

공동신경 손상을 유발한 흰쥐에서 운동이 근육재생에 미치는 영향

노효련*

*강원대학교 작업치료학과

e-mail:withtry@kangwon.ac.kr

Effect of Exercise on Muscle Recovery of Sciatic Nerve Injured Rats

Hyo-Lyun Ro*

*Dept of Occupational Therapy, Kangwon National University

요 약

이 연구의 목적은 흰쥐의 공동신경의 손상을 준 뒤 달리기운동을 시켜 운동이 근육재생에 효과가 있는지를 밝힐 목적으로 시행하였다. 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐의 공동신경을 압케손상을 준 후, 하루 60분 씩 주 5회 운동을 시켰다. 공동신경 압케손상 후 12일(5일간 운동), 19일(10일간 운동), 26일(15일간 운동), 33일(20일간 운동 및 61일(40일간 운동)에 흰쥐를 희생시켜 장딴지근육을 절취하여 냉동절편을 만들었으며 중간세사인 desmin과 vimentin에 대한 면역조직화학적 염색방법을 시행하였고 NADH-TR을 이용한 효소조직화학적 방법으로 뼈대근육의 변성 등을 관찰하였다.

중간세사단백 중 desmin은 근육섬유의 변성 및 재생과정 모두에서 발견되며 vimentin은 재생과정에서만 발견되었다. 대조군보다 실험군에서 desmin과 vimentin의 면역 반응성이 높았고, 실험군의 근육섬유들은 손상 후 61일째에 횡단면에서 각을 갖고 있어 정상 근육섬유임을 입증해 주었으나 대조군의 근육섬유는 정상으로 회복되지 않은 등근 근육섬유가 관찰되었다. 19일째의 NADH-TR반응에서 대조군에서는 근육 섬유형 군집(fiber type grouping)으로 인해 diformazan 과립이 묻쳐져 있음을 볼 수 있으나 실험군에서는 점점 diformazan 과립이 고르게 분포됨을 볼 수 있었다. 재신경지배가 일어날 때 나타나는 표적근육섬유(target fiber)는 NADH-TR반응에서 26일 실험군의 일부 근육섬유에서 처음으로 관찰되었다. 61일째 NADH-TR반응에서 대조군은 아직도 diformazan 과립이 근육섬유성 군집을 보였으나 실험군에서는 정상군과 다름없는 염색성이 관찰되었다. 이상의 결과로 흰쥐 공동신경 압케손상 후 트레이드밀 달리기 운동이 흰쥐 다리 뼈대근육의 중간세사발현에 효과가 있다고 생각된다.

1. 서론

근육의 재생과정에서, 중요한 역할을 하는 것이 근육의 세포뼈대를 이루는 중간세사(intermediate filament)라고 알려져 있다[1]. 뼈대근육(skeletal muscle)의 중간세사 중 desmin과 vimentin은 성숙한 정상 근육섬유에서 보다는 미성숙 근육섬유에서 더욱 강하게 반응하는 것으로 알려져 있으나[2] 탈신경된 근육섬유에서의 중간세사에 대한 출현 여부 및 시기는 의견이 분분한 실정이다[3].

말초신경손상 환자에서 신경손상에 따르는 관절구축이나 근육위축 등의 이차적 합병증을 예방하고 기능 회복을 돕기 위한 목적으로 재활의학이나 물리치료영역에서 운동은 기본적인 치료방법의 하나로 알려져 있다[4]. 지구력 운동은 뼈대근육 내 모세혈관 및 사립체(mitochondria)의 밀도와 수를 증가시킬 뿐만 아니라 근육섬유의 성장이나 전환을 유도한다[5].

신경손상을 유발한 동물실험 모델에서 운동이 손

상 후의 운동 및 감각기능 회복, 신경재생 등에 미치는 영향에 대해서 연구하여 여러 가지 근육 및 신경 기능 관련 변수들에 대한 결과가 보고되었으나, 각 연구에서 이용된 운동의 종류, 운동 시작시기, 강도 및 지속시간 등에 따라 다양하며, 때로는 상반되는 연구 결과들이 있었다. 이에 본 연구에서는 흰쥐 공동신경에 압케손상을 준 후 트레이드밀 운동을 통해 중간세사단백의 발현변화를 밝혀 뼈대근육의 재생을 증진시키는 효과를 갖는지 알아보고자 하였다.

2. 재료 및 방법

실험동물은 성인 수컷 흰쥐(150-180g, Sprague-Dawley) 22마리를 실험군(10마리)과 대조군(10마리) 그리고 정상군(2마리)으로 사용하였다. 실험군은 공동신경 압케손상 후 경과한 일수를 기준으로 12일군(5일간 운동군), 19일군(10일간 운동군), 26일군(15일간 운동군), 33일군(20일간 운동군) 및 61일군(40일

간 운동군)으로 분류하였고, 각 실험군마다 2마리씩 운동시켰다. 각 실험군의 대조군으로 압케손상을 준 후 운동을 시키지 않은 흰쥐 2마리씩을 사용하였다. 또한 압케손상과 운동을 시키지 않은 흰쥐 2마리를 정상군으로 사용하였다. 실험군 흰쥐들을 이중 트레드밀(Dual treadmill, model DJ2-2429, 대종기기, 한국)을 이용하여 미리 1주일 동안 하루에 30분씩 18m/분 속도로 적응 훈련을 시켰다. 각 실험군 별로 하루 60분씩 주 5회 운동을 시켰으며, 트레드밀의 경사도는 10도, 속도는 20m/min(50%의 V_{O_2max})이었다[29].

압케손상 방법은 마취시킨 동물의 공동신경을 지혈집게로 동일한 압력(4.7 kg/cm²)으로 30초간 연속적 적용하여 압케손상을 주었다(De Koning 등 1986). 손상 후 12, 19, 26, 33, 61일째에 희생시켜 흰쥐의 오른쪽 장딴지근의 이는곳(origin)과 닿는곳(insertion)의 중간부위를 절취하여 약 10초간 동결 고정 후 동결절편기(cryocut, Reichert-Jung, Germany)를 사용하여 약 6 μ m 두께로 조직절편을 만들고 고정, 건조시켰다.

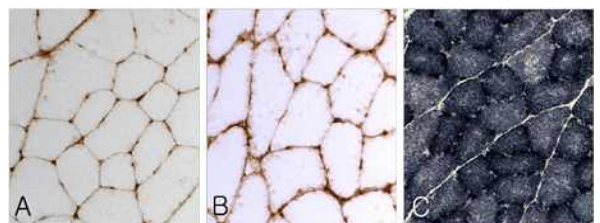
조직절편을 0.02M 인산염 완충액(phosphate buffered saline; PBS, pH. 7.4)에서 세척후 조직 내 과산화효소의 활성을 차단하기 위해 0.3% 과산화수소(H₂O₂)가 포함된 메틸알코올을 첨가시킨 용액에서 20분간 처리하고, PBS로 다시 세척한 다음 5% 정상 말혈청(normal horse serum)에 30분간 유치하였다. 그 후 조직절편들을 세척하지 않고 가볍게 털어 낸 다음 일차항체인 mouse anti-rat desmin antibody(희석비율 1:200, Serotec, UK) 및 mouse anti-rat vimentin antibody(희석비율 1:200, Serotec, UK)를 각각 적용시켰다. 일차항체와 이차항체(biotinylated horse anti-mouse IgG; Vector Lab, California, USA)를 실온에서 1시간 동안 적용시켰다. 그 후 조직절편들을 PBS로 수세한 다음 ABC(avidin-biotin horseradish peroxidase complex)용액(Vector Lab, California, USA)을 적용시켰다. 이어서 PBS로 세척한 조직절편을 0.05M Tris-HCl buffer에 0.05% DAB(3,3'-diaminobenzine tetra hydrochloride, Sigma Co, USA)와 0.01% 과산화수소가 혼합된 용액으로 처리하여 발색시켰다. 조직절편의 정색상태를 현미경하에서 확인한 후 세척한 후, 대조염색을 하고, 통상적인 과정으로 Permount(Polysciences, Warrington, PA, USA)로 봉입하였다. 비특이성 결합을 배제하기 위한 대조실험에서는

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

효소조직화학적 염색을 하기 위하여 조직절편을 실온에서 20분 정도 말린 후 NADH-TR (Nicotina mide Adenine Dinucleotide-Tetrazolium Reductase)에 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 Acquimount (Polysciences, USA)로 봉입하였다. 근육조직의 검경은 광학현미경(Axiophot, Zeiss, Germany)으로 시행하였고, 사진은 디지털 카메라(Axicam, Zeiss, Germany)로 촬영하였다.

3. 결과

정상군의 장딴지근육에서의 desmin과 vimentin에 대한 반응과 NADH-TR 반응활성도는 [그림 1]과 같다. 공동신경 압케손상 후 12일군(5일간 운동), 19일군(10일간 운동)과 26일군(15일간 운동), 33일군(20일간 운동), 61일군(40일간 운동)에서 desmin과 vimentin, NADH-TR 반응은[그림 2], [그림 3], [그림 4], [그림 5], [그림 6] 와 같다.

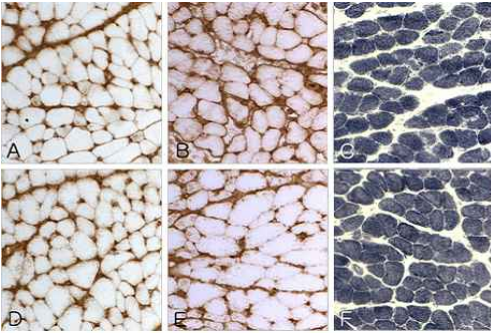


[그림 1]. Cross sectional muscle fibers at normal gastrocnemius muscle of rat. Section were immunoreacted with desmin(A), vimentin(B), NADH-TR(C). Muscle fibers showed their normal polygonal appearances. Original magnification. x 250.

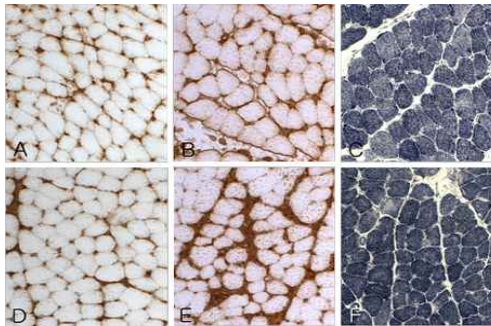
4. 고찰

신경이 압케손상되면 근육섬유들은 작은 분절로 나뉘게 되며[6], 근육섬유들은 포식작용(phagocytosis)에 의해 지속적으로 제거된다[7]. 이 실험에서도 근육의 변성과정은 손상 후 대조군에서는 19일째 까지 진행되는 것이 관찰되었다. 특히, 손상 후 12일째에서는 대조군의 근육섬유가 심하게 괴사된 상태였고 일부 부위에서는 조직구들을 포함한 것이 많이 관찰되었다[그림 2].

정상 근육발생시 desmin은 매우 중요한 조절인자



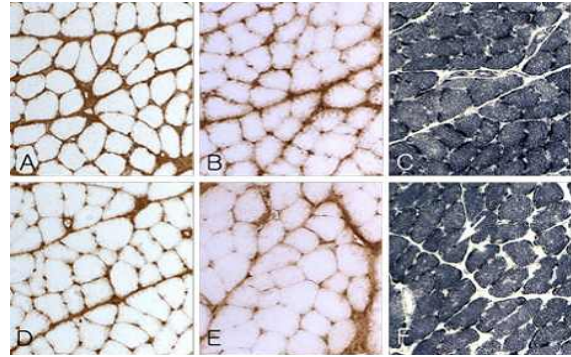
[그림 2]. 12th day after crushing injury. The control group showed a more intensive immunoreaction for desmin and vimentin(A, B) than the experiment group(D,E). Cross sections were immunoreacted for desmin(AD), vimentin(B,E), NADH-TR (C,F). control groups (A,B,C), experimental groups (D,E,F). Original magnification. x 250.



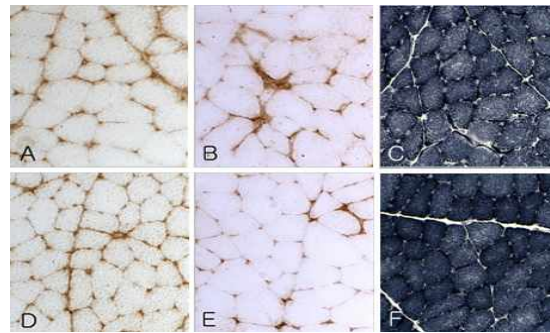
[그림 3]. 19th day after crushing injury. Regeneration of muscle fibers and strong intensity of immunolabelling were observed in the control group. Immunoreactivity of vimentin was more strong than that of the experiment group. Cross sections were immunoreacted for desmin(A,D), vimentin(B,E), NADH-TR(C,F). control groups(A,B,C), experimental groups(D,E,F). Original magnification. x 250.

로 추측하는데[8]. 이 연구에서도 근육재생시 desmin 양성 면역반응을 보이는 근육섬유들이 다수 출현하였다. Bornemann과 Schmalbruch[9]는 흰쥐의 궁둥신경을 절단 손상시킨 후 1주에서 52주까지 관찰한 결과 desmin이나 vimentin이 나타나지 않았다고 하였으나, Goebel[10]은 성인과 어린이의 탈신경의 NADH-TR반응에서 대조군에서는 diformazan 과립이 묻혀져 있음을 볼 수 있으나 실험군에서는 점점 diformazan 과립이 고르게 분포됨을 볼 수 있었다. 신경 손상 후 26일째 실험군에서 일부 근육섬유들은 등근형태의 회복양상을 보였지만 대부분은 거의 정상으로 회복되어 있었다[그림, 4D, E].

재신경지배가 일어날 때 나타나는 표적근육섬유(target fiber)는 NADH-TR 반응에서 26일 실험군

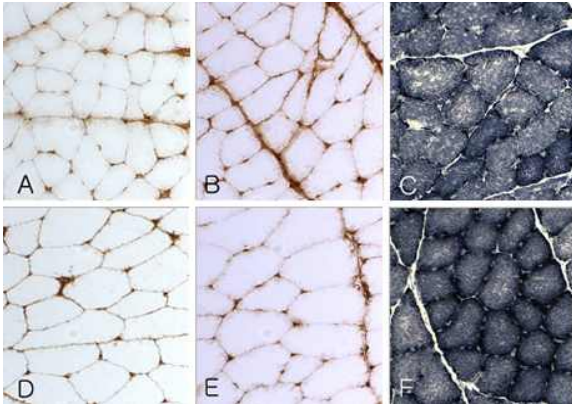


[그림 4]. 26th day after crushing injury. The control group showed strong positive reaction for desmin and vimentin containing several central nuclei. Target fiber was first observed in the NADH-TR reaction(F)(arrow). Cross sections were immunoreacted for desmin(A,D), vimentin(B,E), NADH-TR(C,F). control groups(A,B,C), experimental groups(D,E,F). Original magnification. x 250.



[그림 5] 33rd day after crushing injury. Most of the muscle fibers revealed regeneration and positive reaction for desmin but not vimentin in the experiment group. Only large fibers showed positive reaction for vimentin in the control group. Cross sections were immunoreacted for desmin(A,D), vimentin(B,E), NADH-TR(C,F). control groups(A,B,C), experimental groups(D,E,F). Original magnification. x 250.

으로 위축된 근육섬유에서 desmin이 나타난다고 보고하였다. 이와 같이 탈신경된 근육섬유에서의 desmin의 출현여부는 의견이 분분하지만 본 연구에서는 desmin뿐만 아니라 vimentin도 발현됨이 확인되었다. 본 연구에서 신경손상 후 19일째 실험군에서는 근육섬유들은 크기가 작았고 여러개의 중심핵을 갖고 있었다. vimentin 양성 반응을 보이는 근육섬유들은 소수만 관찰되었다. vimentin은 근육모세포나 성장 중인 근육대롱 세포 등에서 관찰되며 성숙된 근육섬유에서는 없어진다[11]라고 하였으므로, 이 시기에도 계속적인 재생이 일어나고 있다고 할 수 있다. 19일째



[그림 6]. 61st day after crushing injury. Weak immunoreaction for desmin and vimentin was still appeared in the control group but not in the experiment group. Diformazan granules showed the shape of fiber type grouping in the control group whereas they were regularly distributed and expressed close to normal staining in the experiment group by NADH-TR reaction. Cross sections were immunoreacted for desmin(A,D), vimentin(B,E), NADH-TR(C,F). control groups(A,B,C), experimental groups(D,E,F). Original magnification. x 250.

의 일부 근육섬유에서 처음으로 관찰되었다(그림, 4F). Desmin에 양성 반응을 보이는 근육섬유들은 거의 관찰되지 않은 반면 vimentin 양성 반응을 보이고 있어서, desmin이 vimentin보다 일찍 사라지는 것을 알 수 있었다.

근육 손상 후 61일째에서는 대부분의 실험군 근육섬유들이 정상 근육섬유로 회복되고 있었고, Desmin에 반응한 근육섬유는 거의 관찰되지 않았으며 근육섬유는 횡단면에서 각을 이루고 있어 정상 근육섬유임을 입증해 주고 있었다. 그러나 일부 대조군의 근육섬유들은 vimentin 양성 반응을 보이고 있었으며 이런 경우의 근육섬유는 회복 단계인 것을 시사해 주었다. NADH-TR반응에서는 diformazan 과립이 대조군에서는 근육섬유성 군집을 보였으나 실험군에서는 과립이 고르게 깔려 있고 정상군과 다른 염색성이 관찰되었다.

그러므로 신경손상 후 운동을 적용한 실험군과 운동을 적용하지 않은 대조군에서 desmin과 vimentin 중간체사단백 발현의 차이를 나타낸다는 본 연구의 결과는 재활의학이나 물리치료 분야의 신경 및 근육계통의 질환에서 근육의 변성과 재생을 진단하는데 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

[1] Best TM, Hunter KD, "Muscle injury and repair".

Phys Med Rehabil Clin N Am Vol. 11, pp. 251-266, 2000.

[2] Li H, Choudhary SK, Milner DJ, Munir MI, Kuisk IR, Capetanaki Y, "Inhibition of desmin expression blocks myoblast fusion and interferes with the myogenic regulators MyoD and myogenin.", J Cell Biol, Vol.124, pp827-841, 1994.

[3] Tews DS et al, "Expression profile of stress proteins, intermediate filaments, and adhesion molecules in experimentally denervated and reinnervated rat facial muscle". Exp Neurol Vol. 146, pp. 125-134, 1997.

[4] Dobkin, BH. Neurologic rehabilitation. Philadelphia, FA: Davis, 1996.

[5] Satin B, Gollnick PD, "Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism and performance". Am Physiol Soc, pp. 555-631, 1983.

[6] Kakulas BA, Adams RD : Disease of muscle : Pathological foundations of clinical myology, 4th ed, Philadelphia, Harper & Row, 131-163, 1985.

[7] Hughes JT : Pathology of muscle, WB Saunders, Philadelphia, pp. 57-60, 1974.

[8] Lescaudron L et al, "Desmin-lacZ transgene, a marker of regenerating skeletal muscle". Neuromuscu Disord, Vol. 3, pp. 419-422, 1993.

[9] Bornemann A, Schmalbruch H, "Desmin and vimentin in regenerating muscles". Muscle Nerve, Vol. 15, pp. 14-20, 1992.

[10] Goebel HH, "Desmin-related neuromuscular disorders". Muscle Nerve, Vol. 18, pp. 1306-1320, 1995.

[11] Herbison GJ, Jaweed MM, Ditunno JF, "Reinnervating rat skeletal muscle effect of 35% grade treadmill exercise". Arch Phys Med Rehabil, Vol. 63, pp313-316, 1982.