방에 따른 수술부위 감염손상을 방지하기 위하여 수술 12시간 및 1시간 전에 penicilline-G (20,000 IU/kg)를 실험동물의 복강으로 투여하였으며, 수술 후 격일로 세 차례 더 동량의 penicilline-G를 투여하였다. 또한 수술을 마친 실험동물의 수술 부위에 Nitrofurazone powder를 뿌려 감염을 예방하였으며, 절개된 근육 및 근막, 그리고 피부는 각각 3-0 및 4-0 나일론 봉합사를 이용하여 봉합하였다.

실험동물이 마취로부터 완전히 회복될 때까지 체온

을 유지시키며 관찰하였으며, 완전히 회복되었다고 판단되는 실험동물은 다시 사육실에서 희생 시까지 사육하였다. 수술 도중에 의식을 회복하는 개체에 대해서는 적정 양의 ketamine을 복강으로 더 투여하여 마취상태를 유지하였으며, 수술 후 심각한 건강상의 문제를 보이는 개체는 안락사시켰다.

1) 궁둥신경 절단

궁둥신경 절단은 기존 연구자들에 의해 시행되어오던 방법에 의거하여 시행하였다(Wu 1993, Li 등 1995). 실험동물에 ketamine (70 mg/kg)과 xylazine (8 mg/kg) 혼합액을 복강 내로 주사하여 깊은 마취상태에 들게 한 후, 오른 오금부위의 털을 깨끗이 면도하였다. 이후, 오금부위 피부를 세로로 약 4 cm 절개하고 넓다리두갈래근(biceps femoris muscle)과 반힘줄근(semi-tendinosus muscle)의 힘줄 사이에서 궁둥신경이 온종아리신경과 정강신경으로 나누어지기 전 몸쪽 5 mm 부위에서 신경을 절단하였다. 이후, 절단된 두 신경 말단이 자생적으로 재결합(re-apposition)하는 것을 방지하기 위하여 먼 쪽신경말단(distal stump) 약 10 mm를 더 잘라 제거하였으며, 양 말단 사이에 Gelfoam을 삽입하였다.

2) L5 척수신경 절단 및 접합

L5 척수신경 절단은 Kim과 Chung (1992)의 방법을 변형하여 수행하였다. 실험동물을 깊은 마취상태에 들게 한 후, 등과 허리부위의 털을 깨끗이 면도하고, 제10등뼈 높이에서 제4영치뼈 높이까지 정중선을 따라 피부를 절개하였다. 오른쪽 및 왼쪽 엉덩뼈능선(ilial crest)이 만나는 지점인 제6허리뼈 및 제1영치뼈를 기준으로 척추뼈의 가시돌기(spinal processes)를 측정하여 제5허리뼈 높이를 확인하고, 제3허리뼈에서 제2영치뼈 부위의 근막(등허리근막: thoracolumbar fascia)과 척추옆근육(paravertebral muscles)을 정중선으로부터 약 5 mm 오른쪽에서 세로로 절개하였다. 제4허리뼈에서 제6영치뼈의 꼭지돌기(mamillary processes)에 부착되어 있는 척추옆근육들을 조심스럽게 제거하고 그 깊은 곳에 위치한 제4허리뼈 및 제5허리뼈의 가로돌기(transverse processes)를 수술현미경(Surgical microscope: Olympus, Tokyo, Japan)하에서 확인하였다. Rongeur를 이용하여 제5허리뼈의 가로돌기를 제거하고, 그 깊은 곳에서 L5 척수신경이 척추사이구멍(intervertebral foramen)을 통해 출현하는 것을 확인하였다. L5 척수신경을 주위 결합조직으로부터 조심스럽게 분리하여 노출한 후, 미세가위(micro-scissors)를 이용하여 척추사이구멍으로부터 약 5 mm 되는 부위에서 L5 척수신경만을 선택적으로 절단하였

다. 이후, 절단된 두 신경 말단이 자생적으로 재결합되는 것을 방지하기 위하여 양 말단 사이에 Gelfoam을 삽입하였다. 한편, 접합근의 경우에는 몸쪽과 먼쪽의 절단된 양 신경바깥막(epineurium)의 세 부위를 약 120° 간격으로 9-0 ethilon 봉합사를 이용하여 접합하였다.

4. FluoroGold 주입

축삭이 절단된 L5 척수운동신경세포의 분포 범위를 확인하기 위하여 역행성 추적자인 FluoroGold (Fluoro-chrome, Englewood, Co, USA)를 신경이 절단된 L5 척수신경 몸쪽 말단에 투여하였다. L5 척수신경을 전술한 방법으로 절단한 후, 0.9% phosphate buffered saline에 용해한 5% FluoroGold 10 µL를 소형 (2mm³)의 Gelfoam에 묻혀 절단된 신경의 몸쪽 말단에 접하게 하였다. 실험동물은 3일 후에 희생하여 사용하였다.

5. 척수해부 및 시료 채취

실험동물을 깊은 마취상태에 들게 한 후, 가슴을 열어 오름대동맥으로 삼관술을 시행하고 100 mL의 생리 식염수를 관류한 다음 400 mL의 4% paraformaldehyde로 관류고정하였다. 시술부위의 피부와 근육을 개방하여 절단근의 경우에는 절단된 신경의 몸쪽 말단을, 접합근의 경우에는 봉합된 L5 척수신경을 확인하였다. 시술측 L4, L5, L6 척수신경이 각각 척추사이구멍에서 출현하여 신경얼기(nerve plexus)를 형성하는 것을 확인하여 보존하고 고리판절제술(laminectomy)을 시행하였다. T1에서 S3에 이르는 척추고리판을 제거하여 척수를 노출시키고 양쪽 L4~L6 척수신경절을 확인하였다. L4 및 L6 척수뿌리를 길잡이로 L4 척수뿌리 중 가장 위쪽 척수작은뿌리가 척수와 접하는 지점, 그리고 L6 척수작은뿌리 중 가장 아래쪽 척수작은뿌리가 척수와 접하는 지점을 절단함으로써 L4에서 L6 척수분절을 얻었다.

절취한 척수조직을 관류고정액과 동일한 고정액에 2시간 동안 후고정하고 4°C에서 30% sucrose용액에 하룻밤 침적시켰다. 척수조직이 sucrose 용액 내에서 완전히 가라앉은 것을 확인한 후 Tissue-Tek OCT compound (Sakura Finetechnical Co. Tokyo, Japan)를 이용하여 조직을 봉입하고 드라이아이스로 급속 동결한 후, Cryostat Microtome (Leica Microsystems Inc., Wetzlar, Germany)을 이용하여 40 µm 두께의 연속관상절편을 제작하였다. 연속 절편은 0.1 M PB용액이 담긴 96 well plate에 차례로 분주하여 L4에서 L6 척수절편을 순서대로

취하였다. 절편제작이 완료된 조직절편은 cryo-protection solution (30% glycerol, 30% ethylene glycol, 0.2 M NaOH in 0.1 M PB)이 담긴 96 well plate에 순서대로 옮긴 후 -20°C에서 사용 시까지 보관하였다. 척수절편에서 수술한 쪽을 확인하기 위해, 연속관상절편 제작 전 20-gage syringe needle을 이용하여 반대쪽 뒤뿔(dorsal horn)에 작은 구멍을 뚫어주었다.

6. 일반염색 및 사진촬영

조직의 일반적인 형태변화 및 척수운동세포의 계수를 위하여 Cresyl violet 염색을 통상적인 방법으로 시행하였다. 신경세포를 특이적으로 염색하는 NeuN, 혹은 척수운동신경세포에서 특이적으로 발현되는 Cholineacetyltransferase (ChAT) 등의 면역조직화학염색을 이용한 정량이 가능하기는 하나, NeuN의 경우 주변의 중간 신경세포(interneurons)까지 비 특이적으로 염색하는 반면, 신경세포의 정확한 형태를 파악하는데 어려움이 있어 척수운동신경세포의 수를 계수하는 데는 적합하지 못하다. 또한, ChAT의 경우에는 신경세포의 생리 상태에 따라 발현 정도가 다를 수 있기 때문에 (Friedman 등 1995) 본 연구에서는 신경세포의 생리적 변화와는 관계없이 척수앞뿔에 존재하는 모든 척수신경세포를 확인할 수 있는 방법으로 Cresyl violet 염색을 선택하였다.

염색된 조직표본 및 FluoroGold에 형광성을 나타내는 조직절편은 적정 필터가 장착된 Olympus fluorescence microscope (BX41; Olympus Inc, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였으며, Axiovision image capture software (version 4.7; Carl Zeiss inc., Germany)가 장착된 Carl Zeiss digital camera (AxioCam; Carl Zeiss inc.)를 이용하여 영상을 촬영하였다. 촬영된 영상은 Adobe PhotoShop software (version 7.0; Adobe Systems Inc., USA)를 이용하여 최적 영상을 만들었다.

7. L5 운동신경세포의 계수

L4~L6 척수분절 내 180여개 절편 중, 흡수 번째 절편만을 순서대로 슬라이드에 붙인 후, Cresyl violet으로 염색하고 척수앞뿔의 형태학적 특징에 따라 연속 절편 중 L5 척수분절에 해당하는 25개 절편을 선택하였다 (50개의 L5 척수분절 절편 중 흡수 번째 절편을 선택; L5 척수분절 결정은 결과 참조). 현미경 100배하에서 계수하였으며, 계수를 담당하는 연구자들은 그 대상이 어떤 실험군에 속하는지 알지 못하도록 하여 실험자의 편견을 최소화하였다 (blind study).

시술 측 척수앞뿌를 4개의 사분면(위안쪽, 위바깥쪽, 아래안쪽, 아래바깥쪽)으로 나누고, Rexed lamina 분별법에 의거하여 주로 cell group VII 신경세포가 산재해 있는 위안쪽과 아래안쪽 척수앞뿌를 계측 대상에서 제외하였고, cell group IX 신경세포가 주로 존재하는 위바깥쪽 및 아래바깥쪽 척수앞뿌를 계측 대상으로 하였다. 특히 FluoroGold에 염색된 조직절편을 기준으로 계측 범위를 정하였으며, Cresyl violet 염색 하에서 핵과 핵소체가 뚜렷이 보이고, 니슬소체(Nissl substance)가 세포질 내에서 확인되는 다극형 신경세포만을 계측 대상으로 하였다. Cresyl violet 염색 하에서 신경세포 이외의 신경아교세포(neuroglial cells), 즉 별아교세포(astrocytes), 희소돌기아교세포(oligodendrocytes), 미세아교세포(microglia) 등은 그들의 핵(nucleus) 염색성에 의해 신경세포와 충분히 구분이 가능하였다.

8. 통계분석

획득한 연구결과는 SPSS (statistical package for social science)를 이용하여 통계처리 하였다. 각 25개 절편에서 얻어진 운동신경세포의 총 수를 도합하고, 각 실험군 별 평균치와 표준편차를 산출한 후, 각 군 간의 차이를 비교하기 위하여 one-way ANOVA를 이용하여 분석하였으며, $P < 0.05$ 일때 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. L5 척수신경 절단

연구자들은 연구내용 및 방법에서 제시한 수술기법을 통해 L5 척수신경만을 선택적으로 절단, 접합하는 수술을 성공적으로 수행할 수 있었다. 궁둥신경을 구성하는 L4~S3 척수신경 중 L4~L6 척수신경만이 외과적 접근이 가능하였으며 S1~S3 척수신경은 골반(pelvic bone) 내에서 출현하여 접근이 불가능하였다. 한편 외과적 접근이 가능한 L4~L6 척수신경 중 L6 척수신경은 엉덩뼈능선(ilial crest) 높이에서 출현하였으며, 절단술은 가능하였으나 엉덩뼈와 접하고 있어 접합술을 위한 공간 확보는 불가능하였다. 한편, L4 및 L5 척수신경은 절단 및 접합술 모두 가능하였으며, 연구자들은 L5 척수신경을 대상으로 본 연구를 수행하였다.

2. L5 척수분절의 범위

L5 척수분절을 확인하기 위하여, L5 척수신경 절단

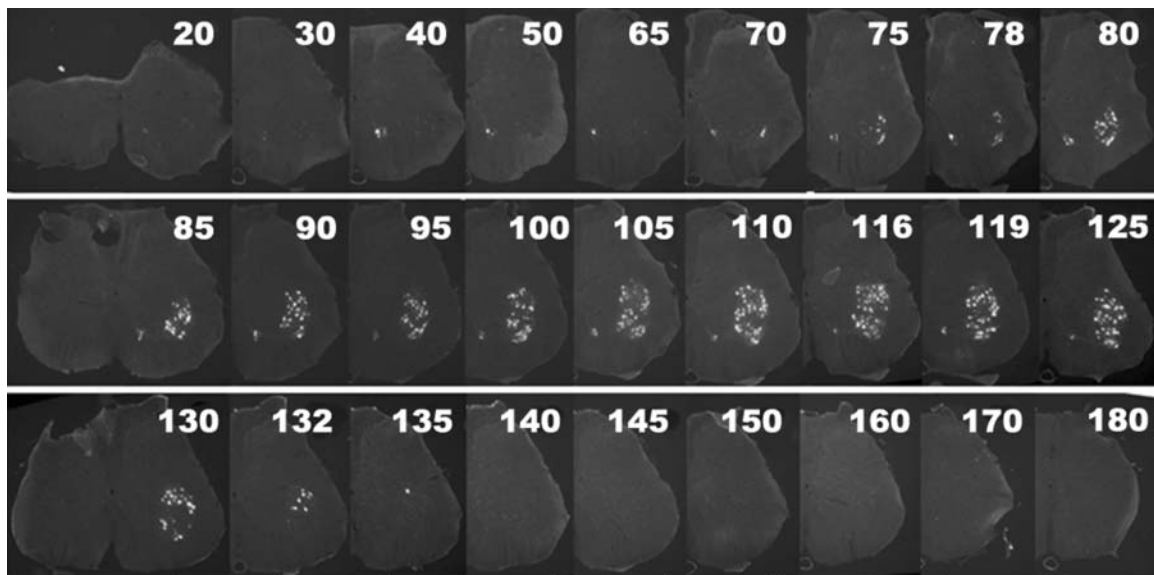
후 절단된 몸쪽 신경말단에 역행성추적자인 FluoroGold를 묻혀주었다. FluoroGold의 주입은 다섯 마리의 실험동물을 대상으로 시행하였으며, 실험동물마다 미세한 차이는 있었으나 FluoroGold에 형광성을 보이는 절편의 수 및 형광성을 보이는 신경세포의 수 등은 모든 실험동물에서 비슷한 양상을 보였다. 이에 본 연구결과의 데이터 제시 및 결과기술은 본 실험결과를 대표할 수 있는 한 실험동물 데이터를 기준으로 서술한다.

L4~L6 척수분절을 40 μ m 두께로 연속관상절편을 획득할 경우 180~200개 내외의 조직절편을 얻을 수 있다. 약 30번째 절편부터 아래안쪽 척수앞뿌에 존재하는 2~6개의 신경세포들이 형광성을 나타내기 시작하였으며, 이러한 현상은 115번째 절편까지 지속되었다. 한편 바깥쪽 척수앞뿌에 존재하는 신경세포들은 59번째 절편부터 신경세포들이 형광성을 보이기 시작하였으며, 78번째 절편부터는 그 수가 급속히 증가하여 79번째 절편부터 131번째 절편까지의 약 53개 절편에서는 바깥쪽 척수앞뿌에 20개가 넘는 신경세포들이 형광성을 나타내었다. 131번째 절편 이후로 형광성을 보이는 신경세포의 수는 급격히 감소하여 136번째 절편 이후로는 전혀 형광성을 나타내지 않았다(Fig. 2).

이 결과 아래안쪽 척수앞뿌에 존재하는 신경세포가 바깥쪽에 존재하는 신경세포보다 특이적으로 좀 더 높은 척수높이(약 20~30개의 척수절편 위쪽)에서 기원한다는 사실을 확인할 수 있었으며, 해부학적으로 L5 신경뿌리가 기원하는 높이와 상응하는 높이에서 형광성을 나타내는 신경세포는 바깥쪽 척수앞뿌 신경세포임을 확인할 수 있었다. 이에 신경세포의 계수 등 이후의 모든 계측은 바깥쪽 척수앞뿌 신경세포만을 대상으로 하였으며, 안쪽 척수운동신경세포는 조사범위에서 제외하였다. 그리고 바깥쪽 척수앞뿌세포 중 FluoroGold에 형광성을 보이는 신경세포의 수가 20개 이상인 절편은 약 55개 내외의 절편에서 확인되므로 이후 척수운동신경세포 계수를 위한 L5 척수분절의 범위는 50개의 조직절편으로 한정하였다.

3. Cresyl violet 염색에서의 L5 척수범위 결정

Cresyl violet 염색을 이용한 척수운동신경세포의 계수가 유의성을 갖는지 확인하기 위하여 FluoroGold에 형광성을 보이는 조직절편을 촬영한 후 동일한 조직절편에 대해 다시 Cresyl violet을 염색을 실시하여 사진 촬영하고 두 영상을 서로 비교하였다. 그 결과 FluoroGold에 형광성을 보이는 대부분의 척수운동신경세포가 Cresyl violet 염색에서도 척수운동신경세포로 판단되었



spinal cord serial number	Medial	Lateral	spinal cord serial number	Medial	Lateral	spinal cord serial number	Medial	Lateral
FG1-01 ~ FG1-29	0	0	FG1-84	4	23	FG1-111	4	41
FG1-30 ~ FG1-58	2 ~ 6		FG1-85	2	20	FG1-112	4	40
FG1-59	5	1	FG1-86	3	24	FG1-113	5	36
FG1-60	3	1	FG1-87	4	31	FG1-114	4	29
FG1-61	3	1	FG1-88	5	31	FG1-115	2	34
FG1-62	3	1	FG1-89	4	31	FG1-116	0	41
FG1-63	5	1	FG1-90	5	27	FG1-117	0	36
FG1-64	5	2	FG1-91	2	26	FG1-118	0	32
FG1-65	2	2	FG1-92	4	27	FG1-119	0	44
FG1-66	4	2	FG1-93	5	31	FG1-120	0	29
FG1-67	4	7	FG1-94	5	38	FG1-121	0	33
FG1-68	5	2	FG1-95	2	31	FG1-122	0	36
FG1-69	3	1	FG1-96	3	27	FG1-123	0	44
FG1-70	5	3	FG1-97	4	28	FG1-124	0	46
FG1-71	4	5	FG1-98	5	39	FG1-125	0	43
FG1-72	5	5	FG1-99	2	40	FG1-126	0	34
FG1-73	5	6	FG1-100	4	40	FG1-127	0	29
FG1-74	5	9	FG1-101	3	39	FG1-128	0	35
FG1-75	4	11	FG1-102	5	24	FG1-129	0	30
FG1-76	3	8	FG1-103	6	41	FG1-130	0	26
FG1-77	3	8	FG1-104	5	34	FG1-131	0	24
FG1-78	3	17	FG1-105	4	34	FG1-132	0	12
FG1-79	5	23	FG1-106	2	35	FG1-133	0	9
FG1-80	2	29	FG1-107	3	41	FG1-134	0	2
FG1-81	5	17	FG1-108	5	21	FG1-135	0	1
FG1-82	4	21	FG1-109	5	26	FG1-136 ~ FG1 180	0	0
FG1-83	4	25	FG1-110	4	38			

Fig. 2. FluoroGold fluorescent images from L4 to L6 spinal segments and its numeric presentation of the number of the FluoroGold fluorescent profiles in each tissue section. “Medial” and “Lateral” means the medial and lateral half of the ipsilateral ventral horn. Gray box represents the sections in which the number of the FluoroGold fluorescent neurons is above 20. Approximately 50 serial spinal sections could be considered as the L5 spinal segment.

다(Fig. 3).

한편 Cresyl violet 염색에서도 L5 척수분절을 분별할 수 있는지 확인하기 위하여, FluoroGold 형광성에 의거

하여 L5 척수범위를 확정한 L4~L6 연속조직절편에 대해 Cresyl violet 염색을 실시하고 각 척수단면의 특징을 관찰하였다. 그 결과 Cresyl violet 염색에서 L4, L5, L6

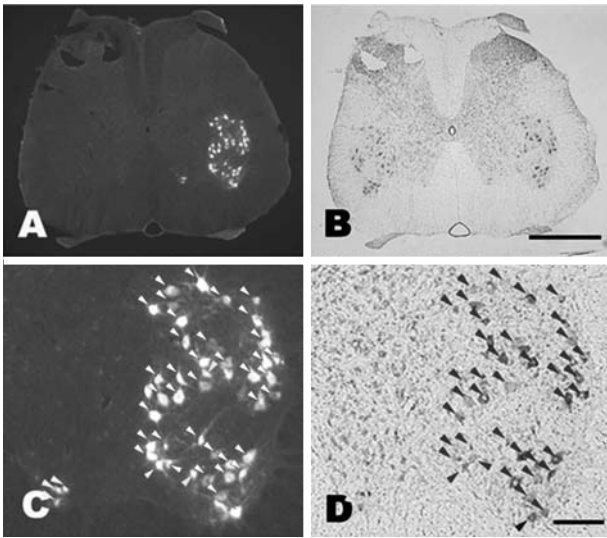


Fig. 3. Micrographic photographs of the FluoroGold fluorescent images (A and C) and its Cresyl violet stained images (B and D) in the same tissue section (3 days post axotomy). The (C) and (D) are magnified images of the (A) and (B), respectively. Note that almost all FluoroGold fluorescent profiles are in accordance with the spinal motoneurons which are identified by Cresyl violet stain. Scale bars in (B) and (D) represent 1 mm and 50 μ m, respectively.

척수앞뿌리의 모양 및 척수운동신경세포의 분포가 서로 다름을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). L4 척수분절의 경우, 척수앞뿌리의 아래바깥쪽에 척수운동신경세포들이 밀집되어 존재하며 척수앞뿌리가 아래바깥쪽으로 확장된 형태를 보인다. L5 척수분절에 이르면 척수앞뿌리가 바깥쪽 위아래로 크게 확장되며, 척수운동신경세포들이 아래바깥쪽과 위바깥쪽으로 넓게 분포하는 특징을 보인다. 그리고 L6 척수분절에서는 위바깥쪽 및 아래바깥쪽에 분포하는 운동신경세포들이 서로 분리되면서 위바깥쪽 척수운동신경세포들이 retrodorsal lateral motor nucleus (RDLN)를 형성하였다(Fig. 4).

따라서 Cresyl violet 염색 하에서 L5 척수범위를 알기 위해서 L4 척수분절의 전형적인 특징을 나타내는 가장 마지막 척수단면을 정하고, L6 척수분절의 전형적인 특징을 나타내는 가장 처음 척수단면을 정하였다. 이후 선택된 두 조직절편의 중앙에 존재하는 50개의 조직절편을 L5로 정하였다. 즉 L4의 전형적인 특징을 보이는 가장 마지막 단면이 40번째 절편이고, L6의 전형적인 특징을 보이는 가장 처음 단면이 130번째 절편이라면 그 중앙에 존재하는 절편의 수가 90개이므로 양 끝에

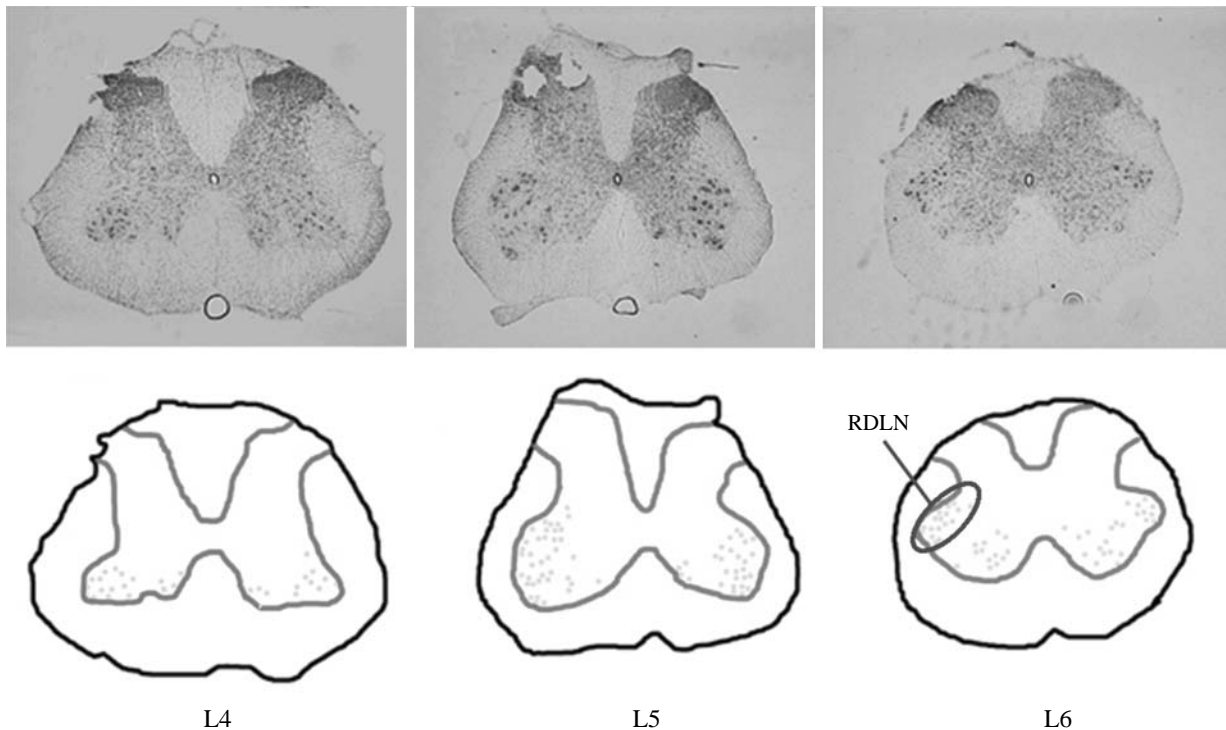


Fig. 4. Photographs of Cresyl violet stained L4, L5, and L6 spinal cord sections (upper panel) and their schematic presentation (lower panel). In L4 segment, the spinal motoneurons are clustered in the lower lateral ventral horn. In L5 segment, they are dispersed through the upper and lower lateral ventral horn, In L6 segment, the upper lateral and lower lateral cell groups are segregated, and the upper lateral cell groups form the retrodorsal lateral motor nucleus (RDLN).

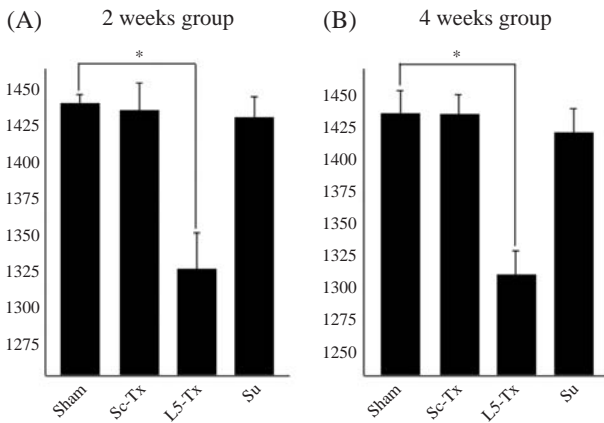


Fig. 5. Analysis of the number of L5 spinal motoneurons in 2 weeks (A) and 4 weeks groups (B). Sc-Tx, right sciatic nerve transected group; L5-Tx, right L5 spinal nerve transected group; Su, right L5 spinal nerve was transected and immediately sutured group; Su, all surgical procedures with L5-Tx group was performed except for the excision of L5 spinal nerve. Values are means ± SD, *P < 0.05; n=4~5 per group (ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test).

서 20개의 절편을 제외한 60번에서 110번까지의 절편을 L5로 선택하였다.

4. L5 척수운동신경세포의 계수

L5로 선택한 50개의 조직절편 중 흡수 번에 해당하는 25개의 절편을 선택하여 Cresyl violet 염색 후 척수신경세포의 수를 계수하였다. 그 결과 2주군의 경우 대조군(Sham) 1439 ± 6, 공동신경 절단군(Sc-Tx) 1434 ± 15, L5 절단군(L5-Tx) 1326 ± 26, 접합군(Su) 1427 ± 10 이었으며, 4주군의 경우에는 대조군(Sham) 1431 ± 11, 공동신경 절단군(Sc-Tx) 1430 ± 8, 척수신경 절단군(L5-Tx) 1321 ± 17, 접합군(Su) 1418 ± 13이었다(Fig. 5).

따라서 공동신경절단군은 시술 후 2주 및 4주가 경과한 후에도 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 척수운동신경세포 수의 변화를 보이지 않았다. 한편, L5 절단군은 2주가 경과하게 되면 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 척수운동신경세포의 수적 감소(8%)가 확인되었으며, 4주 후에는 2주군과 비교하여 통계적으로 유의한 변화를 나타내지 않았다. 그리고 접합군의 경우에는 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

고 찰

공동신경을 형성하는 척수신경 중, 단일 척수신경만

을 선택적으로 절단할 수 있는지 확인하기 위하여 쥐를 해부·관찰한 결과 S1~S3 척수신경은 골반뼈와 연결하여 척추사이구멍을 통해 출현하기 때문에 접근이 불가능하였다. L6 척수신경의 경우 외과적 접근이 가능하였으나 골반의 엉덩뼈능선(ilial crest)과 거의 동일한 척추높이에서 출현하여 접합술을 위한 공간 확보가 어려웠다. 따라서 L4와 L5 척수신경이 신경절단 및 봉합을 위한 외과적 접근이 가능하였으며, 이중 L5 척수신경을 선택하였다. 왜냐하면, L4 척수신경의 경우 공동신경 성분뿐 아니라 넙다리신경(femoral nerve)과 폐쇄신경(obturator nerve) 성분까지 함유하고 있으므로, 비교적 순수하게 공동신경 성분만을 함유한 L5 척수신경을 대상으로 하는 것이 이상적이라 판단하였다. 쥐에서 L5 척수신경만을 노출시켜 연구하는 방법은 통증연구를 위해 Kim과 Chung (1992)이 제시한 바 있으며, 이후 여러 연구자들에 의해 재현되었다(Hudson 등 2001, Lee 등 2003, Leichsenring 등 2008, Takahashi 등 2009). 이러한 일련의 연구들은 L5 척수신경에 통증 자극을 가한 후 척수시상로와 관련된 Rexed lamina II-V에 존재하는 세포들의 반응을 살핀 연구들로, 본 연구에서와 같이 척수운동신경세포의 정량분석을 위한 신경절단 연구는 이루어지 바 없다.

척수운동신경세포를 계수하는데 있어 실험자의 편견이 개입될 수 있는 가장 주요한 요소는 척수높이와 척추높이가 서로 다르다는 점이다. 발생과정에서 척추의 성장은 척수의 성장보다 상대적으로 빠르게 진행하기 때문에 목뼈 높이의 경우 척수높이와 척추높이가 비슷하다. 그러나 허리뼈 높이에 오면 척수높이와 척추높이는 커다란 차이를 보인다. 즉 허리척수분절이나 엉치척수분절의 경우 해당 척추높이에 비해 척수신경은 훨씬 높은 곳에서 기원하여 경질막내에서 말꼬리(cauda equina)를 형성하여 내려온다(Istaith 1975). 따라서 정확한 척수분절을 확인하기 위해서는 해당 척수뿌리가 형성하는 말꼬리를 길잡이로 하여 해당 신경의 척수잔뿌리가 척수에서 기원하는 위치를 기준으로 해야 한다. 그러나 기존 연구들은 정확한 척수높이를 제시하지 않고 있다(Vejtsada 등 1995, Zhang 등 2008). L6 척수분절에서 형성되는 retrodorsal lateral motor nucleus (RDLN)를 대상으로 하는 연구들이 있었으나, 이들 역시 명확한 계측 범위를 제시하지 않고 있다(Friedman 등 1995, Kishino 등 2001).

이번 연구에서는 L5 조직절편을 유실 없이 취하기 위해 L4~L6 척수분절을 넓게 취하였다. L5 척수분절만을 취하는 것은 조직처리과정 및 연속관상절편 제작

을 위한 trimming과정에서 오류가 발생할 가능성이 크기 때문이다. 한편 FluoroGold를 이용하여 L5 척수범위를 살펴보았을 때, 바깥쪽 척수앞뿌리에서 20개 이상의 신경세포가 형광성을 보이기 시작하는 절편 보다 약 50개 절편, 즉 약 2 mm (50 section*40 μm) 위쪽 높이에서부터 아래안쪽 신경세포들이 형광성을 보였다. 형태적으로 L5 신경잔뿌리들이 출현하는 범위와 FluoroGold 양성 세포들의 분포가 일치하는 것은 바깥쪽 척수앞뿌리 신경세포들이었다. 척수앞뿌리 운동신경세포 중 안쪽에 존재하는 신경세포들은 몸쪽 근육을 지배하고 바깥쪽에 존재하는 신경세포들은 먼쪽 근육을 지배한다(Haines 등 2006). 따라서 L5 척수신경을 구성하는 축삭 중 몸쪽 근육을 지배하는 축삭은 L5 척수분절보다 높은 척수분절, 즉 L4 척수분절에서 출현하여 척수 내를 하행한 후, L5 척수신경과 혼합되어 출현하며, 신경 절단에 따른 정량분석은 해당 척수분절의 바깥쪽 척수앞뿌리에 존재하는 신경세포를 대상으로 해야 한다는 사실을 확인할 수 있었다.

한편, L5 척수분절 50개의 절편 중 각 흡수 번째 25개 절편에 대해 척수운동신경세포의 수를 계수한 결과 대조군에서는 약 1,440여 개의 척수운동신경세포가 존재하는 것을 확인할 수 있었다. Retrograde tracer를 이용하여 궁둥신경 절단 후 L4~L6 척수분절을 대상으로 형광성을 보이는 전체 신경세포를 계수한 기존 보고(Schmalbruch 1986, Kobbert와 Thanos 2000)에서는 약 1,600여 개의 신경세포가 궁둥신경을 형성한다고 하여 본 연구 결과와 차이를 보인다. 이와 같은 결과는 궁둥신경 절단의 경우 오금부위 이하를 지배하는 신경세포들만 표지되는 반면, L5 척수신경 절단은 그 상위에 존재하는 근육들을 지배하는 신경들까지 표지하기 때문인 것으로 판단된다.

궁둥신경절단 모델을 기반으로 척수운동신경세포의 사멸을 관찰한 연구들에서는 궁둥신경절단에 의해서는 세포사멸이 전혀 일어나지 않는 것으로 보고되어 있다(Schmalbruch 1984, Wu 1993, Li 등 1995). 그리고 척수뿌리를 척수 접합부위에서 이탈시키는 신경뿌리발인손상(root avulsion injury)이나 신경뿌리절단손상(rhizotomy injury)을 시행할 경우에는, 시술 1주후 신경세포의 약 45%가 사멸하게 되고, 2주후에는 약 80% 이상이 사멸하는 것으로 보고되어 있다(Koliatsos 등 1994). 이번 연구에서도 궁둥신경 절단은 척수운동신경세포의 사멸이 유도되지 않는 것으로 확인되었다. 한편 L5 척수신경만을 선택적으로 절단할 경우에는 2주 후 약 8%의 신경세포가 감소하였다. 이 결과는 신경뿌리발인손

상으로 유도되는 사멸 정도와 비교해 보았을 때, 감소폭이 매우 작은 결과이며, 이상의 결과들은 신경절단이 이루어지는 부위가 신경세포로부터 얼마만큼 멀리 떨어져 있는지가 신경세포의 사멸을 결정하는 주요한 요소임을 의미한다.

하나의 신경세포는 작게는 수십 개에서 많게는 수십만 개에 이르기까지 다양한 다른 신경세포들과 연결관계를 형성하고 있다. 그러므로 동일한 신경핵 내의 신경세포들이라 할지라도 각 세포가 놓인 미세 환경은 서로 커다란 차이를 보일 수 있으며, 그 결과 같은 스트레스 상황에 대해서도 다른 반응을 보일 수 있다. 그러나 아직까지 이러한 차이를 나타내게 하는 원인에 대해서는 이해하지 못하고 있다. 이번 연구에서 L5 신경절단 2주 후에는 약 8%의 신경세포 수 감소가 확인되었으나, 4주 후에는 더 이상의 세포 수 감소가 나타나지 않았다. 얼굴신경 절단 모델의 경우에도 신경세포의 사멸이 약 15일에 최고점을 이루고 이후로 약간 감소하다가 더 이상 사멸하지 않는 것으로 보고되어 있다(Dai 등 2000). 따라서 L5 척수신경이 척추사이구멍을 빠져 나오는 부위에서 축삭절단이 이루어지면, 2주 내에 약 8% 내외의 저항성이 약한 L5 척수운동신경세포는 사멸하나, 나머지 신경세포들은 축삭절단반응에 적응하여 사멸하지 않고 생존할 수 있는 것으로 생각된다. 물론 시간경과에 따른 척수운동신경세포의 생존 및 사멸 정도는 좀 더 오랜 기간을 두고 관찰할 필요성이 있다. 한편 L5 척수신경절단 후 즉각적으로 접합이 이루어졌을 경우에는 해당 척수운동신경세포의 사멸이 유도되지 않는 것으로 판단되었다.

이번 연구를 통해 연구자들은 궁둥신경절단 모델보다 좀 더 신뢰도가 높은 새로운 말초신경절단모델을 제안할 수 있었다. 이번 연구는 L5 척수운동신경세포에서 기원하는 거의 대부분의 축삭을 절단하고, 제한된 L5 척수분절에 국한하여 연구를 진행한다는 점에서 기존의 연구 방법에 비해 신뢰도가 높은 방법이라 생각한다. 따라서 본 모델은 말초신경절단 연구, 특히 하지를 대상으로 말초신경 절단 후 척수운동신경세포의 변화 및 약물효과 등을 살피는 연구에 적용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Aguayo AJ : Axonal regeneration from injured neurons in the adult mammalian central nervous system, New York, The Guilford Press, pp 457-484, 1985.

- Chan YM, Yick LW, Yip HK, So KF, Oppenheim RW, Wu W : Inhibition of caspases promotes long-term survival and reinnervation by axotomized spinal motoneurons of denervated muscle in newborn rats. *Exp Neurol* 181: 190-203, 2003.
- Dai CF, Kanoh N, Li KY, Wang Z : Study on facial motoneuronal death after proximal or distal facial nerve transection. *Am J Otol* 21: 115-118, 2000.
- Friedman B, Kleinfeld D, Ip NY, Verge VM, Moulton R, Bolland P, Zlotchenko E, Lindsay RM, Liu L : BDNF and NT-4/5 exert neurotrophic influences on injured adult spinal motor neurons. *J Neurosci* 15: 1044-1056, 1995.
- Gordon T, Sulaiman O, Boyd JG : Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst* 8: 236-250, 2003.
- Haines DE, Mihailoff GA, Yezierski RP : The spinal cord, Fundamental neuroscience for basic and clinical applications, 3rd ed., Philadelphia, Elsevier, pp 150-153, 2006.
- Hart AM, Terenghi G, Kellerth JO, Wiberg M : Sensory neuroprotection, mitochondrial preservation, and therapeutic potential of N-acetyl-cysteine after nerve injury. *Neuroscience* 125: 91-101, 2004.
- Hudson LJ, Bevan S, Wotherspoon G, Gentry C, Fox A, Winter J : VR1 protein expression increases in undamaged DRG neurons after partial nerve injury. *Eur J Neurosci* 13: 2105-2114, 2001.
- Ijkema-Paassen J, Jansen K, Gramsbergen A, Meek MF : Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. *Biomaterials* 25: 1583-1592, 2004.
- Istaith AR : Vertebromedullary topography and its postnatal changes in the rat. *Folia Morphol* 23: 397-403, 1975.
- Kim SH, Chung JM : An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50: 355-363, 1992.
- Kishino A, Katayama N, Ishige Y, Yamamoto Y, Ogo H, Tatsuno T, Mine T, Noguchi H, Nakayama C : Analysis of effects and pharmacokinetics of subcutaneously administered BDNF. *Neuroreport* 12: 1067-1072, 2001.
- Kobbert C, Thanos S : Topographic representation of the sciatic nerve motor neurons in the spinal cord of the adult rat correlates to region-specific activation patterns of microglia. *J Neurocytol* 29: 271-283, 2000.
- Koliatsos VE, Price WL, Pardo CA, Price DL : Ventral root avulsion: an experimental model of death of adult motor neurons. *Comp Neurol* 342: 35-44, 1994.
- Lee DH, Iyengar S, Lodge D : The role of uninjured nerve in spinal nerve ligated rats points to an improved animal model of neuropathic pain. *Eur J Pain* 7: 473-479, 2003.
- Leichsenring A, Backer I, Wendt W, Andriske M, Schmitz B, Stichel CC, Lubbert H : Differential expression of Cathepsin S and X in the spinal cord of a rat neuropathic pain model. *BMC Neurosci* 12: 9: 80, 2008.
- Li L, Wu W, Lin LF, Lei M, Oppenheim RW, Houenou LJ : Rescue of adult mouse motoneurons from injury-induced cell death by glial cell line-derived neurotrophic factor. *PNAS* 92: 9771-9775, 1995.
- Schmalbruch H : Fiber composition of the rat sciatic nerve. *Anat Rec* 215: 71-81, 1986.
- Schmalbruch H : Motoneuron death after sciatic nerve section in newborn rats. *J Comp Neurol* 224: 252-258, 1984.
- Sendtner M, Holtmann B, Kolbeck R, Thoenen H, Barde YA : Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature* 360: 757-759, 1992.
- Takahashi Y, Ohtori S, Takahashi K : Peripheral nerve pathways of afferent fibers innervating the lumbar spine in rats. *J Pain* 10: 416-425, 2009.
- Vejsada R, Sagot Y, Kato AC : Quantitative comparison of the transient rescue effects of neurotrophic factors on axotomized motoneurons in vivo. *Eur J Neurosci* 7: 108-115, 1995.
- Woodburne RT, Burkel WE : Essentials of human anatomy, 8th ed., New York, Oxford University Press, pp 340-346, 1988.
- Wu W : Expression of nitric-oxide synthase (NOS) in injured CNS neurons as shown by NADPH diaphorase histochemistry. *Exp Neurol* 120: 153-159, 1993.
- Zhang J, Xie Z, Lei Y, Song J, Guo Q, Xiao J : Free second toe one-stage-plasty and transfer for thumb or finger reconstruction. *Microsurgery* 28: 25-31, 2008.

Comparative Study of the L5 Spinal Nerve Transection Model and Sciatic Nerve Axotomy Model as a Peripheral Nerve Injury Model in Rat

Dae-Yong Song, Ji-Hye Lee, Ha-Nul Yu, Chae-Ri Park, Ran-Sook Woo, Sung-Youp Hong¹, Young-Hee Cheon², Hyung-Nam Goo³, Tai-Kyoung Baik

Department of Anatomy and Neurosciences, School of Medicine, Eulji University, Daejeon, Korea

¹*Department of Emergency Medicine, College of Medicine, Catholic University of Korea, Seoul, Korea*

²*Department of Pediatrics, School of Medicine, Yonnam University, Daegu, Korea*

³*Department of Forensic Medicine, National Forensic Service, Seoul, Korea*

Abstract : The aim of this study was to propose new more reliable peripheral nerve transection model to overcome the defect of the traditional sciatic axotomy model by specifically transecting L5 spinal nerve just after emerging from the intervertebral foramen and confining analysis area to the L5 spinal segment.

The adult male Sprague-Dawley rats, weighing 300~350 g at the time of surgery, were used for the experiments. Four different experimental groups were used. 1. Sciatic nerve transection (Sc-Tx) group: transect the sciatic nerve in the popliteal fossa where it divided into the common peroneal nerve and tibial nerve. 2. L5 spinal nerve transection (L5-Tx) group: L5 spinal nerve was specifically transected. 3. Suture (Su) group: L5 spinal nerve was transected and immediately sutured. 4. Control group: the same surgical procedure with L5 spinal nerve transection group was performed except for the excision of L5 spinal nerve. To distinguish L5 motoneurons from the other level ones, the animals were received the retrograde tracer, FluoroGold into the axotomized proximal nerve stump.

Serial coronal frozen sections at 40 μm thick through the L4 to L6 spinal segment was performed and the resultant total number of sections was about 180. Approximate serial 50 sections (approximately 2 mm) could be considered as the L5 segment based on the number of the fluorescent signals (above 20). L5 spinal segment could be differentiated from L4 and L6 segment based on their morphological characteristics under Cresyl violet stain. In L5-Tx group, at 2 and 4 weeks post-transection, the number of L5 spinal motoneurons was reduced by 8%. Meanwhile, Sc-Tx and Su groups showed no statistically notable changes.

In this study, the authors could propose more reliable peripheral nerve axotomy model than the conventional sciatic nerve axotomy model by specifically transecting L5 spinal nerve and confining the investigating area within the L5 spinal segment.

Keywords : Peripheral nerve transection, L5 spinal nerve, Spinal motoneuron, FluoroGold, Cresyl violet