대한음성언어의학회지
제12권 제2호 2001

□원 저□

흰쥐에서 편측 반회후두신경 재지배 후 Phopholipase C-γ1(PLC-γ1)의 발현과 후두기능회복과의 관계

이화여자대학교 의과대학 이비인후과학교실, 울산대학교 의과대학 병리학교실*
신혜정 · 정성민 · 김성숙* · 김문정 · 윤선옥 · 박수경 · 신유리 · 김진경

= Abstract =

Enhanced Expression of Phospholipase C-γ1 in Regenerating Murine Neuronal Cells by Pulsing Electromagnetic Field

Hye Jung Shin, M.D., Sung Min Chung, M.D., Sung Sook Kim, M.D.,*
Moon Jung Kim, M.D., Sun Ok Yoon, M.D., Su Kyoung Park, M.D.,
You Ree Shin, M.D., Jin Kyung Kim, M.D.

Department of Otolaryngology, College of Medicine, Ewha Womans University, Seoul, Korea
Department of Pathology, College of Medicine, Ulsan University, Ulsan, Korea*

Background and Objectives : Signal traduction through phospholipase C(PLC) participate in the regulation of cell growth and differentiation. Growth factors bind to their receptors and thereby induce tyrosine phophorylation of the phospholipase C-γ1(PLC-γ1). PLC-γ1 is a substrate for several receptor tyrosine kinases and its catalytic activity is increased by tyrosine phosphorylation. Tyrosine kinase phosphorylation of PLC-γ1 stimulates PLC activation and cell proliferation. However the signal transduction pathway and the significance of PLC in injured recurrent laryngeal nerve regeneration is unknown. Therefore after we obtained fuctionally recovered rats using PEMF in this study, we attempt to provide some evidence that PLC plays a role in nerve regeneration itself and regeneration related to PEMF through the analysis of the difference between fucntional recovery group and non-recovery group in the recurrent laryngeal nerve.

Materials and Method : Using 32 healthy male Sprague-Dawley rats, transections and primary anastomosis were performed on their left recurrent laryngeal nerves. Rats were then randomly assigned to 2 groups. The experimental group(n=16) received PEMS by placing them in custom cages equipped with Helm-holz coils(3hr/day, 5days/wk, for 12wk). The control group(n=16) were handled the same way as the experimental group, except that they did not receive PEMS. Laryngo-videoendoscopy was performed before and after surgery and followed up weekly. Laryngeal EMG was obtained in both PCA and TA muscles. Immunohistochemisty staining and Western blotting analysis using monoclonal antibody was performed to detect PLC-

논문접수일 : 2001년 9월 26일
심사완료일 : 2001년 10월 19일
책임저자 : 정성민, 서울 양천구 목동 911-1 이화여자대학교 의과대학부속 이비인후과학교실
전화 : (02) 650-6163 · 전송 : (02) 648-5604 E-mail : sungmin@mm.ewha.ac.kr

γ1 in recurrent laryngeal nerve and nodose ganglion.

Results : 10 rats(71%) in experimental group and 4 rats(38%) in the control group showed recovery of vocal fold motion. Functionally-recoverd rats show PLC-γ1 positive cells in neuron and ganglion cells after 12 weeks from nerve injury.

Conclusion : This study shows that PLC-γ1 involved in singnal trasduction pathway in functinal recovery of injured recurrent laryngeal nerve and PEMF enhance the functional recovery by effect on this molecule.

KEY WORDS : Recurrent laryngeal nerve · Reinnervation · Functional recovery · Phospholipase C-γ1(PLC-γ1).

서 론

반회후두신경손상으로인한 편측 혹은 양측성대마비의 치료에 있어 가장 이상적이라 할 수 있는 것은 운동특이적인 신경의 적절한 재 분포로 인한 신경의 재생이라 할 것이나 여러 가지 문제점으로 인하여 실제 임상에서 적용하기에는 많은 어려움이 있다. 반회신경의 재생에 있어 그 분자적 기전은 아직 명확하게 밝혀진 바가 없으나 세포내에서 일어나는 여러 가지 생리적 현상은 세포의 외부환경으로부터 전달되어 오는 다양한 신호가 세포들사이에서 연결물질을 통해 세포내로 전달되어 이루어 진다 하겠다.

이렇게 외부의 정보가 세포내로 전달되는 과정을 신호전달(signal transduciton)이라고 한다.[1] 생체나 세포에서의 생리적 현상은 diacylglycerol(이하 DAG로 약함)와 inositol 1,4,5 triphosphate(이하 PIP3로 약함)가 관여하는데, phospholipase C-γ1(이하 PLC-γ1로 약함)는 receptor protein tyrosine kinase의 기질로 성장인자의 자극을 받은 후 활성화 되어 phosphatidyl inositol 4,5-biphosphate(이하 PIP2로 약함)를 PIP2와 DAG로 가수분해하여 protein kinase C(이하 PKC로 약함)활성 및 Ca^{2+}의 대사조절, DNA증가와 세포의 분화 및 세포의 종양변환을 유발하고 arachidonic acid의 생성에도 관여하는 이차물질로 알려지고 있다.[2]

따라서 손상후 신경기능회복에 관여하는 PLC-γ1의 역할 등을 밝히는 노력은 매우 중요하리라 생각되며 더욱이 반회후두신경재생의 신호전달체계에 관한 연구는 아직 미흡한 실정이므로 저자들은 이 연구를 통하여 손상된 반회후두신경 재생에 있어 PLC-γ1의 발현을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물로는 건강하고 정상적인 성대의 움직임을 보이는 36마리의 수컷 Sprague-Dawley계 흰 쥐를 사용하였다

2. 반회후두신경재지배

32마리는 반회신경 절단과 재 문합을 시행하였으며 이때 윤상갑상근에 의한 영향을 최소화 하기 위하여 동측 상후두신경의 절단도 같이 시행하였다. 실험동물을 ketamine hydrochloride(ketalar. 10mg/kg)의 복강내 주사로 마취 후 앙와위로 고정하고 1% povidone iodine으로 소독한 다음 전경부 정중앙에서 설골부터 시작하여 윤상연골의 하연에서 2cm 정도까지 수직절개를 하였다. 기관을 노출시킨 후 피대근을 좌우로 당겨 기관과 식도사이를 주행하고 하인두 수축근의 하연부에서 후두로 들어가는 반회후두신경을 확인하였다. 수술용 현미경(OMPI 99, Carl Zeiss, Hanmburg, Gemany)하에서 윤상연골 하연으로부터 0.5cm 아랫부분에 위치하는 반회후두신경을 확인하고 *microcsissors*로 한번에 절단한 후 긴장이 없도록 주의하며 10-0 나일론으로 일차신경봉합을 하였다. 모든 동물은 신경문합후 좌측반회후두신경의 부정중위 고정을 보였다. 술 후 무작위로 16마리씩 두 군으로 분류하여 실험군에는 PEMF를 노출시켰고, 대조군에는 PEMF만 제외하고 모두 같은방법으로 조작하였다.[3] 나머지 4마리의 흰 쥐는 신경절단을 제외한 모든 술식으로 sham operation을 시행하였으며 역시 무작위로 두군에 두마리씩 포함시켰다.

3. Pulsed electromagnetic stimulation(PEMS)

간헐적인 전자기장 자극은 30cm의 직경으로 15cm 간

격으로 놓인 Helmholz coil로 구성된 4개의 원통을 이용하여 실시하였다. 전자기장은 function generator(LG function generator FG-8002, LG precision Co., Seoul, Korea) 에서 120Hz의 sine wave를 만들어 낸 후 power ampifier(Inkel AM-1310, Hatai electronics Co., Seoul, Korea)를 통해 400Mg, 0.4Mt의 pulsed electromagnetic field를 만들어 내며, 이런 증폭된 파동은 distributor를 통해 4개의 원통으로 일정하게 분산된다. 원통은 소음이 적고 환기가 잘 되는 곳에 위치시켰다. 술 후 2일째부터 실험군에서는 12주간 하루 3시간, 주 5일씩 Helmholz coil이 내장된 원통에 넣어 PEMF를 시행하였으며, 대조군에서는 이를 제외한 모든조건을 동일하게 유지하였다. 대조군은 이를위해 전원을 연결하지 않은 상태에서 원통에 넣었으며 또한 매주 각 군이 전자기장에 노출되는 시간을 반대로 하였다.

4. 비디오후두내시경 관찰

기능회복의 여부를 알기 위해 매주 1회 비디오후두내시경을 실시하였다. 흰쥐를 ketamine chloride(ketalar, 10mg/100g) 복강내 주사로 마취한 다음 2.7mm 경성내시경(Karl Storz, Model 27018A, Germany)을 이용하여 후두내시경검사를 시행하였다. 검사결과는 카메라(CCD camera, Kay Electronics, Model 9111, USA)와 컴퓨터(Computer, Multimedia system, Kay Elemetrics, Model 9140, USA)에 연결된 후두스트로보스코피(Rhino-laryngeal stroboscope, Kay Elemetrics, Model 9100, USA)를 사용하여 기록하고, 모든 기록은 S-VHS Model 9132를 사용하여 녹화 및 재생하였다. 비디오후두내시경검사 결과는 성대고정, 호흡시 성대의 떨림, 호흡시 성대가 외전되는지의 3가지 형태로 구분하여 성대고정과 떨림은 회복이 되지 않은 것으로, 호흡하는 동안 외전이 정상적으로 일어나는 경우는 회복이 된 것으로 분류하였다. 후두기능회복의 판정은 실험에 참여하지 않은 2명의 이비인후과 의사가 참여하여 결정하였다.

5. 자발 후두 근전도 측정

실험과정이 끝난 12주 후 흰쥐를 희생시키기 전에 근전도를 통해 병변쪽인 좌측의 후윤상피열근과 정상쪽인 우측의 후윤상피열근의 호흡시 활동전위가 일치하는지를 관찰하여 전기생리학적 기능회복의 정도를 다시 한번 확인하였다.

6. 검체의 채취

12주 후 실험군에서 살아남은 14마리와 대조군에서 살아남은 8마리의 쥐를 이용하였다. 실험과정에서와 같이 마취하고 계속하여 고정액(4% paraformaldehyde in 0.01M sodium phosphate-buffered saline(PBS), PH 7.4)으로 관류고정 후 좌측 반회후두신경을 신경 문합부위를 포함하여 군위부 4mm와 nodose ganglion을 적출하였다. 얻어진 신경조직의 반은 즉시 10 neutral buffered formalin에 고정후, ethanol로 탈수시키고 paraffin wax에 포매시켰다. 검체의 반은 Western blot analysis를 위하여 즉시 liquid nitrogen에 냉동시킨 후 -80℃에 보관하였다.

7. 면역조직화학 염색

면역조직화학 염색으로는 통상의 방법을 사용하였는데 파라핀 포매조직으로부터 얻은 5-μm절편을 대상으로 탈파라핀화와 함수(hydration)를 시행 후 비특이 단백질을 10% 산양 혈청으로 봉쇄하였다. 그리고 3% 과산화수소수를 처리한 다음 일차항체를 도포하고 실온에서 2시간 처리하였다. 일차항체를 사용하여 1 : 200의 비율로 희석하였다. 2시간동안 배양후 phosphate-buffered saline으로 3번 수세하고 Dako LSAB(labeled streptavidin biotin) Stain kit(Carpenteria, USA)의 streptavidin-biotin과 함께 배양하였다. PLC-γ1 펩타이드의 음성대조의 경우에는, 일차항체가 대신하였다. 모든 절편은 올림푸스 BH2 광학현미경으로 관찰하였다.

Western Blot Analysis

면역반응성을 확인하기 위하여 western blot analysis를 시행하였다.

조직을 분리 후 buffer A(20mM Tris-HCl, 1mM EDTA, lmM DTT<10g/ml leupeptin, 10g/ml Aprotinin and lmM phenylmethylsulfonyl fluoride)를 이용하여 균질화 한 후 이를 500Xg에서 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 다시 10,000Xg에서 30분간 원심분리 후 균질화된 완충액에 대하여 투석하여 그 상층액은 immunoblot에 사용하였다. 3M의 KCL로 추출후 SDS PAGE에 전기영동으로 분리하여 nitrose monoclonal antibody와 반응 후 anti-mouse IgG에 결합시킨 horseradish peroxidase와 ECL substrate system(Amersham, Arli-

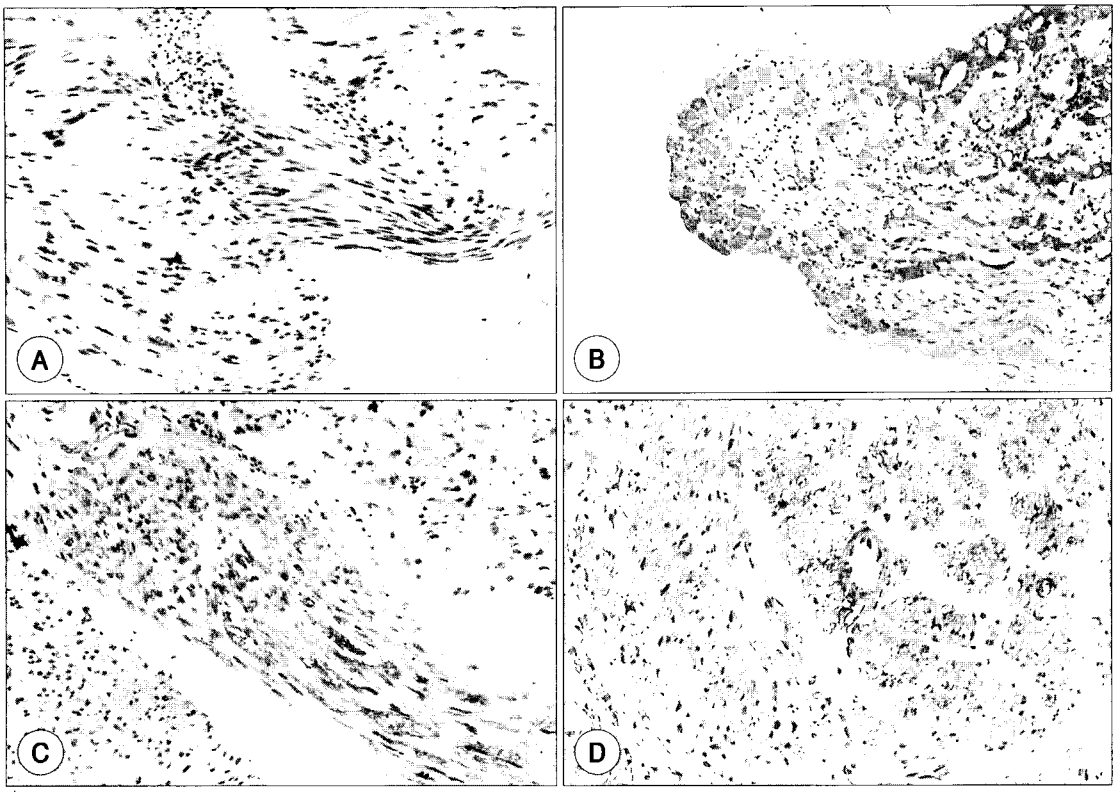

Fig. 1. The expression of PLC-γ1 is not shown in markedly damaged non-functioning nerve fiber (A) and ganglion (B) without PEMF (control group), compared that PLC-γ1 is diffusely expressed in nerve (C) and ganglion (D) cells of relatively well preserved tissue with PEMF (experimental group).

ngton Height, USA)로 확인하였다. 면역 조직화학 염색 결과와 Western blot analysis는 모두 각 실험군을 모르는 상태로 편견없이 진행되었다.

결 과

1. 후두기능회복

12주 동안 PEMF군에서는 14마리가 대조군에서는 8마리가 살아남았다. 이 중 실험군에서 살아남은 14마리중 10마리(71%), 대조군에서 살아남은 8마리중 3마리(38%)에서 후두의 기능이 회복되어 실험군에서 높은 회복율이 관찰되었으나 두 군사이에 통계학적 유의성은 보이지 않았다

2. PLC-γ1발현

PLC-γ1은 신경절 세포를 포함한 신경세포의 세포질에서 발현되었고 손상이 뚜렷하고 기능을 하지않는 신경조직에서는 PLC-γ1의 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 1A, B). PLC-γ1이 기능을 회복한 군의 반회후두신경에 일정하게 발현되었으나 면역조직화학검사에 의하면 PEMF에 노출된 쥐에서 그 발현의 정도가 대조군에 비하여 더욱 뚜렷하였다(Fig. 1C, D) 이러한 over-expression은 neuron에서 더 잘 나타났고 특히 schwann cells 보다 nodose ganglion cells에서 뚜렷하였다(Fig. 2A, B). 이러한 결과는 immunoblotting method로 확인하였다(Fig. 3, Table 1).

고 찰

반회신경 손상으로 인한 편측 혹은 양측 성대마비의 치료에 있어 이상적이라 할 수 있는 방법은 운동특이적인 신경의 적절한 재분포이나 이는 아직 달성하기 어려운 상황이다. 현재 심각한 기도폐쇄를 동반한 양측성대마비의 치료로는 기관절제술등을 이용한 폐쇄부위의 우회술이나 성대 혹은 피열연골에 대한 파괴적 술식등을

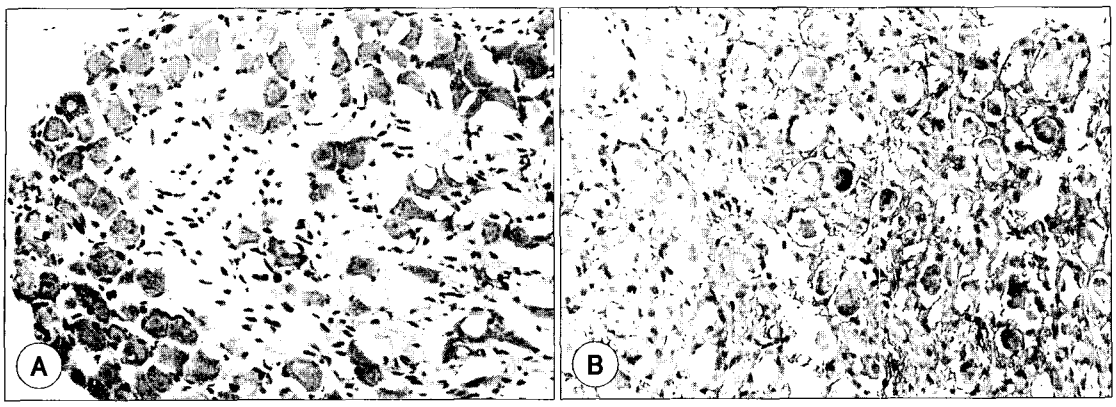

Fig. 2. A & B : Higher magnification of PLC-γ 1 expression in ganglion cells of nodose ganglion in control (A) and experimental group (B).

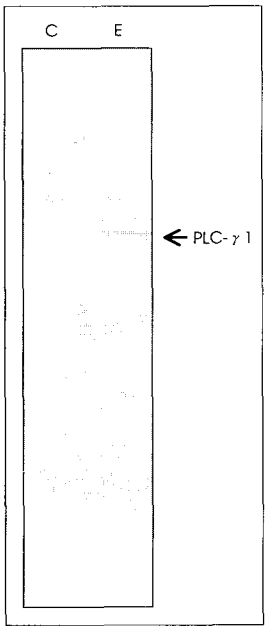

Fig. 3. Nerve tissue with PEMF (experimental group) showed stronger band for PLC-γ 1 than nerve tissue without PEMF (control group).

Table 1. Summary of PLC-γ 1 expression. Although PLC-γ 1 is constantly expressed in RLN of functional recovery group, the PLC-γ 1 expression was remarkably increased in the PEMF exposured rats by immunohistochemisty and immunoblotting ($p<0.05$)

Group	Status of recovery (total No.)	PLC-γ 1 overexpression	
		−	+
PEMF-exposured Group	FR(10)	2	8
	NFR(4)	3	1
Control group	FR(3)	3	0
	NFR(5)	5	0

*FR : functional recovery group
**NFR : non functional recovery group

들 수 있으며, 일측성대마비의 경우 성대내전술로 갑상성형술, 피열연골 내전술, 주입법등이 흔하게 쓰이고 있다. 이러한 기존의 치료방법은 아직 후두자체의 생리적 기능을 무시하는 비가역적인 수술방법에 의하고 있는 실정이다. 후두마비의 이상적인 치료는 성대의 역동적인 측면과 정상 생리를 만족시켜야 할것이며 이러한 방법으로 반회후두신경의 재분포를 들 수 있겠다. 그동안 여러가지 방법으로 손상된 반회후두신경을 재문합하여 마비된 성대의 신경재지배를 시도하였으나 대부분이 후두근육간의 공동운동(synkinesis)이라는 문제점을 초래하였다.[4] 또한 공동운동의 문제점 때문에 신경재지배를 위해 횡격막 신경이나, 설하신경, 미주신경 등을 이용하여 반회후두신경과 연결하여 일부 기능의 회복을 보았으나 이는 다른부분의 기능을 희생시켜야 하는 문제점을 가지고 있다.[3]

1974년 PEMF가 발표된 이래로 많은 연구가 이루어지고 있으며 여러 보고에 따르면 동물실험에서 PEMF는 흰쥐의 절단된 좌골신경, 총비골신경, 안면신경의 신경재생을 촉진시켜 신경재생을 조기에 유도하고 기능적으로도 보다 만족할 만한 회복을 일으키는것으로 알려져 있다.[6] 또한 저자는 이전의 연구에서 손상된 반회후두신경의 재생에 있어 PEMF가 기능회복을 촉진시킴을

보고한 바 있다.

많은 연구에 의하면 PEMF는 골, 신경, 연조직에서 collagen과 proteoglycan, DNA의 합성을 촉진시키고 골격계의 항상성에 관여하는 효소와 호르몬에 영향을 준다고 알려져 있으나[10] 이러한 PEMF가 신경재생을 촉진시키는 발생기전은 아직 밝혀져있지 않다. 세포내에서 일어나는 여러가지 생리적 현상은 세포의 외부환경으로부터 전달되어오는 다양한 신호를 세포들 사이에서 전달하는데 이는 세포표면의 수용체와 연결물질(ligand)에 의하여 이루어진다. 이렇게 외부의 정보가 세포내로 전달되는 과정을 신호전달(signal transduction)이라고 한다. 이러한 신호전달체계는 외부로부터의 정보를 세포막을 통해 이차전달물질을 사용하는 여러기전에 의해 세포내부로 전달하는데 이러한 신호전달체계가운데 cyclic AMP를 이용하는 신호전달경로는 이미 잘 알려져 있다. 그 후 inositol을 이차전달물질로 활용하는 새로운 신호전달경로가 발견되었으며, 이들 중요한 이차전달물질을 생성하는 효소가 Phospholipase C(PLC)임이 알려지고 특히 최근의 연구에서 PLC-γ1은 tyrosine kinase의 기질로 잘 알려져 있어 세포가 성장인자의 자극을 받은 후 PLC-γ1이 활성화 되어 신호가 전달됨으로 세포의 성장과 분화에 가장 밀접하게 관여한다고 알려져 있다

즉, PLC-γ1은 phosphatidyl inositol 4,5-biphosphate(PIP2)을 가수분해시켜 inositol 4,5-triphosphate(PIP3)와 diacylglycerol등의 이차전달물질을 생성한다. 이 때 DAG는 protein kinase C(PKC)를 활성화 하는데 활성화된 PKC는 세포내의 대사작용, 세포의 증식 및 분화, 세포의 성장조절, 세포막의 conductance와 transport, 다른 수용체의 강화 또는 억제,[7] 유전자의 발현 및 종양화 변환에 중요한 역할을 하며 세포질의 PH를 증가시켜 정지세포(resting cell)을 유사분열환(mitotic cycle)으로 유도한다.[8] 또한 DAG/PKC경로는 세포의 흥분성을 증가시켜 다른 신호물질에 대한 세포의 반응성을 변화시킨다.[9] PIP3는 세포를 직접 활성화시키는 이차전달물질로서 세포내의 형질세망(endoplasmic reticulum)이라는 칼슘의 저장소의 특정한 수용체에 결합함으로 저장된 칼슘을 유리시켜 세포질내로 방출시킴으로써 세포질내 Ca^{2+}를 증가시켜 성장인자에 대한 반응으로써 유전자전사에 관여하여 생리적 현상을 조절한다. 이러한 Ca^{2+}과 DAG를 통한 신호전달은 일시적이지만 다음의 연속되는 신호전달에 필수적이고 sysnergic effect를 보이며 생체나 세포에서 광범위한 생리적 현상을 조절할 수 있다. 따라서 신경재생에 있어서도 이러한 신호전달체계와 PLC가 중추적 역할을 담당할 것으로 사료되며 미루어 신경재생을 촉진시키는 PEMF도 이러한 신호전달체계에 영향을 줄 것이라고 생각할 수 있다.

저자들의 이번연구에서 기능회복이 된 군에서 PLC-γ1이 발현되었으며 특히 PEMF에 노출시킨 군에서 그 발현이 뚜렷하였다. 이는 손상된 신경에있어 PLC-γ1을 매개로 하여 활발한 신호전달이 되므로 그 재생의 과정이 이루어 지며 또한 PEMF는 이러한 PLC-γ1에 의하여 신호전달을 촉진시킴을 추론할 수 있다.

최근의 눈부시게 발전하고있는 분자생물학의 도움으로 세포의 내부에서의 변화가 점차 밝혀지고 있으며, 손상된 신경에 있어 그 재생에 관여하는 분자생물학적인 기전과 더 나아가 PEMF와의 관련성도 점차 관심의 대상이 되고 있다.

본 연구로 관련된 신호전달과정을 정확하게 규명할 수는 없었다. 그러나 이러한 연구를 기초로 하여 앞으로 세포막과 세포질에서 형성된 이차전달물질인 PLC이후의 과정과 핵내에서 어떠한 변화가 유발되는지를 알아보는 것이 필요하리라 생각되며 아울러 이에 관여하는 각종 성장인자와 다른 PLC동위효소와의 관련성에 대한 연구도 필요하리라고 사료된다. 또한 신경의 재생과 기능회복의 각 시기에 따른 PLC-γ1의 발현양상을 비교함으로 손상된 신경의 기능을 되찾는데 관여하는 PLC-γ1의 역할을 좀 더 구체적으로 알 수 있을것이다.

결 론

손상이 뚜렷하고 기능이 회복되지 않은 신경조직에서는 PLC-γ1의 발현이 관찰되지 않았으나 기능이 회복된 쥐에서는 신경의 근위부와 Nodose 신경절에서 PLC-γ1이 발현되었으며 PEMF에 노출된 군에서 그 발현의 정도가 더욱 뚜렷하였다. 즉 손상된 신경의 재생과 기능회복에 작용하는 신호전달체계에는 PLC-γ1이 관여하며 PEMF를 통한 신경재생의 촉진도 이러한 신호전달체계에 영향을 줌으로 이루어 질것이라 사료된다.

중심 단어 : 반회후두신경 · 기능회복 · Pulsed electromagnetic stimulation · PLC-γ1.

References

1) Choi JH : *Signal tranasduction inkeratinocyte. Korean Journal of investigative Dermatology. 1996 : 3 : 99-110*

2) Punnon K, Deinng M, Lee E, Rhee SG, Yuspa SH : *Keratinocyte differentiation is associated with changes in the expression and regulation of phospholipase C isoenzyme. J Invest Dermatol. 1993 : 101 : 719-726*

3) Janet LW : *Enhancement fo functional recovery follwing a fresh lesion to the rat sciatic nerve by exposure to pulsed electomagnetic fields : Experimental neurology. 1994 : 125 : 302-305*

4) Flint PW, Downs DH, Coltreata MD : *Laryngeal synkinesis follwing reinnervation in the rat-neuroanatomic and phusiologic study using retrograde and fluorescent tracers and electomyography. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1991 : 100 : 797-806*

5) Rice DH : *Laryngeal reiinervation. Laryngoscope. 1982 : 92 : 1049-1059*

6) Raji AR, Bowden RE : *Effects of high peak pulsed electomagnetic field on the degeneration and regeneration of the common peroneal nerve in rats. J Bone Joint Surg Br. 1983 : 65 : 478-492*

7) Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, Pawson T : *SH-2 and SH-3 domains : Element that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. Science. 1991 : 252 : 668-674*

8) Martin TFJ : *Receptor regulation of phosphoinositidase C : Pharmacol Ther. 1991 : 49 : 329-345*

9) Fisher GH, Talwar HS, Baldassare JJ, Henderson PA, Voorhees JJ : *Increased phospholopase C catalyze hydrolysis of phosphatidylinositol-4,5-bisphophate and 1,2-diacylglycerol content in psoriatic involved compared to uninvolved and normal epidermis. J Invest Dermatol. 1990 : 95 : 428-435*

10) Tompson GC, Ross CD, Thomson AM, Byers JM : *Changes in brainstem calcitonin gene related peptides and 8th crainal nerve lesion guinea pig. Brain Res. 1995 : 120 : 153-159*