Korean Journal of Life Science
Vol. 12. No. 3. 306~316, 2002

혈관내에 배양한 신경줄기세포의 이식이 말초신경 재생에 미치는 영향

김우일 · 박중규 · 배기원 · 양영철*

인제대학교 의과대학 해부학교실

Effect of Transplantation of Intravascular Cultured Neural Stem Cell upon Peripheral Nerve Regeneration

Woo-IL Kim, Joong-Kyu Park, Kee-Won Bae and Young-Churl Yang*

Department of Anatomy, College of Medicine, Inje University, Pusan 614-735, Korea

Abstract

The ultrastructural change of sciatic nerve and immunohistochemical changes of NGF, PCNA were studied at the transplanted segment of intravascular cultured neural stem cell in the rat sciatic nerve by 5 months after the sciatic nerve transection. The transplanted intravascular neural stem cells were differentiated into Schwann cells at the 20th day and these cells began to regenerate by the proliferation and hypertrophy. There were many remyelinating Schwann cells in the transplanted nerve in term of stimulation. According to NGF finding, we suggest preexisting Schwann cells may induce the differentiation of neural stem cells into regenerating Schwann cells. Electron microscopic changes were the remyelinating appearance, the increase of intraaxonal microtubules and enlarged mitochondria and contacting cell processes each other.

Key words – Intravascular cultured neural stem cell, NGF, PCNA, electron microscopic changes

서 론

신경이 절단되었을 때 절단된 부위의 간격이 너무 멀리 떨어져 있거나 오랜 시간이 지나면 신경섬유에는 여러 가지의 퇴행성 변화와 함께 재생을 위한 조직반응이 나타난다고 한다[2]. 신경이 절단되어 축삭이 손상되면 신경세포체에서 새로 합성된 단백질이 말초신경으로 가지 못하고 역행하는 현상이 급격히 증가함으로써 신경세포체의 핵융해가 일어난다[1]. 신경의 절단으로 축삭수송이 차단되고 신경내 미세원섬유와 축삭의 tubulin량이 감소되어 신경세포체에 비가역적인 손상을 주기 때문에 신경은 거의 회복할 수가 없다고 하였다[4].

절단된 말초신경은 재생과정을 겪는 동안에는 축삭수송을 통해 신경세포체에 손상에 대한 정보와 재생의 과정을 알려주고, 신경세포체는 다시 말초신경에 적절한 대상성 반응이 나타나도록 유도한다고 알려져 있다[8]. 또한, 말초신경의 재생에는 신경세포체에서 분비하는 여러 가지 neurotrophic factor들이 관여하며, 말초신경이 재생되는 동안 신경절의 감각신경원에 작용하는 neurotrophin-3(NT-3), 신경교세포에 작용하는 glial growth factor(GGF), 중추신경계에 작용하는 brain derived neurotrophic factor(BDNF), 말초신

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 051-890-6634, Fax : 051-896-6634
E-mail : anatpung@ijnc.inje.ac.kr

경계의 성장에 관여하는 nerve growth factor(NGF) 등이 그것이다[16].

그러므로, 말초신경의 재생과정에 신경세포체의 영향을 관찰하기 위해서는 NGF의 관찰이 필수적으로 규명되어야 하며, 신경줄기세포가 Schwann cell로 분화하여 증식할 수 있을 것인지와 신경세포체의 영향을 받아 회복 불가능한 기존의 말초신경 Schwann cell의 증식을 유도할 수 있을지를 알기 위해서는 세포의 증식시 나타나는 proliferating cell nuclear antigen(PCNA)의 변화를 알아야 한다.

말초신경 재생과 신경줄기세포 이식에 관한 최근 연구로 다발성 경화증(multiple sclerosis)과 같은 질병에서 임상적으로 말초신경의 회복이 불가능한 경우에도 신경줄기세포를 이용하여 말초신경의 수초를 원상태로 복구시킬 수 있다고 보고하였다[22].

최근의 보고에서 상당한 수준까지 진전된 다발성 경화증 병변에서도 수초를 복구시키는 기능을 나타내는 세포군이 존재한다는 사실이 확인되었다. 수초를 생성시킬 수 있는 기능을 가지는 세포군에는 현재까지 희소돌기교세포(oligodendrocytes)가 있으며 성숙한 신경계에서도 희소돌기교세포로 발달하여 수초를 생성할 수 있는 세포군이 다량으로 존재한다는 사실이 이미 규명되었다[9]. 이러한 희소돌기교세포는 마치 신경줄기세포(stem cells) 처럼 작용하는데 수초에 발생한 손상에 대한 반응으로 분열을 하면서 새로운 희소돌기교세포와 함께 새로운 전구세포(precursor cells)를 형성하는 기능이 있다고 하였다[11].

최근에는 쥐 배아(胚芽)의 줄기세포를 신경전구세포로 만들어 이를 쥐의 오래된 척수손상 부위에 이식한 결과 몇 주만에 이식세포중 일부가 여러 형태의 신경세포로 성숙하면서 신경축삭을 형성하였다고 한다[6]. 또, 다른 연구로는 척수 손상으로 끊어진 양쪽 신경 사이에 신경줄기세포를 이식한 9일만에 쥐들은 다리를 움직이고 부분적으로나마 체중을 지탱할 수 있는 능력을 되찾게 되었다고 하였다[10]. 또한, 신경줄기세포를 시험관 안에서 증식시킨 후 도파민 작동성 신경세포체로 분화, 유도하는 방법[15]도 발견되고 있어서 신경줄기세포의 이식의 유효성에 관하여 활발한 연구가 진행되고 있다.

그러나, 신경줄기세포의 이식에 의한 치료법을 확립하는데 가장 중요한 과제의 하나는 어떻게 신선한 신경줄기세포를 신속하게 채취하여 적절한 환경에서 배양한 후 이식하는가 하는 일이다. 이미 연구자들의 노력으로 신경줄기세포 및 신경전구세포를 조절하는 방법을 개발하는 데 성공하였으며 이렇게 얻은 신경줄기세포의 이식을 검토하기 시작하였다[14]. 또한, 신경줄기세포 이식에 의한 신경 조직의 복구는 다른 장기의 재생보다 복잡한 문제를 안고 있다. 신경세포 그 자체의 생성뿐만 아니라 신경세포가 정상으로 기능을 발휘하기 위하여 있어야할 위치로 이동하여야 하며, 시냅스의 형성이나 축삭이나 수상돌기의 회복과 같은 일련의 현상이 질서 있게 일어나야 한다. 따라서, 본 연구에서는 오랫동안 절단된 말초신경을 동맥내에서 배양한 신경줄기세포로 이식하여 말초신경에서 신경줄기세포가 Schwann cell로 분화한 후 수초의 재생을 일으킬 수 있는지를 형태학적으로 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 Sprague Dawley계 흰쥐(몸무게 200 g 이상, 생후 12주, 효창사이언스) 70마리를 암수 구별 없이 사용하였다. 구입 후 14일 동안 실험실 환경(온도 22~25℃, 습도 60~80%)에서 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험동물사료(삼양유지제품)와 물은 자유로이 먹게 하였고 자연채광하에서 흰쥐용 케이지에 5마리씩 넣어서 사육하였다.

실험방법

실험동물은 Sham operation만 실시한 대조군과 우측 좌골신경 절단 후 5개월이 지난 실험군으로 구분하였다. 각 실험군은 동맥내 배양한 신경줄기세포(neural stem cell)를 이식한 후 10일군, 20일군, 30일군, 40일, 50일군으로 구분하여 각 군 당 10마리씩을 배정하였다.

실험군은 ㎏당 50 ㎎의 ketamine(유한양행)을 복강내로 주사하여 마취시키고 둔부의 중심부를 2 ㎝ 가량 절개하여 좌골신경을 확인한 후 중심부에서 1 ㎝ 자르고 피부를 봉합하고 gentamycin 0.1 ㎖(대성미생물연구소, 50 ㎎/㎖)을 근육주사 하였다. 수술 5개월 후 다시 수술부위를 열어 배양한 신경줄기세포가 들어 있는 동맥을 미세수술봉합사(9/0 Safil B.Braun Surgical AG)를 이용하여 양쪽 신경단을 미세감자로 잡고 수술용 현미경 하에서 봉합한 후 시간 경과에 따라

서 절단된 신경이 재생되는 과정을 면역조직화학적 및 미세구조적으로 조사하였다.

배자의 척수 채취와 신경줄기세포의 분리

임신 10일경의 흰쥐를 ketamine 44 mg/kg, acepromazine 4.0 mg/kg, rompun 0.75 mg/kg을 혼합한 마취액을 복강내 주사하여 마취시켰다. 제왕절개술을 실시하여 자궁각을 잘라내어 얼음 팩 위에 두고 태아를 한 마리씩 꺼내어 Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS) 용액에 담구었다. 10마리의 배아로부터 척수를 꺼내어 D-PBS 용액에 넣고 핀셋을 사용하여 결합조직을 제거하였다. 신경줄기세포의 1차 배양을 위하여 잘게 썰은 척수조직은 D-PBS가 들어있는 15 ml 원심분리관을 이용하여 3분 동안 1,000 g로 원심분리하였다. Dulbecco's modified eagle medium(DMEM)과 Ham's F12 medium(F12 medium)을 1:1로 혼합한 용액 1 ml을 넣어 재부유시키고 파이펫으로 조작하여 조직을 더욱 작게 만들었다. 다시 1-2배의 DMEM과 F12 medium을 1:1로 혼합한 용액에 넣어서 한 개의 세포로 분리될 때까지 조작하였다. 세포가 분리되면 세포수를 $1\sim2\times10^4$개가 되도록 하여 poly-L-ornithine hydrobromide(PORN, Sigma, USA) coated 배양용기에 분주하고 3일마다 배지를 교환하면서 배양하였다. 신경줄기세포의 분화를 위하여 fibroblast growth factor-1(FGF-1)을 20 ng/ml이 되도록 배지를 갈아 줄 때마다 첨가하였으며 배양 9일째 신경줄기세포를 trypsin-EDTA를 이용하여 채취하였다.

동맥내 신경줄기세포의 배양을 위하여 천상복부동맥(superficial epigastric artery)을 2 ㎝ 채취하여 신경줄기세포 배양액내에 3일간 두었다. 절취한 동맥의 내피세포가 혈관내에서 빠져나와 배양용기 바닥에 부착하고 동맥의 탄력성이 제거되면서 동맥이 직경이 커지고 동맥벽이 매우 얇아지게 되었을 때 수술용 현미경 하에서 24 G 바늘을 이용하여 배양한 신경줄기세포를 주입한 다음 신경줄기세포와 같은 배지내에서 1일간 배양한 후 이식하였다.

광학현미경용 표본의 제작

광학현미경용 조직은 neutral buffered formalin(pH 7.4)으로 고정하고 탈수와 청명과정을 거친 후 파라핀으로 포매하여 6 μm의 조직절편을 얻어 탈파라핀하여 함수시켰다. 일반적인 조직학적인 소견은 hematoxylin & eosin 염색을 시행하였다.

광학현미경 하에서 신경수초의 자세한 관찰을 위하여 toluidine blue 염색을 시행하였다. 이식편의 전고정은 4℃의 2% glutaraldehyde-phosphate buffer 용액에서 1시간 동안 처리하였고, 후고정은 1% osmium tetroxide-phosphate buffer로 1시간 동안 고정하였으며 고정 후 0.1 M phosphate buffer로 각각 10분씩 3회 수세하였다. 탈수는 30%~100% ethyl alcohol로 실온에서 실시하였고, 청명과 수지침투는 propylene oxide와 polyresin (polyscience제품)을 이용하여 포매하고 60℃에서 3일간 중합시켰다. 중합시킨 조직은 초박절편기(LKB, NOVA)로 준초박절편(0.5 ㎛)을 얻어 1% toluidine blue로 가온 염색 후 400배에서 광학현미경으로 관찰하였다.

수초를 관찰하기 위하여 phosphotungstic acid hematoxylin(PTAH)법을 시행하였다. 조직을 탈파라핀 후 함수시켰다. 절편은 실온에서 하룻밤 혹은 60℃에서 1시간 동안 Zenker용액(2.5% potassium dichromate 95 ㎖, glacial acetic acid 5 ㎖)내에서 매염시켰다. 매염 후 15분간 흐르는 물로 수세하고 Lugol's Iodine 용액(Iodine 1 g, potassium iodide 2 g, 증류수 100 ㎖)내에 15분간 담구어 두었다가 95% 에탄올에 담구어 완전히 탈색될 때까지 1시간 이상 두었다. 증류수로 3초간 3회 수세한 다음 0.25% potassium permanganate 용액내에서 5분간 산화시키고 증류수로 3초간 3회 수세하였다. 수세 후 8.5% oxalic acid 용액내에서 5분간 담구어 탈색시켰다. 5-10분간 증류수로 잘 수세하고 흐르는 물로 세척하였다. 잘 숙성된 PTAH 용액(hematoxylin 1 g, phosphotungstic acid 20 g, 증류수 1,000 ㎖를 혼합하여 녹인 후 potassium permanganate 0.177-0.2 g를 첨가한 다음 6개월간 숙성)내에서 실온에서는 24시간 혹은 60℃ 하에서는 2시간 동안 두었다. 95% 에탄올로 자색이 없어질 때까지 5분간 살짝 담구었다 빼면서 분별염색을 한 후 100%에탄올로 2회 빠르게 탈수시키고 청명과정을 거쳐 봉입하였다.

면역조직화학적 염색

Nerve growth factor(NGF)와 proliferating cell nuclear antigen (PCNA)에 대한 면역조직화학적인 염색은 DAKO LSAB Kit를 이용하였다. 파라핀 포매 조직에서 6 μm의 절편을 얻은 후 탈파라핀 하고 3% hydrogen peroxide에 5분간 반응시킨 뒤 증류수로 수세하고 신선한 Tris 완충액에 5

분간 둔 다음 생리식염 인산염 완충액(PBS)으로 5분 동안 반응시키고 NGF(Santa Cruz Co., USA)와 PCNA(DAKO, Denmark)를 각각 1:100으로 희석하여 1시간 반응시킨 후 Tris 완충액 bath에 5분간 두었다. 반응시킨 절편은 생리식염 인산염 완충액으로 만든 biotinylated anti-rabbit와 anti-mouse immunoglobulin으로 10분간 반응시킨 후 Tris 완충액으로 수세하고 0.05 M Tris 완충액(pH 7.6)으로 제조한 streptoavidin peroxidase내에서 10분간 둔 다음 다시 Tris 완충액으로 수세 후 Tris bath에 5분간 두었다. 발색반응은 2 ml의 기질 완충액을 눈금 있는 시험관에 넣고 각 완충액 2 ㎖마다 AEC chromogen액을 1방울씩 첨가하고 즉시 혼합한 다음 완충액 2 ㎖ 마다 substrate-hydrogen peroxide 용액 1방울씩 첨가하고 즉시 혼합하여 제조한 substrate-chromogen 용액으로 10분간 반응시켰다.

전자현미경용 표본의 제작

조직은 이식된 신경줄기세포를 확인하기 위하여 이식 전 분리한 줄기세포와 동맥내에서 1일간 배양한 신경줄기세포를 채취하였고, 이식 후 10일, 20일, 30일, 40일, 50일군으로 구분하여 이식한 조직부위를 채취하였다. 조직의 고정은 0.1 M phosphate buffer(pH 6.8)로 제조한 2.5% glutaraldehyde 고정액으로 1시간 동안, 1% osmium으로 1시간 동안 4℃에서 후고정하였다. 조직의 탈수는 에탄올을 이용하고 수지 침투는 propylene oxide와 polyresin을 이용한 통상적인 방법으로 처리하였다. 침투 후 조직은 beem capsule에 포매하고 dry oven에서 35-37℃에서 8~18시간, 45~50℃에서 하룻밤, 55~60℃에서 1일, 실온에서 하룻밤 동안 두는 방법으로 중합시켜 블럭을 만들었다. 전자현미경 관찰을 위하여 금색이나 회색을 띠는 초박절편을 200 mesh의 구리 그리드에 얹어 uranyl acetate-lead citrate 이중 전자염색을 시행하였다. 전자염색한 그리드는 100 kV, 61 μA 상태의 투과 전자현미경(JEOL 1200EX II, Japan)으로 5,000배에서 주로 관찰하였다.

결 과

신경줄기세포의 배양소견과 신경재생의 육안소견

신경줄기세포는 임신 10일째 태자의 척수로부터 채취하였다. 태자의 척수로부터 분리한 신경줄기세포는 원형으로 주위의 세포들보다 크기가 작았다. 신경줄기세포는 미리 준비한 feeder cell인 섬유모세포 위에서 3일 후 세포질돌기를 길게 내면서 자라기 시작하였으며 배양 9일째에는 많은 세포질돌기들을 내어 그물처럼 형성하면서 분열하고 있는 양상을 보였다(Fig. 1-A).

이식 10일 후 이식부위는 아직도 신경외막이 재생되지 못하고 잘룩한 상태로 있었으며 중심부 신경의 일부만이 신경섬유로 연결되어 있었다. 이식 40일 후에는 이식된 동맥 부분이 신경외막조직으로 대체되었으며 근육부위에 유착된 상태로 존재하였으며(Fig. 1-B), 이식 50일 후에는 신경섬유의 재생도 중심부 근처에 현저하게 일어났다(Fig. 1-C).

광학현미경적 소견

1) Hematoxylin & eosin(H & E) 염색소견

대조군에서 신경섬유는 원형으로 중심부에 축삭이 관찰되며 수초에 의해 둘러싸여 있었다. 신경섬유의 가장자리에는 분화한 Schwann cell의 핵이 관찰되었다. 신경섬유들 사이에는 섬유모세포의 핵들이 관찰되었다(Fig. 2-A).

이식 10일군에서는 소수의 신경섬유들 주위에 핵이 크고 세포질이 많은 분화한 Schwann cell들의 증식을 볼 수 있었으며, 이식 20일군에서는 작은 혈관들과 함께 림프구들이 많이 나타났고, 분화한 Schwann cell들이 관찰되었으며, 큰 신경섬유들이 나타나기 시작하고 Schwann cell의 핵은 다소 작아졌으며 동심원상으로 형성된 섬유들과 함께 두꺼운 수초에 의해 둘러싸여 있었다(Fig. 2-B).

이식 30일군에서는 특징적으로 Schwann cell들의 수가 증가하였으며 핵의 크기도 증가하였고(Fig. 2-C), 이식 40일군에서는 분화한 Schwann cell들의 핵의 크기가 감소하였으며 소수의 신경섬유들에서 축삭이 형성되지는 않았지만 수초에 의해 둘러 싸여 있는 것이 관찰되었다(Fig. 2-D).

이식 50일군에서는 많은 신경섬유들이 관찰되었으며 얇은 수초에 둘러싸인 신경섬유의 가장자리에 분화한 Schwann cell의 핵들이 관찰되었다. 신경섬유의 중심부에는 축삭을 형성하고 있는 것도 관찰되었으며 대부분 neurokeratin network를 형성하고 있었다(Fig. 2-E).

2) Phosphotungstic acid hematoxylin(PTAH) 염색소견

수초의 변화를 관찰하기 위한 PTAH 염색소견에서 대조군은 파란색으로 짙게 염색된 굵은 섬유들이 같은 방향으로 규칙적으로 다발로 배열되어 있었다. 수초다발들 사이에는

결합조직이 끼어있는 것을 관찰할 수 있었으며 긴 타원형의 더욱 짙게 염색된 Schwann cell의 핵도 관찰되었다(Fig. 3-A).

이식 10일군에서는 가늘고 불규칙하게 달리는 수초들 속에 Schwann cell의 핵들이 관찰되었고, 이식 20일군에서는 일부의 수초들이 다발을 형성하여 규칙적인 방향을 잡아가고 있었고 수초의 굵기나 핵의 크기는 증가하였으며 신경외막이 될 결합조직이 증가하였다(Fig. 3-B).

이식 30일군에서는 대부분의 수초들은 다발을 형성하여 규칙적인 배열을 나타내었으며, 이식 40일군에서는 가늘게 다발을 이룬 수초들은 물결치는 모양으로 규칙적인 배열을 이루고 가끔 분절된 것처럼 보였다. Schwann cell들의 핵은 짙게 염색된 수초 때문에 드물게 관찰되었다(Fig. 3-C).

이식 50일군에서는 약간 더 굵어진 수초다발들은 파랗게 염색되어 물결치는 모양을 이루고 있었으며 Schwann cell의 핵들은 다소 짧은 타원형으로 수초내에서 관찰되었다. 신경외막은 수초다발들 사이에 옅은 갈색으로 염색되어 많이 볼 수 있었다(Fig. 3-D).

3) Toluidine blue 염색소견

대조군에서 신경섬유는 관상의 종주하는 수초속에 축삭이 들어 있었다. 수초내에는 약간 옅게 염색되어 있으며 수초의 두께는 두꺼운 것은 파동상으로, 가는 것은 대체로 고르게 되어 있었으며 전체적으로 신경섬유의 밀도가 조밀하게 나타났다(Fig. 4-A).

이식 10일군에서는 전체적으로 신경섬유의 밀도는 적었으며 가끔 굵은 신경섬유들은 수초로 가득 채워진 상태로 관찰되었으며, 이식 20일군에서 신경섬유의 밀도는 다소 증가하였으며 굵은 신경섬유의 출현이 두드러지고 크기가 작은 신경섬유들이 많았고 대부분의 신경섬유수초들의 두께가 두꺼워져 있었다(Fig. 4-B).

이식 30일군에서 중등도 크기의 신경섬유들이 증가하였으며, 이식 40일군에서는 대부분의 신경섬유들의 두께는 약간 두꺼우며 길게 관상으로 보이는 신경섬유가 다발을 이루어 큰 파동상으로 규칙적으로 배열하고 있었다(Fig. 4-C). 이를 고배율로 확인하면 수초가 매우 두꺼워져서 물결치듯이 형성되어 Ranvier's node가 형성될 부분을 확인할 수 있었다(Fig. 4-D).

이식 50일군에서도 40일군과 비슷한 양상을 보였으나 수초의 두께가 얇으며 신경섬유의 중간에 잘룩하게 Ranvier's nodes를 형성하는 양상으로 회복하고 있는 것을 볼 수 있었다. 이를 고배율로 확인하면 수초의 두께는 다소 얇아졌으나 Ranvier's node를 형성할 부위는 두꺼워진 수초에 의해 아직도 막혀 있다는 것을 알 수 있었다(Fig. 4-E).

전자현미경적 소견

이식시 신경줄기세포는 긴 타원형의 핵을 가지며 세포들끼리 서로 부착하고 세포질내에는 미세한 과립을 가진 작은 분비과립들을 풍부하게 가지고 있었다(Fig. 5-A). 이식 1일 후 신경줄기세포는 세포질내 분비과립을 풍부하게 가지고 있으며 작은 사립체와 공포도 관찰되었다(Fig. 5-B).

신경섬유의 전자현미경적인 변화는 대조군에서 Shwcann cell의 세포질내에 층판으로 배열된 동심원상의 수초가 들어있고, 관상구조의 중심부는 axolemma에 둘러싸인 축삭이 들어 있으며 축삭내에는 소수의 작은 미세소관과 그물상의 가는 neurofilament들이 관찰되었다(Fig. 5-C).

이식 10일군은 분화한 Schwann cell의 세포질은 매우 풍부하였으며 탈수초화의 잔존물을 가진 소포들과 지질과립으로 보이는 소포들이 관찰되었다. 또한, 세포질내에는 미세원섬유들과 미세소관들 및 많은 유리 리보좀들이 관찰되었고 분비과립과 유사한 크고 작은 미세한 과립을 가진 소포들이 분포하고 있었다(Fig. 5-D).

이식 20일군에서 분화한 Schwann cell의 세포질내에 수초가 다시 형성되고 있는 재수초화 과정을 볼 수 있었다. 재수초화를 겪고 있는 Schwann cell은 주위에는 작은 분비과립들을 가진 소포가 들어 있는 다른 세포의 세포돌기들이 접촉해 있었다. 축삭내에는 크게 확장되어 공포와 같은 작은 사립체와 많은 신경미세소관이나 미세섬유들이 증가되어 있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5-E).

이식 30일군에서 더 많이 분화된 Schwann cell의 세포질이 풍부해지면서 재수초화가 더욱 진행되었다. 이러한 세포 주위에는 더욱 넓은 표면적으로 다른 세포의 세포질돌기들과 접촉하고 있었으며 거의 정상에 가까운 작은 신경섬유를 형성하고 있는 것도 관찰되었다. 축삭내에는 큰 사립체와 신경미세원섬유들이 풍부하게 들어 있었다(Fig. 5-F).

이식 40일군에서는 분화한 Schwann cell의 세포질내 중등도의 신경섬유들도 완전히 재수초화하였으며 축삭내에는 매우 큰 소수의 사립체와 직경이 큰 미세소관들을 관찰할

수 있었다. 다른 Schwann cell들의 돌기들이 서로 접촉하는 현상도 더욱 많아 졌으며 세포질내 사립체도 많아지는 경향을 나타내었다(Fig. 5-G).

이식 50일군에서는 많은 Schwann cell은 수초를 형성하고 있었으며, 축삭내 사립체 수가 현저하게 증가하였다. 신경섬유는 주위의 섬유모세포의 신경외막에 의해 둘러싸이면서 다발을 형성하고 있는 것이 관찰되었다.(Fig. 5-H, I).

면역조직화학적 소견

1) Neural growth factor(NGF)의 변화

대조군에서 NGF 반응은 신경섬유외막의 안쪽에 현저하게 강한 양성반응을 보였으며, 중심부로 갈수록 반응이 감소되어 신경섬유의 표면에만 반응을 나타내었다(Fig. 6-A). 이식 10일군에서는 신경섬유외막의 바깥쪽에 더욱 현저한 반응을 보였고 외막의 안쪽에는 선상으로 강한 양성반응을 나타내었다. 중심부로 내려가면서 대조군보다는 신경섬유의 윤곽을 따라서 양성반응을 나타내었다(Fig. 6-B). 이식 20일군에서는 중심부로 내려가면서 신경외막과 거의 비슷한 정도의 양성반응이 신경섬유의 윤곽을 따라서 짙게 나타났다. 이식 30일군에서는 현저하게 NGF 반응이 소실되어 중심부의 일부분에서만 양성반응이 선상으로 나타났다(Fig. 6-C). 이식 40일군에서도 30일군과 비슷한 반응을 나타내었으나 특이하게 신경외막의 안쪽을 따라서 NGF 반응이 나타났으며 중심부에도 신경섬유의 윤곽을 따라서 반응이 나타났다. 이식 50일군에서는 신경외막에는 거의 반응을 나타내지 않았으며 중심부에 심경섬유의 윤곽을 따라서 약한 NGF 반응이 나타났다.

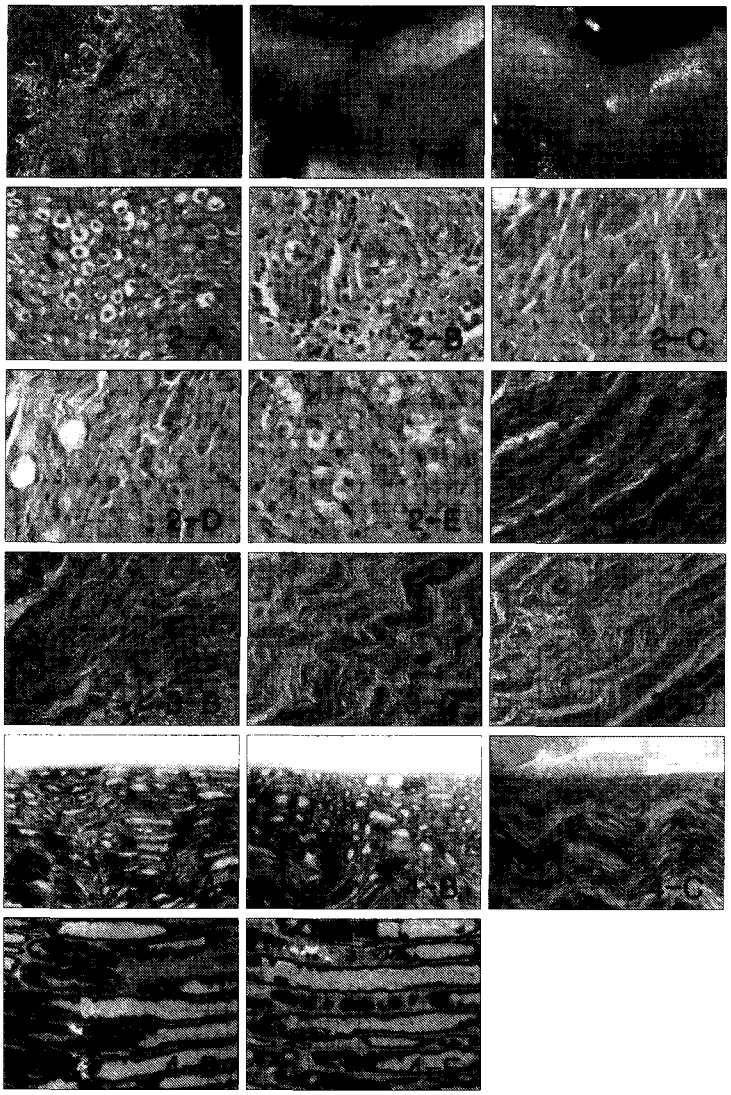
2) *Proliferating cell nuclear antigen(PCNA)*의 변화

대조군에서 PCNA 반응은 거의 나타나지 않았으나(Fig. 7-A), 이식10일군에서는 소수의 분화한 Schwann cell 핵에 아주 미약한 반응을 나타내었으나 섬유모세포로 보이는 길고 납작한 핵에는 반응이 나타나지 않았다. 이식 20일군에서 분화한 Schwann cell의 핵으로 보이는 부분의 세포질 위에 뚜렷한 양성반응을 나타내었으며 작은 신경섬유 주위의 Schwann cell의 핵에도 반응이 나타났다(Fig. 7-B). 이식 30일군에서는 다수의 Schwann cell의 핵에는 양성반응을 보였으나 섬유모세포에는 반응을 보이지 않았다. 이식 40일군에서는 신경섬유 주위에 모여있는 분화한 Schwann cell의 핵에 양성반응을 보이는 세포들이 다수 나타났다.(Fig. 7-C). 이식 50일군에서는 신경섬유를 형성하고 있는 Schwann cell의 핵에 뚜렷한 양성반응을 보이는 세포들이 다수 나타났다.

고 찰

신경이 절단되면 절단된 신경의 원위부에서 Wallerian degeneration이 일어나며 그 후 Schwann cell의 이동과 신경세포체로부터 분비된 물질의 자극에 의해서 신경분절로부터 신경섬유의 재성장이 일어날 수 있도록 해준다고 한다[14]. 축삭이 손상되고 Schwann cell의 수초 탈락과 용해가 초래되며 myelin gene의 하향조절이 일어나지만 이러한 변화로 인하여 재생하는 섬유가 자라도록 안내하는 표면분자를 분비하게 되며, 원위부에서 일어나는 분자적 변화로는 neutrophins, neural cell adhesion molecules, cytokines 및 다른 용해성 인자와 그에 상응하는 수용체들의 상향성 조절이 일어난다고 한다[17]. 그러나, 손상부위가 광범위하여 근위부와 원위부의 간격이 멀게 되면 신경섬유의 재생은 기대할 수 없게 된다. 그러므로, 이런 경우에는 잘린 신경섬유의 양끝을 수술적으로 접근시켜 주거나 신경이식편의 이식을 시행할 수 있게 된다. 신경이식에 의한 말초신경 재생을 극대화 하기 위해서는 가능한 한 신선한 살아있는 신경편을 사용하며 Schwann cell의 유의한 자극 없이는 수초화가 일어나지 않는다고 한다[20]. 냉동한 이식편을 이식하는 경우에는 Schwann cell의 하향성 증식이 매우 적고 면역억제제를 사용하지 않으면 이식편에 있는 Schwann cell이 살아 남지 못한다고 보고되고 있다[7]. 즉, 이미 분화가 끝난 신경조직을 이식했을 경우에는 생물학적 적응성과 면역 거부반응 등의 문제로 성공적인 이식을 기대하기에는 아직은 어려움이 있다.

최근 연구에서 신경이식에 줄기세포를 활용하는 많은 가능성을 제시하고 있으나 아직은 해결해야할 문제가 있다. 줄기세포계(stem cell line)를 배양하는 과정에서 일부 세포가 스스로 분화를 지속하는 경향을 나타내는 문제가 바로 그것이다. 줄기세포의 특성상 일단 특정 유형의 세포 형질을 획득하게 되면 다른 세포로 분화시키는 것이 불가능해진다. 이런 상태에까지 분화한 줄기세포는 활용 가치가 없어지기 때문에 줄기세포의 효용성을 높이기 위해서 자발적인



The morphological change of regenerating sciatic nerve were studied at the transplanted segment of intravascular cultured neural stem cell in the rat transected sciatic nerve.

Fig. 1-A. Photograph of the neural stem cells of culture 9 day.
Fig. 1-B. Gross finding of the 40th day after the transplantation. X 50.
Fig. 1-C. Gross finding of the 50th day after the transplantation. X 50.
Fig. 2-A. Hematoxylin and eosin staining of the control. X 400.
Fig. 2-B. Hematoxylin and eosin staining of the 20th day after the transplantation. X 400.
Fig. 2-C. Hematoxylin and eosin staining of the 30th day after the transplantation. X 400.
Fig. 2-D. Hematoxylin and eosin staining of the 40th day after the transplantation. X 400.
Fig. 2-E. Hematoxylin and eosin staining of the 50th day after the transplantation. X 400.
Fig. 3-A. Phosphotungstic acid hematoxylin staining of the control. X 400.
Fig. 3-B. Phosphotungstic acid hematoxylin staining of the 20th day after the transplantation. X 400.
Fig. 3-C. Phosphotungstic acid hematoxylin staining of the 40th day after the transplantation. X 400.
Fig. 3-D. Phosphotungstic acid hematoxylin staining of the 50th day after the transplantation. X 400.
Fig. 4-A. Toluidine blue staining of the control. X 400.
Fig. 4-B. Toluidine blue staining of the 20th day after the transplantation. X 400.
Fig. 4-C. Toluidine blue staining of the 40th day after the transplantation. X 400.
Fig. 4-D. High magnification of Fig. 15. X 1000.
Fig. 4-E. High magnification of toluidine blue staining of the 50th day after the transplantation. X 1000.

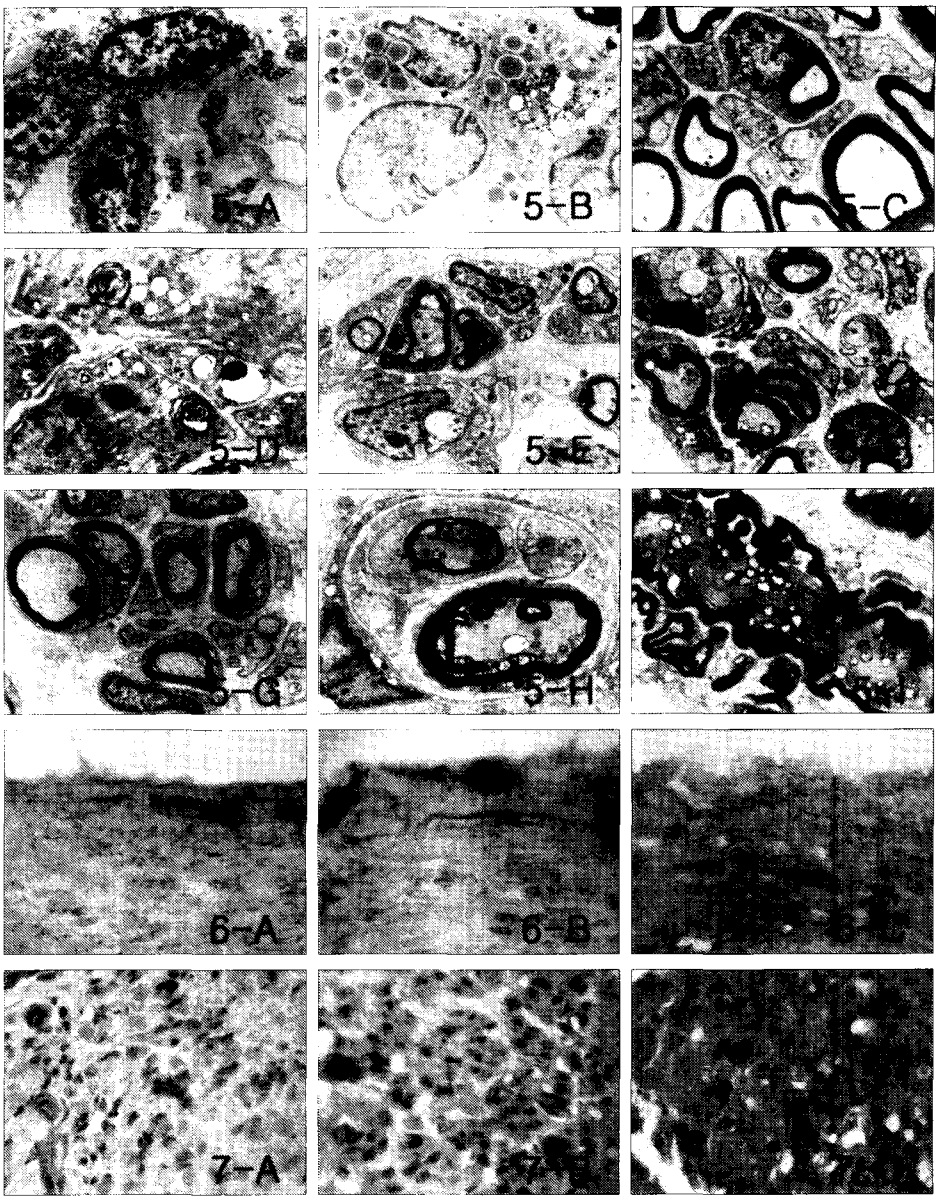


Fig. 5-A. Electron micrograph of the neural stem cells by 0 day after the transplantation. X 5000.
Fig. 5-B. Electron micrograph of the neural stem cell by 1 day after the transplantation. X 5000.
Fig. 5-C. Electron micrograph of the control. X 5000.
Fig. 5-D. Electron micrograph of the 10th day after the transplantation. X 5000.
Fig. 5-E. Electron micrograph of the 20th day after the transplantation. X 5000.
Fig. 5-F. Electron micrograph of the 30th day after the transplantation. X 5000.
Fig. 5-G. Electron micrograph of the 40th day after the transplantation. X 5000.
Fig. 5-H. Electron micrograph of the 50th day after the transplantation. X 5000.
Fig. 5-I. Electron micrograph of the longitudinal section of 50th day after the transplantation. X 5000.
Fig. 6-A. Immunohistochemical staining of the NGF of the control. X 400.
Fig. 6-B. Immunohistochemical staining of the NGF of the 10th day after the transplantation. X 400.
Fig. 6-C. Immunohistochemical staining of the NGF of the 30th day after the transplantation. X 400.
Fig. 7-A. Immunohistochemical staining of the PCNA of the contol. X 400.
Fig. 7-B. Immunohistochemical staining of the PCNA of the 20th day after the transplantation. X 400.
Fig. 7-C. Immunohistochemical staining of the PCNA of the 40th day after the transplantation. X 400.

분화를 인위적으로 제어해야 하며 원하는 세포계열로 분화 유도하여야 한다. 최근의 연구에서 ABCG2/Bcrpl 유전자를 발현시키는 세포가 분화하지 않고 미분화 상태로 남는 경향이 그렇지 않은 세포에 비해 높은 반면 이미 특정 유형의 세포로 분화를 마친 경우에는 ABCG2/Bcrpl 유전자가 전혀 발견되지 않는다고 한다[23]. 이는 이 유전자가 줄기세포 분화에 결정적인 영향을 미쳐 자발적 분화를 저해한다는 것을 의미한다. 이러한 특성을 활용하면 원하는 줄기세포를 손쉽게 동정하는 것도 가능하게 될 것으로 전망할 수 있다.

본 실험에서는 미분화된 신경계보의 세포를 확보하기 위하여 임신 10일경의 태자의 척수에서 신경줄기세포를 얻었고 신경줄기세포를 Schwann cell로 분화시키기 위하여 fibroblast growth factor-1 (FGF-1)을 사용하였다. 또한, 혈관성 내피세포 성장인자를 국소적으로 적용하면 Schwann cell의 침윤과 신생혈관의 형성이 촉진된다는데 이러한 과정은 신경의 재생에 매우 중요하다는 보고[13]를 참조하여 본 실험에서는 절단된 부위의 신경재생을 촉진하기 위하여 동맥을 사용하였으며 동맥 내피세포에 의한 신경재생 영향을 가능한 한 배재하기 위하여 동맥을 줄기세포 배양액에 3일간 담가두어 내피세포가 배양용기내로 배출되게 하였고, 줄기세포의 활착을 좋게 하기 위하여 줄기세포를 동맥속에 주입한 후 1일간 배양하여 이식에 활용하였다.

이식부위의 육안소견에서 20일 이후 신경외막의 재생이 확인되었고 50일 이후 신경섬유의 재생을 확인하였을 뿐만 아니라 광학현미경적 소견에서도 20일군 이후 이식한 Schwann cell의 수가 증가하여 수초 형성이 이루어진 것을 확인하였고 50일 이후 신경섬유의 재생이 관찰되어 이식세포의 활착이 성공적 이였다. 표본의 미세구조적 관찰에서 분화한 신경줄기세포가 지질과립이나 세포소기관이 Schwann cell의 특성을 많이 나타내었지만 그것이 신경줄기세포로부터 분화한 Schwann cell인지 아니면 근위부에서 신경줄기세포의 유도에 의해 이동하는 Schwann cell인지는 구조적 관찰로는 구분되지 않았으며 이는 유전적 기법을 이용하여 더 연구하여야 할 과제로 생각되었다.

신경이 손상되면 축삭의 성장과 재생을 위하여 Schwann cell의 지질내 apolipoprotein E의 역할이 중요하며 이 지질은 축삭으로부터 수초로 운반되지만 그 기전이나 신호전달 등은 아직 거의 밝혀진 바 없다[21]. 신경재생과정 동안 신경미세원섬유 subunits의 선택적 용해가 일어나 low molecular-mass subunits들이 불용성 조각으로 남는다고 한다[18].

본 실험의 전자현미경 소견에서 시간이 경과함에 따라 Schwann cell의 풍부한 세포질 내에는 지질과립으로 보이는 소포들, 미세원섬유와 미세소관 및 많은 유리 리포좀과 미세한 과립을 가진 소포들이 분포하고 있었다. 이는 재수초화에 필요한 지질이나 신경미세원섬유의 불용성 단백질 조각으로 추정하였다.

신경세포의 배양액내 관찰에서 신경교세포와 함께 배양한 경우에는 신경세포만 홀로 배양한 세포에 비해 약 7배나 더 많은 수의 시냅스를 가지고 있음을 확인하였다고 했다. 그러나, 두 종류의 세포가 지닌 시냅스는 크기나 모양, 신경전달 물질을 포함하고 있는 입자의 수에서는 별 차이가 없다고 하였다. 신경교세포와 합동배양한 신경세포의 시냅스가 활성이 높은 것은 시냅스의 수가 더 많기 때문인 것이라 한다. 그리고, 여기에서 신경교세포를 제거하면 며칠 이내에 스냅스를 잃기 시작한다고 하였다. 또한, 뇌발생과정에서도 신경세포체들을 형성하기 위해 적절한 위치로 축삭과 수지상돌기가 뻗어 가지만 성상세포가 성숙하기 전까지는 대부분의 시냅스가 형성되지 않는다고 하였다[12].

본 실험에서는 이러한 신경교세포 대신 태자의 척수조직세포를 FGF-1으로 분화시킨 뒤 사용하였으며 Schwann cell들의 활발한 이동을 유발하기 위하여 동맥내 줄기세포를 배양한 후 이식하여 신경재생이 원활히 이루어지도록 처리하였다. 이러한 재수초화 과정에서 특이한 점은 재수초화를 진행하는 Schwann cell 주위에는 작은 분비과립을 가진 소포가 들어있는 다른 세포의 세포돌기들이 접촉하고 있으며 재생이 더욱 진행될수록 세포돌기들의 접촉 범위가 넓어진다는 점이다. 또한, 신경섬유 주위에 분포하는 Schwann cell들에는 PCNA 반응이 뚜렷하게 나타난다고 한다. 이는 중배엽성 줄기세포에 TNF와 같은 조절성 물질이 세포분화의 마지막 단계를 억제할 때 autocrine이나 paracrine의 형태로 분비된다는 견해[5]를 참조하면 신경줄기세포로부터 분화한 Schwann cell도 이들 물질의 자극을 위해 세포의 돌기 등이 넓게 접촉을 유지하고 있으며 신경섬유 주위에 PCNA 반응을 보일 것이라 추론 할 수 있겠다. 실제 실험군의 PCNA 반응은 분화가 진행될수록 Schwann cell의 핵에서 양성반응을 나타내었다.

발생중인 신경세포에서 신경섬유의 형성은 filopodia라는 손가락 모양의 돌출부를 통해 외부환경을 파악하여 축삭이

적절한 방향으로 뻗어가도록 지시한다. 지금까지는 filopodia가 어떤 종류의 신호를 보내 이 과정을 조절하는지 알려져 있지 않았지만, filopodia 끝에서 매우 작은 양의 칼슘이온을 방출함으로써 성장추(growth cone)가 올바른 방향으로 향하게 한다는 사실을 발견하게 되었다[3]. 즉, 축삭의 성장과정이 주변세포들에 의해 조절된다는 점에서 본 실험의 전자현미경적 소견으로 이들에 의해 축삭의 재생을 유도하고 있다고 추론 할 수 있겠다.

본 실험에서 재생과정이 진행되면서 신경세포의 확장된 축삭내에는 사립체의 수나 크기가 증가하고 많은 신경미세소관이나 미세섬유들이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 신경절단으로 인하여 차단된 신경말단으로부터의 재순환되는 물질이나 절단된 축삭과 Schwann cell과 그 주위의 환경에 대한 정보가 재생되는 신경세포체로 전달되면서 이에 대한 신경세포의 보상성 반응으로 재생에 필요한 물질을 적절히 공급하기 위해 사립체의 크기가 커지고, 차단된 수송을 원활히 일어나게 하기 위하여 신경미세소관이나 미세섬유들이 증가하였을 것으로 추정하였다. 또한, 수초의 재건에 이어 진행되는 축삭의 회복으로 신경섬유를 형성하게 되면서 PCNA와 함께 NGF의 활성도가 증가되어 재생판정의 좋은 지표가 될 수 있었다. NFG 반응의 증가는 새로 재건된 신경섬유외막으로부터 시작하여 중심부근의 반응이 증가되다가 신경섬유가 형성된 50일군에 이르면 그 반응이 현저히 감소되었다. 이러한 NGF와 PCNA 반응의 변화는 신경줄기세포에서 분화된 Schwann cell은 신경재생에 관여하여[19] 신경세포체에서는 신경재생과정에 필요한 자극을 우선 기존의 신경섬유외막에 있는 Schwann cell에 먼저 영향을 미친 후 이들 Schwann cell에 의해서 이식한 신경줄기세포의 증식과 분화가 유발되었을 것이라 추정할 수 있었다. 즉, 수초에 발생한 재생반응으로 신경줄기세포는 분화하면서 새로운 Schwann cell과 함께 새 전구세포를 형성시키는 현상이 일어나며 PCNA가 증가되었을 것으로 생각되었다.

이상의 결과에서 신경재생에서 유도표면분자의 안정적 확보를 위해 혈관을 이용한 점과 신경줄기세포를 이식하여 Schwann cell의 분화 및 신경재생 증식을 유도한 점에서 말초신경 재생의 유리한 기법을 증명하였다는 점에서 가치 있는 업적으로 사려된다.

요 약

흰쥐의 좌골신경을 절단한 후 혈관내에서 배양한 신경줄기세포를 이식하여 말초신경에서도 수초의 재생이 일어나는지를 형태학적으로 규명하고 배양한 신경줄기세포들로부터 분화한 Schwann cell들이 회복할 수 있는지를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다. 이식한 20일 후 동맥내 배양한 신경줄기세포는 Schwann cell로 분화하여 신경섬유의 재생이 일어나기 시작하였다. Schwann cell은 증식 후 재수초화를 형성하기 위하여 다른 Schwann cell들로부터 여러 가지를 자극을 받고 있었으며 NGF 소견으로 볼 때 신경외막으로부터 기존의 Schwann cell로부터 신경줄기세포의 분화가 유도되었으며 PCNA 반응으로 볼 때도 기존의 신경섬유의 Schwann cell 주위에서부터 증식이 일어났다. 미세구조적으로는 Schwann cell의 재수초화, 축삭내 사립체와 미세소관의 수의 증가를 관찰할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Aldskogius, H. and J. Arvidsson. 1978. Nerve cell degeneration and death in the trigeminal ganglion of the adult rat following peripheral nerve transection. *J. Neurocytol.* **7(2)**, 229-250.
2. Bulger, V. T. and M. A. Bisby. 1978. Reversal of axon transport in regenerating nerves. *J. Neurochem.* **31**, 1411-1418.
3. Filipak, M., R. L. Sparks, C. Y. Tzen and E. R. Scott. 1988. Tumor necrosis factor inhibits the terminal event in mesenchymal stem cell differentiation. *J. Cell Physiol.* **137**, 367-373.
4. Friede, R. L. and R. Bischhausen. 1980. The fine structure of stumps of transected nerve fibers in subserial sections. *J. Neurol. Sci.* **44(2-3)**, 181-203.
5. Gomez, T. M., E. Robles, M. Poo and N. C. Spitzer. 2001. Filopodial calcium transients promote substrate-dependent growth cone turning. *Science* **291**, 1983-1987.
6. Guest, J. D., A. Rao, L. Olson, M. B. Bunge and R. P. Bunge. 1997. The ability of human Schwann cell grafts to promote regeneration in the transected nude rat spinal cord. *Exp. Neurol.* **148(2)**, 502-522.
7. Karacaoglu, E., F. Yuksel, F. Peker and M. M. Guler. 2001. Nerve regeneration through an epineurial sheath:

its functional aspect compared with nerve and vein grafts. *Microsurgery* **21(5)**, 196-201.

8. Kerezoudi, E., R. H. King, J. R. Muddle, J. A. O'Neill and P. K. Thomas. 1995. Influence of age on the late retrograde effects of sciatic nerve section in the rat. *J. Anat.* **187(Pt1)**, 27-35.
9. Levine, J. M., R. Reynolds and J. W. Fawcett. 2001. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trend Neurosci.* **24(1)**, 39-47.
10. McDonald, J. W., X. Z. Liu, Y. Qu, S. Liu, S. K. Mickey and D. Turetsky. 1999. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat. Med.* **5(12)**, 1410-1412.
11. Orian, J. M., A. J. Ahern, M. M. Ayers, J. M. Levine, L. D. Tapp and R. Reynolds. 2001. Distributed oligodendrocyte development and recovery from hypomyelination in a c-myc transgenic mouse mutant. *J. Neurosci. Res.* **66(1)**, 46-58.
12. Schwabegger, A. H. and H. Hussl. 2001. Fetal spinal-cord allograft as a substitute for peripheral-nerve reconstruction: a preliminary experimental and histologic study. *J. Reconstr. Microsurg.* **17(1)**, 45-50.
13. Sondell, M., G. Lundborg and M. Kanje. 1999. Vascular endothelial growth factor stimulates Schwann cell invasion and neovascularization of acellular nerve grafts. *Brain Res.* **846(2)**, 219-228.
14. Stoll, G. and H. W. Muller. 1999. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol.* **9(2)**, 313-325.
15. Storch. A., G. Paul, M. Csete, B. O. Boehm, P. M. Carvey and A. Kupsch, 2001. Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells. *Exp. Neurol.* **170(2)**, 317-325.
16. Terenghi, G. 1999. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J. Anat.* **194(Pt1)**, 1-14.
17. Trumble, T. E. and F. G. Shon. 2000. The physiology of nerve transplantation. *Hand Clin.* **16(1)**, 105-122.
18. Tsuda, M., T. Tashiro and Y. Komiya. 2000. Selective solubilization of high-molecular-mass neurofilament subunit during nerve regeneration. *J. Neurochem.* **74(2)**, 860-868.
19. Tuszynski, M. H., N. Weidner., M. McCormack, I. Miller, H. Powell and J. Conner. 1998. Grafts of genetically modified Schwann cells to the spinal cord: survival, axon growth and myelination. *Cell Transplant.* **7(2)**, 187-196.
20. Ullian, E. M., S. K. Sapperstein, K. S. Christopherson and B. A. Barres. 2001. Control of Synapse Number by Glia. *Science* **291**, 657-661.
21. Vancea, J. E., R. B. Campenotb and D. E. Vancec. 2001. The synthesis and transport of lipids for axonal growth and nerve regeneration. *Biochim. Biophys. Acta* **1486(1)**, 84-96.
22. Wu, H. Y., M. R. Dawson, R. Reynolds and R. J. Hardy. 2001. Expression of QKI protein and MAP1B identifies actively myelinating oligodendrocytes in adult rat brain. *Mol. Cell Neurosci.* **17(2)**, 292-302.
23. Zhou, S., J. D. Schuetz, K. D. Bunting, A. M. Colapiertro, J. Sampath and J. J. Morris. 2001. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nature Medicine* **7(9)**, 1028-1034.

(Received April 18, 2002; Accepted May 29, 2002)