

비관형 천연 셀룰로오스막 도관을 이용한 말초신경 재생에 대한 실험적 연구

김성민 · 이종호¹ · 이석근²

강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, ¹서울대학교 치의학대학원 구강악안면외과학교실,
²강릉대학교 치과대학 구강병리학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2006;32:295-307)

EXPERIMENTAL STUDY OF PERIPHERAL NERVE REGENERATION BY USING NON-TUBULAR NATURAL CELLULOSE MEMBRANE NERVE CONDUIT

Soung-Min Kim, Jong-Ho Lee¹, Suk-Keun Lee²

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Kangnung National University,

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Graduate School of Dentistry, Seoul National University,

²Department of Oral Pathology, College of Dentistry, Kangnung National University

Styela clava, called non-native tunicate or sea squirt, is habitat which include bays and harbors in Korea and several sites in the sea faced world. We fabricate cellulose membrane nerve conduit (CMNC) from this native sea squirt skin, and evaluate the capacity of promoting peripheral nerve regeneration in the rat sciatic nerve defect model.

After processing the pure cellulose membrane from the sea squirt skin as we already published before, CMNC was designed as a non-tubular sheet with 14 mm length and 4 mm width. Total eleven male Sprague-Dawley rats (12 weeks, weighing 250 to 300g) were divided into sham group (n=2), silicone tube grafted control group (n=3) and experimental group (n=6). Each CMNC grafted nerve was evaluated after 4, 8 and 12 weeks in the experimental group, and after 12 weeks, sciatic function was evaluated with sciatic function index (SFI) and gait analysis, and histomorphology of nerve conduit and the innervated tissues of sciatic nerve were all examined using image analyzer and electromicroscopic methods in the all groups.

The regenerated axon and nerve sheath were found only in the inner surface of the CMNC after 4 weeks and became more thicker after 8 and 12 weeks. In the TEM study, CMNC grafted group showed more abundant organized myelinated nerve fibers with thickened extracellular matrix than silicone conduit grafted group after 12 weeks. The sciatic function index (SFI) and ankle stance angle (ASA) in the functional evaluation were -47.2 ± 3.9 , $35.5^\circ \pm 4.9^\circ$ in CMNC grafted group (n=2) and -80.4 ± 7.4 , $29.2^\circ \pm 5.3^\circ$ in silicone conduit grafted group (n=3), respectively. And the myelinated axon was 41.59% in CMNC group and 9.51% in silicone conduit group to the sham group.

The development of a bioactive CMNC to replace autogenous nerve grafts offers a potential and available approach to improved peripheral nerve regeneration. As we already published before, small peptide fragment derived from the basement membrane matrix proteins of squirt skin, which is a kind of anchoring protein composed of glycocalyx, induced the effective axonal regeneration with rapid growth of Schwann cells beneath the inner surface of CMNC. So the possibilities of clinical application as a peripheral nerve regeneration will be able to be suggested.

Key words: Ankle stance angle (ASA), Cellulose membrane nerve conduit (CMNC), Peripheral nerve regeneration, Sciatic function index (SFI), Schwann cell, Styela clava

I. 서 론

이종호

110-768 서울특별시 종로구 연건동 275-1
서울대학교 치의학 대학원 구강악안면외과학교실 및 치학연구소

Jong-Ho Lee

Dept. of OMFS, Graduate School of Dentistry, Seoul National Univ. & Dental Research Institute
28 Yeongun-dong, Jongno-gu, Seoul, 110-768, South Korea
Tel: 82-2-2072-2630 Fax: 82-2-766-4948
E-mail: leejongh@plaza.snu.ac.kr

셀룰로오스는 세포의 바깥구조를 지지하는 다당류로서 식물계에서는 가장 풍부한 세포외구조 다당류이자 동식물계에서 가장 풍부한 생체분자로서 지구상에 많은 양이 존재하고 식물의 세포벽이나 몇몇 동물 및 박테리아에서 쉽게 얻을 수 있는 물질이다^{1,2}. 멧게 (Ascidian, *Halocynthia roretzi*) 및 미더덕 (Ascidian, *Styela clava*)은 일반적으로 Sea squirt, Sea grape, Tunicate

※ 이 논문은 2005년도 해양수산부 및 한국해양수산기술진흥원의 지원에 의하여 연구되었음 (This work was supported by fisheries research and development funds granted the Korean Ministry of Maritime affairs and Fisheries).

등으로도 불리며 동물이면서 식물의 특성을 지니는 일반적
으로 음식물로 친숙한 해양 생물들이다. 이들 해양 생물의 피
부각질은 단단한 셀룰로오스로 덮혀 있는데, 16,000 여개의 유
전자 중에서 사람의 유전자와 80%의 유사성을 지니는 것으로
알려져 있을 만큼 동물성 셀룰로오스의 성질을 지니고 있어서
저자들은 이 각질에 대한 단계별 처리 과정을 거쳐 얇은 셀룰
로오스막을 생산함을 보고한 바 있었다³⁾.

인체내 말초신경 손상은 의학 및 임상치의학이나 구강악안
면 영역의 수술에서 흔히 접할수 있으며 대개는 외과적인 처
치 없이 지켜보게 되나, 손상받은 근원심 신경부가 자연 재생
될 수 없을 만큼 넓은 경우 자가신경 이식을 이용한 외과적인
처치를 필요로 하게 된다^{4,7)}. 따라서, 공여부 신경 손상을 피하
기 위해서 비복신경 (sural nerve)이나 대이개신경 (greater auricu
lar nerve)과 같은 자가신경을 이용하지 않고 여러 인공 신경 도
관을 개발하려는 노력이 지속되어 왔다⁸⁾.

본 연구진은 기존의 이런 두 연구분야를 접목시켜 셀룰로오
스막의 신경재생에서의 생활성 정도를 확인하기 위하여 백서
의 좌골신경 결손모델 (sciatic nerve defect model)에 비관형 (non-
tubular) 신경도관으로 적용시켜 기존의 실리콘 신경 도관 (sili
cone nerve conduit)과 비교하여 말초신경 재생 정도를 알아보고
재생능력을 평가하고자 하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 신경도관용으로 셀룰로오스막의 개발 (Development of cellulose membrane as a nerve conduit)

멍게와 미더덕 피부 각질을 의료용으로 사용하기 위해서는
순도가 높도록 해야 한다. 이에 멍게와 미더덕의 피부 각질을
고농도의 산과 알칼리를 고온에서 장기간 처리함으로써 얻었
던 기존의 연구 방법을 보다 개선하여 0.2 mm 이내 두께의 셀
룰로오스막을 제조하였는데, 셀룰로오스막을 1 N HCl에 넣어
음이온을 제거한다음 증류수로 세척하고 Ca(OH)₂로 중화시키

면서 Ca 성분을 막에 부착하였다.

이렇게 제조된 셀룰로오스막을 트립신 처리하고 산화에틸
렌 (ethylene oxide) 가스로 멸균소독하여 진공밀폐 포장하여 그
림 1과 같이 준비한다. 준비된 셀룰로오스막에 대한 아미노산
분석 및 기타 다른 원소 분석을 시행하며 이에 대한 과정은 기
존에 보고된 내용과 같다⁹⁾.

2. 실리콘 도관의 변형 제작

셀룰로오스막 신경도관과 비교할 대조군으로는 최근까지도
실험적으로 가장 많이 사용되고 있는 도관이면서 기존의 본
연구진이 사용한 경험이 있는 유연한 성질을 지닌 실리콘
도관 (I.D. 1.98 mm, 14 mm length, SF Medical, USA)을 선택하였
다^{8,12)}. 셀룰로오스막 신경도관처럼 편평한 sheet 형태의 도관으
로 사용하여 서로 비교할 수 있도록 하기 위하여 단면의 1/4 상
부 부위를 수평으로 잘라서 아래 3/4 크기만 남도록 제작하였
다 (Fig. 2). 이렇게 제작된 도관을 30분간 75% 에탄올에서 소독
한 후 pH 7.4의 PBS로 3회 세척하고 산화 에틸렌 가스 소독하
여 사용하였다.

3. 실험 동물 준비 및 신경 도관 이식 수술

250-300g 정도의 수컷 백서 (Sprague-Dawley rats)들을 최소 실
험 7일 전부터 12시간 주기로 자유롭게 물과 먹을 것들을 주면
서 강릉대학교 치과대학의 동물 실험 가이드라인에 따라 사육
과 실험을 진행하였다. 전체 11마리의 백서를 실리콘 도관을
사용한 대조군 3마리, 셀룰로오스막 도관을 사용한 실험군 6마
리 및 정상비교군 (sham group) 2마리 등으로 나누었다. 정상비
교군은 단지 좌골 신경을 노출시킨 후 어떤 처치도 하지 않은
상태로 봉합한 군이며, 실험군 6마리는 각각 4주, 8주 및 12주
후에 2마리씩 희생하여 신경재생 여부를 조직형태학적으로
관찰하였다.

케타민 (60mg/kg, ketamine hydrochloride, Yuhan Co., Korea) 과

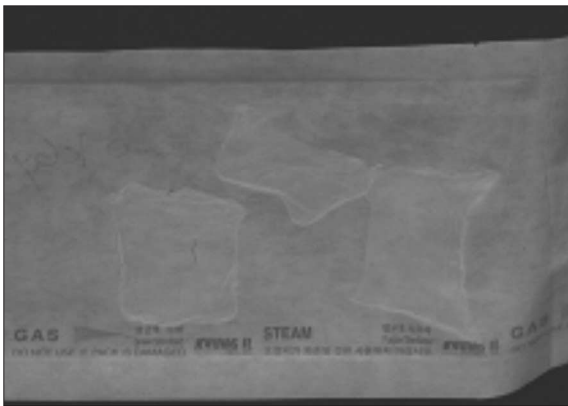


Fig. 1. Preparation of sterilized cellulose membrane.

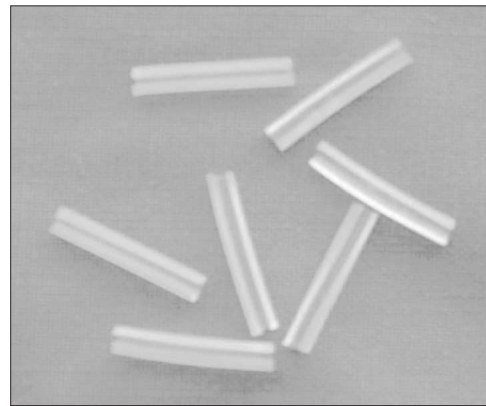


Fig. 2. Modification of a silicon tube (Internal Diameter 1.98 mm, length 14 mm).

럼푼 (3mg/kg, xylazine hydrochloride, Bayer Korea Co., Korea)을 4:1의 비율로 섞어 복강내 주사하여 실험동물을 마취한 다음 좌측등과 뒷부위를 제모하여 포비돈 아이오다이드 (povidone iodide)로 소독한 후 지혈 목적으로 수술부에 1% Lidocaine (1:100,000 epinephrine, Yuhan Co., Korea)을 주사하였다. 둔부근육 절개 (Gluteal muscle splitting incision)를 통해 좌측 좌골 신경의 분지부를 노출시키고⁸⁾, 10 mm의 좌골 신경을 절제하였다. 이때 필요하면 추후 이식 신경 도관이 최소한으로 움직이도록 좌골 신경의 근심부를 둔부 근육에 5-0 나일론 (Ailee Co., Korea)을 이용해서 고정시켰다.

좌골신경은 미세현미경 하에서 좌골 절흔 (sciatic notch)으로부터 5 mm 원심부까지 미세하게 박리하여 9/0 나일론 (Ailee Co., Korea)으로 두 군데 신경외피봉합 (two epineurial sutures)을 통해 미리 제작한 14 mm 길이와 4 mm 폭경의 셀룰로오스막을 이식하였으며 (Fig. 3), 대조군으로는 실리콘 신경도관을 이식하였다 (Fig. 4). 절제된 좌골 신경의 근원심부 2.0 mm 부분이 직접 신경 도관과 접하도록 하여 중간에 빈 공간이 생기지 않도록 하였으며, 나일론을 통한 봉합만 하고 다른 피브린 접착제 (fibrin glue, Greenplast, 녹십자, Noksybja PBM Co., Korea) 등은 사용하지 않았다. 이때 셀룰로오스막은 주사전자현미경 소견상에서 보였던 것과 같이 외면과 내면을 구분하여 내면쪽에 절단된 신경 말단이 놓이도록 하였다. 둔부 근육들은 5-0 바이크릴 (Johnson & Johnson Co., USA)을 이용하여 봉합하였고 이때 이식한 신경 도관이 움직이지 않는 것을 확인하였으며, 백서 피부는 4-0 나일론 (Ailee Co., Korea)을 이용하여 봉합하였다.

이식실험 후 실험동물들은 마취제에서 회복될 때까지 각각 케이지 안에서 따뜻하게 유지시켰으며, 깨어난 후에는 충분한 수분과 먹이를 주었다. 수술 후 동통 감소를 위해 타라신 (Tarasyn, 2mg/kg, ketorolac tromethamine, Yuhan Co., Korea)과 감염 방지를 위해 이세파신 (Icepacin 1.5mg/kg, icepamicin sulfate, Yuhan Co., Korea)를 각각 3일간 피하 주사하였으며, Cyclosporin

A (CsA, 100mg/ml, Novartis, USA) 20 mg을 1주일간 올리브오일과 섞어서 경구투여하여 이식에 대한 면역거부 반응을 억제하였다.

4. 평가

4-1. 광학 및 전자 현미경 평가 (LM & EM assessment of grafted nerve conduit)

실험군 6마리를 각각 2마리씩 이식후 4주, 8주, 12주 후에 동물을 희생시켜 도관 이식부를 채취하여 아래와 같이 평가하였다.

a. H&E 및 Masson-Trichrom 염색에 의한 평가

12주 후에는 다른 기능검사를 먼저 시행한 후 동물을 희생시켰으며, 각 시편은 도관 이식부를 채취하여 도관의 가운데 부분 (mid-portion of conduit)의 단면을 잘라 3 μ m 두께의 절편을 만들어서 통상적인 조직형태학적 검사를 시행하였다.

b. LFB 염색 및 Toluidine blue 염색에 의한 수초화 정도 및 축삭돌기 수 평가

수초화된 신경 섬유와 축삭돌기 (myelinated axons) 정도를 알아보기 위해 Luxol Fast Blue (LFB, Acros Organics, USA) 염색을 시행했다. 부유 냉동 절편기 (Freely floating cryostat)를 이용해서 20 μ m 절편으로 자른 후 PBS에서 씻고 70%, 80%, 그리고 96% 에탄올에서 차례대로 옮긴 후 0.1% LFB 및 0.05% 아세톤 처리를 한다. 56 $^{\circ}$ C에서 하루 저녁 염색한 후, 증류수에 씻어서 PBS를 거친 후 0.05% aqueous lithium carbonate (Showa Chemicals Inc, Japan) 처리를 하고 70% 에탄올 처리한 후 식염수로 씻고 탈수시킨 후 마운팅하였다. 반대 염색을 위해서 증류수에서 두 번 닦아낸 후 아세테이트 완충액 내의 cresyl violet (Acros Organics,

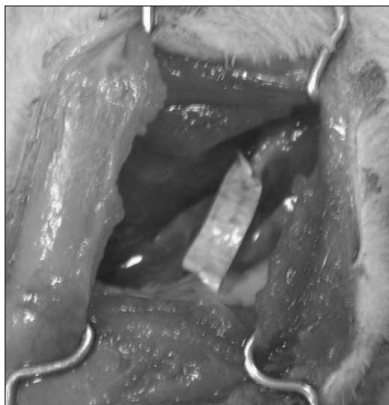


Fig. 3. Photographs of grafted non-tubular cellulose membrane nerve conduit in experimental group.

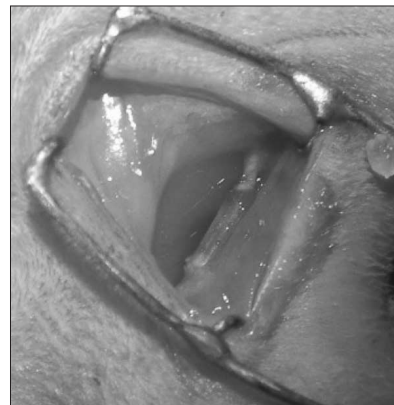


Fig. 4. Photographs of grafted silicone conduit in control group.

USA)용액에서 30분간 둔 후, 역시 두 번 증류수에 세척하고 에탄올에서 차례대로 탈수한 후 Entellan처리를 하였다^{8,13,14}. 수초층은 파랑색으로 염색되며 신경 세포들은 분홍이나 보라색으로 염색되게 된다.

수초화된 축삭 돌기를 평가한 후 신경 도관 조직을 2.5% glutaraldehyde 용액에 고정하여 2% osmium tetra-oxide (Polysciences, USA)처리를 하고, epon resin으로 포매하여 1 μm 두께로 초미세 절편기 (ultramicrotome)로 자른 후 toluidine blue 염색하였다. 영상 분석기 (ImageTool®, Version 2.0 Alpha 3 [patch level 1], USA)를 통해 컴퓨터 (Safer ASUS L3®, ASUS Co., Korea)상에서 수초화되거나 수초화되지 않은 축삭돌기들과 전체 슈반세포 및 신경 세포들을 정량적으로 분석하였다.

c. 주사전자현미경 평가

초미세조직 절편 (Ultrathin sections)들을 300-mesh copper/rhodium grids 위에서 5% uranyl acetate 용액으로 염색한 후, 5분간 70% 메탄올 처리 후 건조시켜서, 5분간 lead citrate로 반대 염색한 후 다시 건조시켜서 주사전자현미경 (Zeiss EM 10CR, Germany)으로 재생된 신경의 미세구조를 관찰하였다⁸.

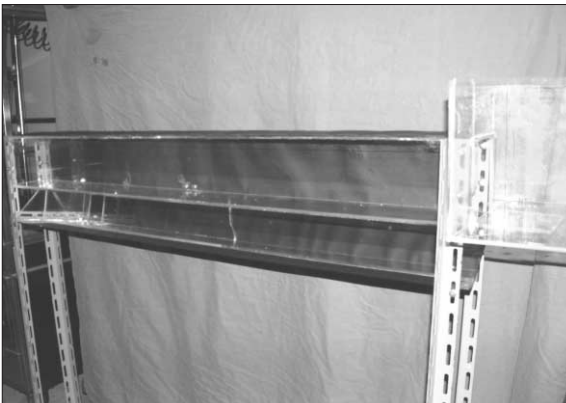


Fig. 5. Fabricated dynamic analyzer of walking tract.

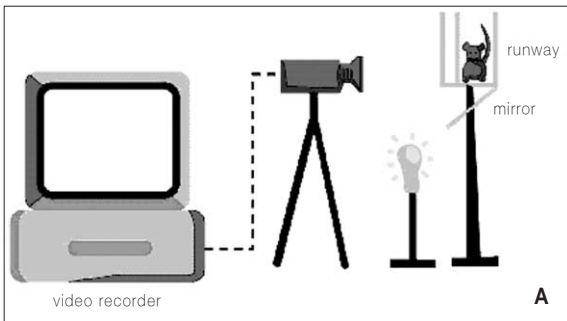
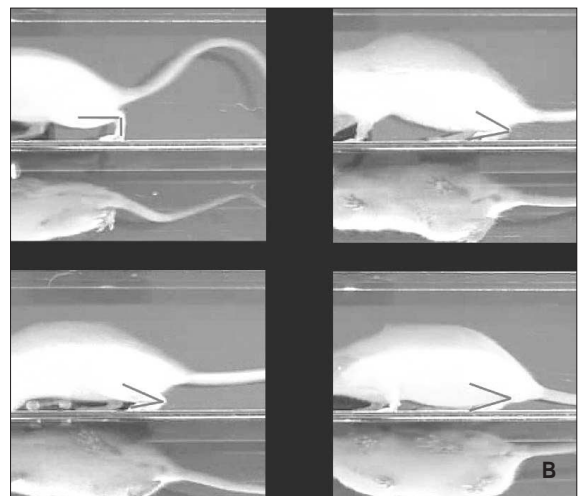


Fig. 6. Photograph showing steal image of the mid-stance phase of a step cycle ASA (the ankle joint angle measured at the mid-stance phase of the step cycle, formed by two lines, to the shank and another connecting the lateral malleolus and the head of the fourth metatarsal).

4.2. 발목 관절 보행각과 좌골신경 기능지수를 이용한 기능 평가 (Functional assessment by using angle stance angle [ASA] and SFI)

이식후 12주에 실험군 2마리, 대조군 3마리 및 정상비교군 2마리의 모든 실험 동물에서 주행로 분석 (walking track analysis)을 시행하였는데, 저자등이 고안한 백서의 주행로 분석기를 사용하였다 (Fig. 5). 주행로 분석기에서는 비디오 촬영이 가능하여 역동적인 기능검사를 시행할 수 있는데, 실험동물의 주행모습이 3차원적으로 비교되기 때문에 한번에 쉽게 기능검사를 시행할수 있었으나 동영상 이미지를 본 논문에 추가할 수는 없었다. 따라서, 고해상도의 비디오 분석기를 개인컴퓨터에 연결하여 역동적인 보행 모습을 관찰한 후에, 컴퓨터에 연결된 비디오에서는 Scion Image® (Scion Co., USA) 프로그램을 이용하여 화면을 순간적으로 포착하여 디지털 이미지를 얻도록 하였다 (Fig. 6-a). 여러 보행 지수 중에서 예민도와 재현성이 우수한 발목관절 보행각 (ankle stance angle [ASA])값을 측정하였는데,^{8,15,16} 발목관절 보행각은 보행중간 단계 (mid-stance phase of the step cycle)에서, 하지 선 (shank line) 및 4번째 족부 골 (head of the fourth metatarsal)과 발목 (lateral malleolus)이 이루는 선이 이루는 각도로 측정할 수 있으며 (Fig. 6-b), 바닥에서 처음 뛰기 시작한 보행 (first began to walk) 및 중간에 멈춰선 (stopped walking) 경우는 제외하였고 매 개체마다 세 번의 측정값의 평균치를 구하였다. 이처럼 보행 및 주행 검사 값은 모두 3회 이상씩 측정하여 엑셀 프로그램® (Microsoft(R) Excel 2000, USA)을 이용하여 각각의 평균값 및 표준편차 값을 구하였다.

좌골신경 기능지수(Sciatic function index, SFI)를 얻기 위해 백서의 뒷 족부 (hind feet)에 잉크를 묻히고 80 × 10 cm 길이의 어



두운 주행로를 걷게 해서 다음과 같이 4가지 길이를 확인하였다 (Fig. 7).

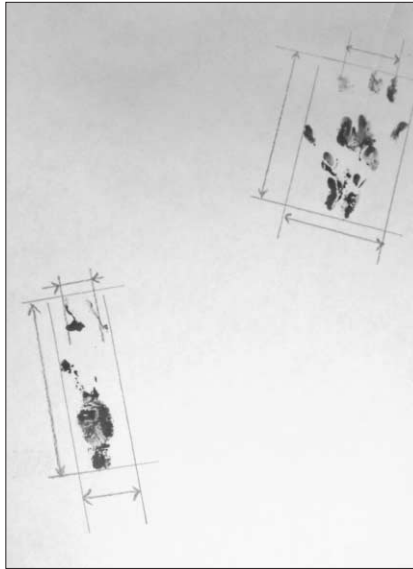


Fig. 7. Measured details of sciatic function index, SFI (TS [Toe Spread]: the distance between first and fifth toes, IT [Intermediate Toe spread]: the distance between the second and fourth toes, PL [Print length]: the distance between the third toe and the hind pad, TOF, the orthogonal distance from the third toe of one paw to the hind pad of the contra lateral paw).

TS (Toe Spread): the distance between first and fifth toes, IT (Intermediate Toe spread): the distance between the second and fourth toes, PL (Print length): the distance between the third toe and the hind pad, TOF, the orthogonal distance from the third toe of one paw to the hind pad of the contra lateral paw^{8,17,18}).

이 중 TOF 측정은 3-4 차례 반복하여 평균값을 구하였으며, 모든 측정값은 수술하지 않은 오른쪽 [NTS, NIT and NPL]과 수술한 부위인 왼쪽 (operated foot [ETS, EIT and EPL])에 대해서 구하였고, 이렇게 구한 측정값은 좌골신경 기능 지수를 구하기 위해 아래와 같은 식에 대입하였다.

$$SFI = (-38.3 \times PLF) + (109.5 \times TSF) + (13.3 \times ITF) - 8.8$$

$$PLF = (EPL - NPL) / NPL, TSF = (ETS - NTS) / NTS, ITF = (EIT - NIT) / NIT$$

이때 정상인 백서에서 구한 기능 지수 (interpolating identical values) 값은 0에 가깝게 나오게 된다.

5. 통계 분석

수초화 정도 및 축삭돌기수의 평가와 위의 여러 기능검사에서 얻어진 모든 정량적인 결과는 통계 프로그램 (SPSS R10.0.7, SPSS Inc.)의 Student's t-test를 이용하여 유의성을 검증하였으며, 각 군간의 비교정량적 차이 (semiquantitative differences)를 비교하기 위해 Mann-Whitney U-test를 이용했다. 유의 수준은 5%로 p-value는 0.05보다 작은 것만을 유의성 있는 것으로 택하였다.

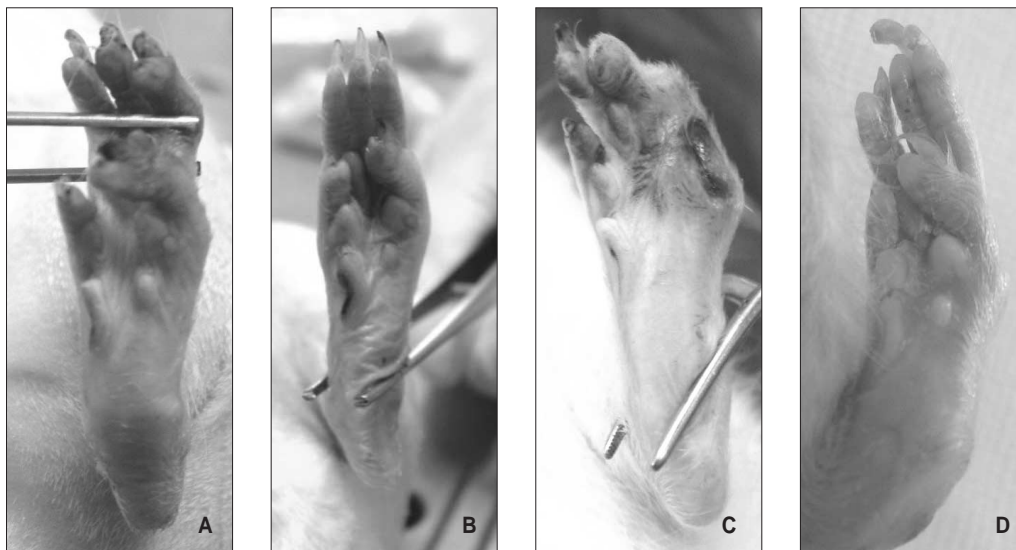


Fig. 8. Gross evaluation of auto-mutilation after 12 weeks.
 a. no auto-mutilation of sham group (n=2)
 b. mild auto-mutilation of experimental group (n=2)
 c. moderate auto-mutilation of control group (n=2)
 d. severe auto-mutilation of control group (n=1)

Ⅲ. 결 과

1. 족부 및 주변 근육의 기능상태에 대한 육안적 평가

12주 경과후 자가 손상 (auto-mutilation)된 족부를 육안적으로 평가하여 회복된 감각신경 정도를 간접적으로 확인할 수 있었는데, 정도에 따라 없거나 (no auto-mutilation), 경미 (mild), 중간 (moderate) 및 심한 (severe)정도로 구분하였다 (Fig. 8). 정상비교군은 모두 자가손상이 없었으며, 실험군에서는 모두 경미한 손상이 관찰되었으나, 대조군인 실리콘 도관 이식군에서는 중간정도의 손상 및 한마리에서는 심한 자가손상이 관찰되었다.

2. H&E 및 Masson-Trichrom, LFB 염색에 의한 평가

이식후 4주, 8주 및 12주후 각각 실험군의 신경도관의 중심부를 절단하여 평가한 결과 재생된 신경다발이 시간이 지날수록 보다 두터워진 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 9-11). 특히 셀룰로

오스막의 내면에서만 재생된 신경다발이 관찰되었으며 신경 세포와 축삭 돌기의 성장이 보였고, 외면에서는 미세한 섬유 조직의 결합 이외에 어떠한 조직 재생도 관찰되지 않았다. 수 초화된 축삭돌기 섬유들도 LFB염색에서 강한 양성 반응을 보였으며, 신경 섬유들은 거의 대부분 분홍빛이나 보라색으로 cresyl violet 염색 반응을 보였는데 (Fig. 9-c,10-c), 특히 12주 경과된 조직에서 명확히 관찰되었다 (Fig. 11-c).

기존의 다른 신경도관 이식 후 관찰되었던 소견과의 가장 큰 차이점으로는 셀룰로오스막과 긴밀히 인접하여 조직들이 재생되는 소견으로 이는 4주 경과 후부터 뚜렷하였으며 12주 소견에서의 고배율 소견에서 보다 명확히 관찰되었다. 반면 실리콘 도관을 이식한 대조군의 12주 경과 후 단면에서는 도관의 주변부에 덩어리진 조직 재생이 관찰되었는데 이는 실험군의 재생된 조직과 비교하여 성긴 모습으로 신경 세포 및 다른 세포들의 수나 주변 세포외기질의 생성에 있어서도 훨씬 떨어지는 모습이었다 (Fig. 12).



Fig. 9. Photomicrographs of cross section in the mid-portion of nerve conduit after 4 weeks in the experimental group (×200).
a. Photomicrograph of H&E staining
b. Photomicrograph of MT staining
c. Photomicrograph axon and myelin LFB staining



Fig. 10. Photomicrographs of cross section in the mid-portion of nerve conduit after 8 weeks in the experimental group (×200).
a. Photomicrograph of H&E staining
b. Photomicrograph of MT staining
c. Photomicrograph axon and myelin LFB staining



Fig. 11. Photomicrographs of cross section in the mid-portion of nerve conduit after 12 weeks in the experimental group ($\times 400$).

- a. Photomicrograph of H&E staining
- b. Photomicrograph of MT staining
- c. Photomicrograph axon and myelin LFB staining

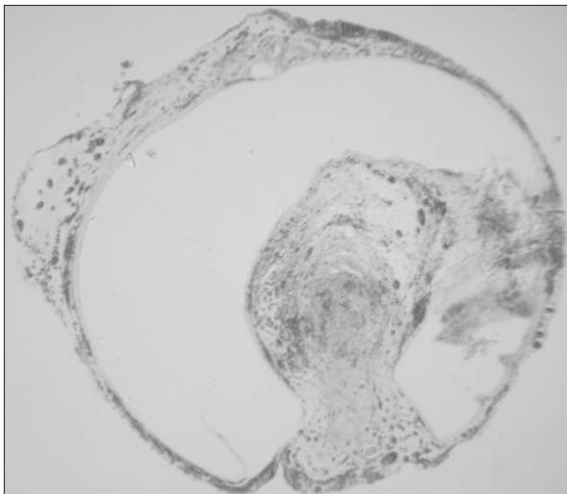


Fig. 12. Photomicrographs of cross-sectional view in the mid-portion of nerve conduit, in the control group (H&E staining, $\times 200$).

3. Toluidine blue 염색에 의한 수초화 정도 및 축삭 돌기 수 평가

전자현미경 검사를 위한 절편을 만들기 위해 시행한 toluidine blue 염색상에서 재생된 축삭돌기의 수와 수초화된 정도를 평가하였다. 이 시편들은 모두 12주 경과 후 각각의 군에서 신경도관 중심부를 자른 절편에서 얻어 비교하였다 (Fig. 13).

전체 축삭돌기 수에서 통계적 유의성이 관찰되었으며 (Table 1), 실험군에서 41.59%의 수초화된 축삭돌기가 관찰되었다. 정상비교군의 단면에서는 반흔 조직 없이 정상적인 신경외피(perineurium)들도 관찰되었는데 (Fig. 13-a), 상대적으로 실험군의 신경외피는 약간 변형된 모습을 보였고 (Fig. 13-b), 대조군에서는 많이 변형된 모습을 보였다 (Fig. 13-c). 신경내 혈관들도 정상비교군에 비해 실험군, 대조군에서는 각각 적은 수가 관찰되었고 크기도 작았다.

정상비교군에서의 전체 축삭돌기의 수와 수초화된 축삭돌기 및 비수초화 축삭돌기의 수가 기준이 되어 실험군 및 대조군의 수를 산정하였는데, 실험군의 전체 축삭돌기의 수가 420 ± 32.4 개임에 비해 대조군의 축삭돌기의 수는 250 ± 22.4 개로 두배가 약간 안될 정도로 실험군에서의 수가 많았다. 그러나, 실험군과 정상비교군과의 비교에서는 49.41%의 정도 밖에 되지 않음으로서 신경도관으로서의 한계점을 확인할 수 있었다 (Table 1).

수초화 지수 (Myelination index [MI]) 는 수초화된 정도를 전체 축삭돌기의 수에 대한 비율 (ratio of myelin to axon surface area) 로 정의할 수 있는데, 대조군과 실험군에서의 수초화 지수는 각각 0.172, 0.447로서 상대적으로 실험군에서 세배 가까이 큰 수초화 정도를 보여 주었다.

4. 주사전자현미경 평가

전자현미경 소견에서는 정상비교군의 좌골 신경 단면들은 슈반세포와 세포외기질들이 균일하게 배열된 잘 수초화된 신경섬유들로 채워져 있었으며 (Fig. 14-a), 실험군에서는 비교적 덜 균일화 (disorganized)되고 상대적으로 많은 세포외기질들이 관찰되었으며 정상비교군에 비해 슈반세포들의 크기가 작고 수초화 정도도 얇게 이루어진 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 14-b). 대조군에서는 수초화 정도가 보다 얇거나 미약하였으며 상대적으로 많은 반흔 조직과 염증세포들이 관찰되었으며 신경세포들의 수도 적음을 알 수 있었다 (Fig. 14-c).

5. 주행로 분석 및 보행 분석을 통한 기능 평가

이식 12주 제 측정된 좌골신경지수는 실험군에서 -47.2 ± 3.9 (n=2), 대조군에서 -80.4 ± 7.4 (n=3)로 실험군에서 기능 회복이 양호한 것처럼 보였으나 통계적으로 유의성은 없었으며, 모두 정상비교군의 18.0 ± 9.2 (n=2)에 비해 현저히 낮은 수치를 보였다 (Table 2).

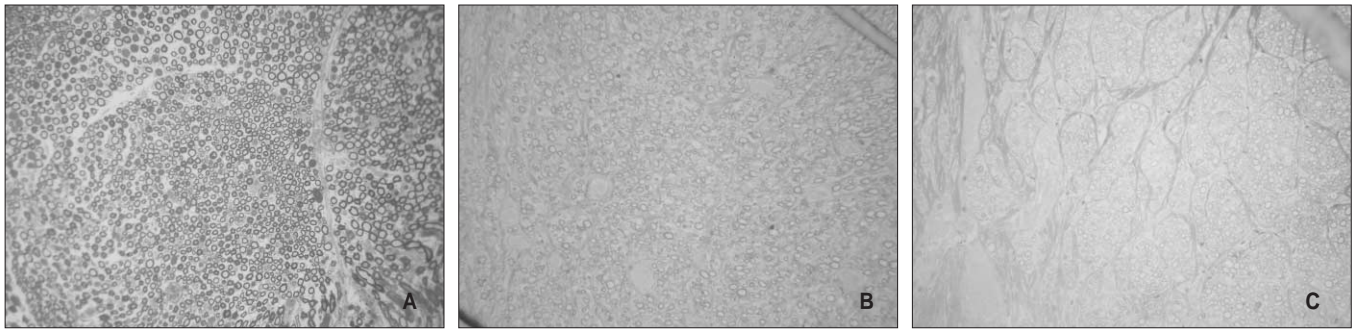


Fig. 13. Photomicrographs of cross-sectional view of axon and myelin in the mid-portion of nerve conduit (toluidine blue stained, $\times 200$).

- a. Photomicrograph in sham group
- b. Photomicrograph in experimental group
- c. Photomicrograph in control group

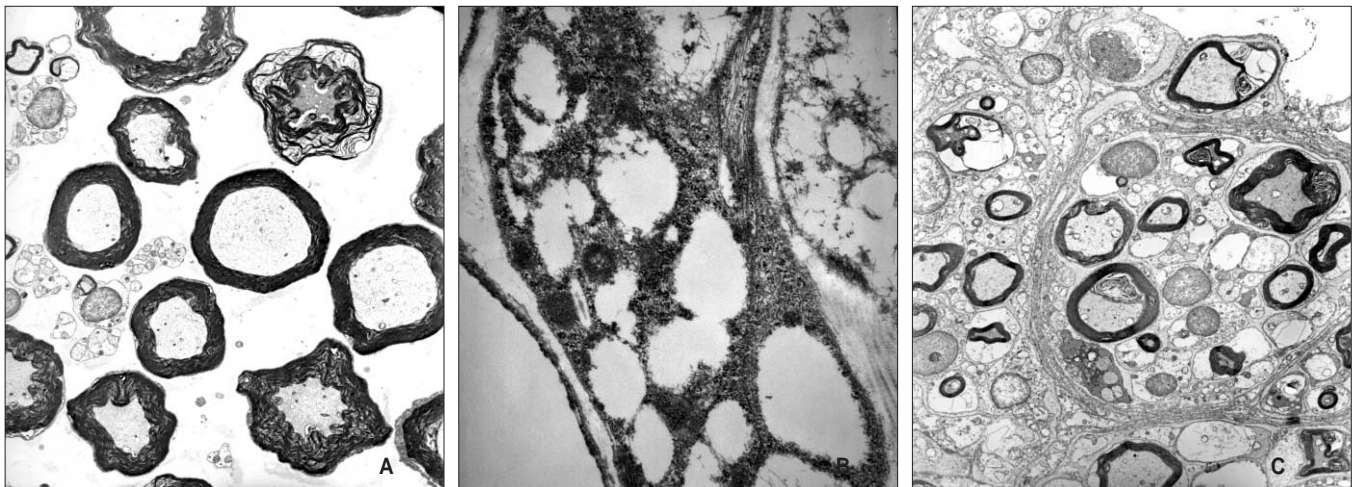


Fig. 14. Transmission electron photomicrographs of cross section in the mid-portion of nerve conduit ($\times 3,000$).

- a. Photomicrograph showing well myelinated fibers aligned with Schwann cells and extracellular collagen matrix in sham group
- b. Photomicrograph showing small numbers of axons with thin disorganized myelinated fibers in the experimental group
- c. Photomicrograph showing small myelinated fibers with many inflammatory cells in the control group

Table 1. Comparisons of axon counts

	Total axons	Myelinated axons	Unmyelinated axons
Sham	850 \pm 47.2	452 \pm 38.4	332 \pm 35.9
Control	250 \pm 22.4 (29.40%)	43 \pm 3.2 (9.51%)	146 \pm 14.5
Experimental	420 \pm 32.4 (49.41%)	188 \pm 7.4 (41.59%)	214 \pm 15.4

All data were counted using an image analyzer (ImageTool[®]) and significant ($p < 0.05$).

The % calculation was the ratio to sham group count.

Uncleared myelinated axons were all excluded to the each counts.

Table 2. Comparison of Sciatic Function Index (SFI) and Ankle Stance Angle (ASA) after 12 weeks

	SFI	ASA (degrees[°])*
Sham	18.0±9.2	46.0±8.5
Control	-80.4±7.4	29.2±5.3
Experimental	-47.2±3.9	35.5±4.9

* p < 0.05

SFI = (-38.3 × PLF) + (109.5 × TSF) + (13.3 × ITF) - 8.8

PLF = (EPL-NPL)/NPL, TSF = (ETS-NTS)/NTS,

ITF = (EIT-NIT)/NIT

TS : Toe Spread, IT : Intermediate Toe spread,

PL : Print length, the operated foot : ETS, EIT and EPL,

non-operated foot : NTS, NIT and NPL

ASA : At the mid-stance phase of the step cycle, formed by two lines, one referring to the shank and another connecting the lateral malleolus and the head of the fourth metatarsal bone.

발목관절 보행각은 실험군에서 $35.5^\circ \pm 4.9^\circ$ (n=2), 조절군에서 $29.2^\circ \pm 5.3^\circ$ (n=3) 로 두 군간에 유의한 차이는 보였으나 역시 정상비교군의 $46.0^\circ \pm 8.5^\circ$ (n=2) 에 비해서는 현격한 차이를 보였다 (Table 2).

IV. 고 찰

멍게 및 미더덕의 피부각질에 대해서는 이전 예비연구에서 언급한 바 있으며, 셀룰로오스는 우리 주변에서 흔히 볼 수 있는 고분자 물질로서 많은 양의 셀룰로오스가 해마다 산림을 비롯한 식물계 및 채배 작물에 의해 만들어지고 이에 대한 개론 또한 지난 예비연구에서 보고한 바 있었다³⁾.

신경 도관으로 불려지는 신경 유도 채널 (nerve guidance channels)은 생물학적인 재료로 만들어져서 말초신경계 및 중추신경계의 재생을 돕게 되는데, 기존의 단순히 도관 역할을 해왔던 것과 달리 점차 축삭 돌기가 자라나고 반흔 조직이 적어지며 체액성 요소들 (humoral factors)이 많도록 재생되는 신경 주변 환경을 조절하는 역할이 최근에는 보다 중요시되어 왔다. 신경도관으로서 요구되는 생활성적 요소로는 적은 세포독성 반응 (cytotoxicity)과 이물작용 (foreign body reaction)을 가지는 생체친화성 (biocompatibility), 축삭돌기 성장과 슈반세포 활성을 도와주는 미세환경 (microenvironment)을 보존해주고, 적당한 생체분해성 (biodegradability)을 지니며 섬유모세포 (fibroblast) 및 반흔조직의 성장을 억제해주는 기능 등을 들 수 있다^{19,21)}.

최근 저자 등은 내경 1.98 mm 실리콘 도관 (Silicon elastomers [SE] conduit)을 사용해서 14 mm 길이의 신경 도관을 3/4 두께만 남도록 윗 부분을 자른 후, 매트릭셀[®]을 채우고 그 안에 3차원적으로 슈반 세포를 배양하여 배양시킨 도관을 보고한 바 있었다⁹⁾. 이외에도 최근 여러 문헌에서 슈반세포를 포함하거나

포함하지 않은 여러 신경도관의 유용성을 보고하고 있는데, 7 mm 간격을 슈반 세포를 넣은 다형성 폴리머 도관 (polymer foam conduits)으로 말초 신경 재생을 증진시킨 보고²²⁾와 슈반세포와 동시에 교세포성장인자 (glial growth factor)를 넣음으로서 역시 보다 나은 말초 신경 재생 효과를 가져왔다는 보고도 있었다²³⁾. 이런 여러 신경도관에 대한 연구에 준하여 셀룰로오스막의 신경재생효과를 확인하면서 동시에 조직내 안정성과 생활성 성질을 확인하기 위하여 관형 (tubular)이 아닌 비관형 (non-tubular)으로 셀룰로오스막을 도관으로 사용하게 되었다. 백서의 좌골신경결손이 10 mm 이상일 경우 실리콘 도관만에 의해서는 신경재생이 이루어질 수 없다는 보고가 널리 알려져 있기에 비관형 셀룰로오스막 도관을 기존의 실리콘 도관을 이식한 대조군과 비교하는 것이 기초적인 실험연구로서 가능하리라 사료되었다^{3,22,23)}.

본 연구에서 비관형 셀룰로오스막 도관 이식 4주, 8주 및 12주 후 각각 실험군의 신경도관의 중심부를 절단하여 평가한 결과 재생된 신경다발이 시간이 지날수록 보다 두터워진 것을 확인할 수 있었으며 (Fig. 9-11), 이는 특히 셀룰로오스막의 내면을 따라서만 신경다발의 재생이 관찰되었고, 신경세포와 축삭돌기의 성장이 보였다. 도관의 외면에서는 미세한 섬유조직의 결합 이외에 어떠한 조직 재생도 관찰되지 않았는데, 이는 물론 이식실험시 내면쪽으로 절단된 신경가닥을 봉합하였기 때문에 도관을 따라 재생이 이루어졌을 것으로 단순히 생각될 수 있다. 그러나, 기존의 다른 신경도관 이식후 관찰되었던 소견과의 가장 큰 차이점으로는 셀룰로오스막과 긴밀히 인접하여 조직들이 재생되는 소견이 보인 점으로 이는 이식 4주 후부터 뚜렷히 관찰되었으며, 12주 고배율 소견에서 보다 명확히 확인할 수 있었다. 반면 실리콘 도관을 이식한 대조군의 12주 경과후 단면에서는 도관의 주변부에 덩어리진 조직 재생이 관찰되었는데 이는 실험군의 재생된 조직과 비교하여 성긴 모습으로 신경 세포 및 다른 세포들의 수나 주변 세포외기질의 생성에 있어서도 훨씬 못미치는 결과를 보여주었다 (Fig. 12).

미더덕은 특이하게 다른 해양동물과 다른 피부 각질에 치밀한 beta-셀룰로오스 섬유질 구조를 지니며 다른 식물성 셀룰로오스와 유사하게 beta-1,4 linkage로 구성된다. 이전 예비실험³⁾에서 보고한 바와 같이 이러한 미더덕 피부 각질에서 얻은 셀룰로오스막은 외면과 내면으로 구분되어지며 외면은 비교적 거칠고 활택이 없는 특징을 지니며, 내면은 매우 질기고 활택이 있고 조직 내에서 쉽게 흡수되지 않으면서 새로운 혈관의 생성이나 골조직 형성을 일으킴을 확인할 수 있었다. 이처럼 셀룰로오스막의 내면은 외면에 비하여 신경조직과 같은 결체조직과 이들을 구성하는 세포들이 쉽게 융합될 수 있는 구조를 보인다고 이번 실험에서도 확인할 수 있었다^{24,25)}.

전통적으로 말초신경 재생을 위한 신경도관으로는 신경재생을 위한 영양분들을 함유할 수 있고, 섬유모세포의 증식을 억제할 수 있으며 축삭돌기의 일정방향 성장을 도모할 수 있다는 점에서 관형이 추천되어 왔다. 그러나, 신경재생에 필요한 영양 및 산소 공급을 도관 외부에서 받을 수 없는 불투과성

(impermeable) 도관의 한계점이 있어왔고, 이를 개선하기 위해 투과성 도관이나 도관의 표면 거칠기 (surface roughness)를 변화하거나, 전기적인 전하 (electrical charge)를 주거나 여러 신경영양 성분들을 직접 포함시키게 하는 등의 개발이 이루어져 왔다^{8,26)}. 또한, 체내에서 흡수되지 않는 신경도관이라면 궁극적으로 기능회복을 이루어진 후 제거되어야 하기 때문에 생체내 흡수될 수 있는 도관을 만들기 위한 노력이 계속되어왔다고 할수 있다. 따라서, 이러한 최근까지의 여러 문헌 보고와 저자 등의 실험에 근거한다면 향후 셀룰로오스막 신경도관을 이용한 말초신경 재생에 있어 보다 효과적인 결과를 얻을 수 있을 것이며, 그러기 위해서는 본 실험결과에서 도출한 생체친화적이고 슈반세포를 비롯한 여러 신경성장을 위한 영양인자를 공급해줄수 있는 형태로 비관형이 아닌 관형으로 도관을 제작하여야 할 것이며, 도관내에는 여러 다양한 세포외기질들을 넣어줌으로서 뉴런이나 슈반세포에서 나오는 여러 새로운 세포외기질 물질들이 신호 전달 과정을 조절하여 신경전달물질과 영양 인자들의 분화를 촉진하여 수초화된 축삭돌기들의 성장을 유도하도록 고안해야 할 것으로 사료되었다.

본 연구에서는 신경계 구조를 구분하기 위한 여러 조직학적 분석 중에서 수초를 구분하기 위한 방법중 하나인 LFB 염색을 시도하여 수초층은 푸른색으로, 다른 교섬유들이나 평활근 세포들과 세포핵들은 붉은 보라색으로 염색되도록 하였는데, LFB 염색법에서는 축삭 돌기와 결합 조직들은 염색되지 않고 남아있기도 하며, 콜라겐 덩어리와 같이 혼합되어 불규칙적으로도 보이는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 12주 경과 후 대조군보다 실험군에서 정상비교군에 비교적 가까운 염색 정도와 색상을 보였는데, 수초층을 형성하기 위한 분화된 슈반 세포들로부터 분비된 여러 인자들이 활발히 성장하였함을 설명해준다 하겠다. 12주 후 각 군의 신경 도관의 중간부 단면에서 재생 신경의 수초 및 축삭돌기 등을 평가한 결과, 혈관과 신경속의 분포가 대조군과 다를 수 있었고, 전체 축삭수 (total axon count)에서도 통계적인 유의성을 보였다 (Table 1). 전자현미경 소견에서는 정상비교군의 좌골 신경 단면들은 정상적인 신경중피 (perineurium)와 슈반세포와 세포외 콜라겐 기질들이 균일하게 배열된 잘 수초화된 신경 섬유들로 채워져 있었는데, 실험군에서는 신경중피가 약간 파괴되면서 비교적 덜 균일화되고 두터워진 세포외기질들과 작은 슈반 세포들이 많고, 얇게 수초화 신경 섬유들이 많이 관찰되었다. 비록 고해상도 관찰에서 잘 수초화된 축삭 돌기들이 비교적 풍부한 혈관들과 같이 관찰되었으나, 수초화 지수에서 확인된 바와 같이 실험군에서의 수초화된 축삭은 정상비교군의 수초화 정도에는 훨씬 미치지 못하였다.

일반적으로 말초신경 재생에 대한 조직병태학적 평가 (histopathologic evaluation) 이외에 기능 검사로서는 전기생리학적 검사 (electrophysiological measurement), 주행로 분석 (walking pattern analysis) 및 축삭기질 수송 (axoplasmic transport)에 대한 트레이서 분석 (tracer detective study) 등이 있다.

전기생리학적 검사에서는 크게 운동신경의 기능회복을 확

인하기 위한 복합근육활동전위 (CMAP, compound muscle action potentials)과 감각신경의 기능회복을 검사하기 위한 체성감각 유발전위 (SEP, somatosensory evoked potentials)로 나누어 시행하게 된다. 신경내의 탈수초화 (demyelination)는 세포골격 (cytoskeletal elements)에도 변화를 가져오게 되는데, 슈반세포 부족 (depletion)과 저형성된 수초 (poor myelination)들로 축삭의 전송 신호가 느려지거나 감소되어 정상 신경들보다 감각신경 기능 회복이 현저히 낮아지게 된다.²⁷⁾ 본 연구에서도 체성감각 유발전위를 비교하기 위하여 12주 경과 뒤 시도하였으나, 전극의 정확한 위치를 잡기가 어렵고 실험동물의 마취 상태를 일정하게 유지하지 못하여 유의성있는 결과를 얻는데는 실패하였다. 이에 대신하여 족부의 자해 정도 (auto-mutilation)를 관찰하는 것으로 감각신경의 재생 여부를 확인하였는데, 이에 대한 보다 정확하고 재현성있는 검사방법이 요구된다 하겠다.

다른 기능검사로 주행로 분석을 주로 시행하였는데, 저자 등이 고안한 역동적인 보행 분석기 (dynamic gait analysis tester)를 이용하여 백서의 보다 역동적인 주행 형태 (kinematic gait pattern)를 평가하였다. 이는 보다 정량적이며 재현성있는 쉬운 평가법으로 비디오 및 컴퓨터 분석 프로그램을 이용하여 쉽게 분석할수 있는 장점이 있다. 일반적으로 걸음속도 (walking speed), 보행 및 디딜 때의 폭 (stance and swing phases), 걸음길이 (step length), 발목관절의 보행각 (angle of the ankle joint), 최종 보행시 꼬리의 높이 (tail height at terminal stance) 및 변위 (tail deviation at terminal stance)와 또한, 디딜중의 정중 변위 (midline deviation at midswing) 등과 같은 보행시 일어날 수 있는 변수들의 값을 구하게 된다^{15,28)}. 이 중에서 가장 재현적이고 신뢰할수 있는 측정값으로 판단된 발목관절 각도 값을 구하였는데, 이전 문헌에서 보고된 값을 참고하면 정상 백서의 값은 $50^{\circ} \pm 6^{\circ}$ 이고, 자가 신경 이식을 시행한 군에서는 4개월 뒤 $36^{\circ} \pm 6^{\circ}$, 신경 이식을 하지 않은 군에서는 4개월 뒤 $22^{\circ} \pm 7^{\circ}$ 였다^{28,30)}. 발목관절 보행 각도는 보행중간 단계 (mid-stance phase of the gait cycle)에서, 하지 선 (shank line) 및 4번째 족부골 (head of the fourth metatarsal)과 발목 (lateral malleolus)이 이루는 선이 이루는 각도로서, 큰 값은 발목과 발바닥인 기저부의 신전이 보다 큰 것을 의미한다. 보행 경로 중 바닥에서 처음 띄기 시작한 보행 (first began to walk) 및 중간에 멈춰선 (stopped walking) 경우는 제외하였으며, 매 개체마다 세 번씩 측정하여 이들의 평균값을 구하였다.

다른 주행로 분석으로 족흔 분석 (footprint analysis)도 시행하였는데, 좌골신경 기능지수는 De Medinaceli 등¹⁵⁾에 의해 처음 소개되었고, 이후에도 좌골 신경의 운동 기능을 평가하기 위한 연구 방법으로 많이 사용되어 왔다^{15,17,18)}. 본 연구에서 12주 뒤 측정된 좌골 신경 기능 지수는 실험군에서 -47.2 ± 3.9 (n=2), 대조군에서 -80.4 ± 7.4 (n=3)로 실험군에서 보다 우수한 결과를 보였는데, 측정이 정확하지 않은 족흔을 가지고 평가한 것인데다가 개체수가 적어서 통계적으로 유의성은 발견할 수 없었다. 이런 족흔 분석법은 상대적으로 준비하기가 어렵고 족흔을 얻는 과정에서 재현성이 부족하며 좌골 신경 기능 지수 계

산법이 쉽지 않고 시간도 많이 걸리는 데다가, 무엇보다도 어두운 주행로는 보다 정성적인 주행 형태에 대한 분석을 어렵게 하여 그다지 좋은 기능검사법은 아닌 것으로 사료된다.

이전 예비연구에서 멧게와 미더덕의 셀룰로오스를 고압과 고온에서 처리한 경우 소량의 아미노산이 용해되어짐을 관찰하였으며, SEM 관찰과 조직내 생체 반응에 대한 조직학적 및 면역조직화학적 현미경 관찰에서 멧게와 미더덕의 내면의 셀룰로오스 각질에서 외면보다는 생활성화 물질이 잔존되어 있음을 확인한바 있었다. 이 생활성화 물질은 0.01% 이하의 길이가 짧은 펩타이드 종류로서 최근 몇 년사이 해양학 관련된 연구논문에서는 클라바닌 (clavanins)과 스티엘린 (styelins) 등과 같은 항균작용을 가지는 펩타이드가 미더덕의 혈액세포 (hemocytes)에 존재하며 이들의 많은 기능에 대해 보고되고 있었는데 이와 연관지어 고찰되어야 할 것으로 생각된다.

클라바닌은 히스티딘이 풍부한 23개 잔기 (histidine-rich 23 residues)의 알파헬리컬 항균 펩타이드 (α -helical antimicrobial peptide)로서 미더덕의 혈액세포에서 주로 분리추출된다. 아래에서 설명되는 스티엘린과 같이 미더덕과 같은 피낭구조 해양생물 (tunicates)의 자연면역체계 (innate immune system)를 구성하는 주 항균펩타이드로서 여러 기능과 다양한 추출세포들이 발견되어 있다³¹⁻³⁴. 스티엘린은 히드록시리신 잔기 (hydroxylysine residues)를 가지며 페닐알라닌 (phenylalanine)이 풍부한 32개의 아미노산 잔기로서 클라바닌이 pH 5.5에서만 적절한 항균작용을 지님에 비해 다양한 산도에서 살균력을 가지는 것으로 알려져 있다^{35,36}.

여러 부착물질 (Adhesion molecules)을 함유하는 슈반세포 및 신경세포의 수를 늘리기 위해서는 플라스민에 예민한 펩타이드 (plmsin-sensitive peptide)들이 교차결합되는 구조가 중요할 것이며 이러한 구조에 의해 여러 신경재생 물질들이 활동할 수 있는 범위나 공간이 확보될 수 있다³⁷. 이 중에서 N-CAM, L1 및 N-cadherin 등의 부착물질들이 슈반세포와 여러 축삭돌기 간의 상호작용을 증대하며 슈반세포의 표면에서 축삭 성장을 유도 (axonal guidance)하는 것으로 알려져 있다. 저자 등이 연구한 바 있는 3차원 슈반세포를 세포외기질에서 배양할 경우 신경재생이 촉진된 이유도 이러한 점을 고안한 것인데,⁸ 이처럼 신경재생에서 중요한 세포외기질과 더불어 도관자체의 밀도 (conduit density), 도관내 분비 단백질, 도관을 구성하는 주세포의 농도 및 분비하는 요소들에 의해 도관을 따라 재생되는 신경의 형태 및 재생 방향 등이 결정된다 하겠다. 이처럼 미더덕 유래 셀룰로오스막은 작은 게놈 크기 때문에 발육과 진화에서 많은 유전자적 연구결과가 보고되고 있는데, 위와 같이 살펴본 여러 단백질들의 상호 작용에 의한 신경 재생의 촉진 가능성과 아울러 아직까지 알려지지 않은 어떤 다른 신경재생 인자를 분비하거나 촉진시키는 물질에 의해 생활성적인 신경재생이 이루어졌을 것으로 미루어 짐작하게 한다.

미더덕 각질의 다른 단백질로 내측핵막과 주변 크로마틴 사이에 위치하는 필라멘트형 구조의 핵형 라미나 (nuclear lamina)로 이루어진 라민 (lamins)이 있는데, 이는 후생동물 (metazoa)의

필수단백질로 알려져 있다. 이는 중간필라멘트 (intermediate filament) 단백질의 4형 구조물로서 라민의 주요 기능은 간기 크로마틴 (interphase chromatin)과 분열기 크로모솜 (mitotic chromosomes)에 붙을 수 있어서 후전사 변형 (post-translationally modified)된 CaaX 박스를 통하여 인지질기 (phospholipids)로 특이한 DNA 서열을 삽입하는 역할을 한다^{38,39}. 전술한 미더덕 유래 셀룰로오스막에는 여러 항균 단백질과 라민층이 풍부하며 연관하여 중성구 (neutrophils)의 역할 및 활성화도 클 것임을 미루어 예측할 수 있다³⁸. 중성구들의 활성화 정도에 따라 기존의 슈반세포의 운동성 (motility)이 증가하며, 이는 용해성 중성조절물질 (soluble neuregulin)이나 슈반세포 분열물질 (mitogen)의 활동을 증가시켜 지속적인 용해성 라민 (soluble laminin)의 역할도 증가시키게 된다⁴⁰. 특히, 이 중에서 TGF β 군의 역할은 최근에 각광받는 연구분야로 인테그린을 활성화시키고 N-CAM이나 L1 등이 발현을 증가시키며 신경재생물질들의 연결성을 촉진시키는 형태 변화를 유도하는 것으로 보고되고 있다⁴¹. 셀룰로오스 파이버들의 미세한 연결 구조에는 이와 같은 여러 종류의 인테그린이 다른 파이버들의 결합을 강하게 잡아주는 역할을 하기 때문에 이와 같은 연구분야도 향후 본 셀룰로오스막 신경도관의 역할을 규명하기 위해 보다 심도있게 진행되어야 할 것으로 사료된다.

이전 보고와 같이 셀룰로오스막은 μm 이하 단위의 다공성 (porous)을 지니며 강한 교차결합 (cross linking)의 당단백질 (glycocalyx)이 여러 미세한 셀룰로오스 파이버들을 유지해주는 구조로 되어있다³. 이러한 파이버들과 당단백질 사이에 인위로 처리한 소량의 칼슘이온이 존재하여 창상 치유 목적으로 사용되어온 칼슘 성분의 효과를 볼 수 있었을 것으로 생각된다. 말초신경 손상시 손상된 축삭돌기의 원심부는 변성 (degenerated)되기 시작하나 슈반세포와 기저막 (basal lamina)은 그대로 남게 되어 이 Buengner bands라 불리는 기저막을 통해 슈반세포가 성장하여 새로운 신경관이나 축삭을 만들게 되는데, 이러한 과정이 셀룰로오스막을 사용하였을 때 초기단계에서 이루어 지리라 예상된다. 실제로 본 실험 결과에서도 수초화된 축삭돌기 섬유들이 이식후 4주 후부터 LFB염색에서 강한 양성 반응을 보였으며, 신경 섬유들은 거의 대부분 분홍빛이나 보라색으로 cresyl violet 염색 반응을 보였는데 (Fig. 9), 특히 12주 경과된 조직에서 명확히 관찰되어 이러한 예상을 뒷받침 한다²⁹.

여러문헌에서 보고된 바와 같이 말초신경 재생은 여러 신경영양 인자 (neurotrophic factors)를 포함하는 세포외기질 단백질과 신경관련 세포나 슈반세포와 같은 세포 성분간의 상호 작용에 의해 이루어지게 되며, 손상된 말초신경의 재생장을 위해 반드시 필요한 것중 하나가 슈반세포인데, 이 슈반세포는 절대적으로 많은 세포 수에 의존하게 된다. 신경성장인자 (Nerve growth factor), 뇌기원신경성영양인자 (brain-derived neurotrophic factor), 섬모신경성영양인자 (ciliary neurotrophic factor) 등이 대표적인 신경영양 인자들이며, 따라서, 양적으로 많은 슈반세포들이 미세한 셀룰로오스 섬유소들 사이에서 접촉성 성장 및 분열을 계속하는데 도움이 될 것이며, 특히, 4주 경과

된 조직조건에서 알수 있듯이 초기 신경 재생시 절단된 축삭의 공간에서 세포분열을 시작하여 필요한 환경을 조성할 수 있을 것으로 짐작된다^{5,42}. 최근에 보고된 신경도관중에서 알지네이트 도관 (alginate conduit)이 있는데, 이 도관에서는 칼슘 이온의 교차 결합이 신경재생에 중요한 역할을 하는 것으로 설명하고 있다. 이에, 기존의 셀룰로오스막에 존재하는 칼슘 이온의 적절한 농도와 노출 정도를 고안할 수 있다면 신경도관으로서의 기능을 보다 촉진할 수 있을 것이다⁴³.

이상과 같이 천연생물인 미더덕의 셀룰로오스 각질이 창상이나 화상 등의 피부 상처의 치유 촉진을 위한 보호막의 소재로 사용할 수 있으며, 아울러 골절치료나 골성형을 위한 골형성 촉진 유도막의 소재로 사용할 수 있다는 점에 착안하여 말초신경 재생을 위한 신경도관으로서의 기능을 확인하였다. 이에 앞으로 보다 다양한 시도와 반복 연구를 통해 지속적인 임상적 적용까지도 시도할 수 있는 가치가 있을 것으로 판단되었다.

V. 결 론

해양 생명체 중에서 가격이 저렴하고 쉽게 구할 수 있는 미더덕의 피부 각질을 본 연구진의 처리 방법을 거쳐 0.2 mm 이 내의 연마된 얇은 셀룰로오스 막을 제조하였으며 이 막을 비관형 신경도관으로 활용하여 백서 좌골신경 결손 모델을 이용해 신경 도관의 재생 능력을 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 12주 경과후 족부 및 주변 근육의 기능상태에 대한 육안적 평가에서 정상비교군은 모두 자가손상이 없었으며, 실험군에서는 모두 경미한 손상이 관찰되었으나, 대조군인 실리콘 도관 이식군에서는 중간정도의 손상 및 한마리에서는 심한 자가손상이 관찰되었다.
2. 이식후 4주, 8주 및 12주후 각각 실험군의 신경도관의 중심부를 절단하여 평가한 결과 재생된 신경다발이 시간이 지날수록 보다 두터워진 것을 확인할 수 있었다. 특히 셀룰로오스막의 내면에서만 재생된 신경다발이 관찰되었으며 신경세포와 축삭돌기의 성장이 보였고, 외면에서는 미세한 섬유조직의 결합 이외에 어떠한 조직 재생은 관찰되지 않았다.
3. 수초화된 축삭돌기 섬유들도 LFB염색에서 강한 양성 반응을 보였으며, 신경 섬유들은 거의 대부분 분홍빛이나 보라색으로 cresyl violet 염색 반응을 보였는데, 특히 12주 경과된 조직에서 명확히 관찰되었다.
4. 전체 축삭돌기 수에서 통계적 유의성이 관찰되었으며 실험군에서 41.59%의 수초화된 축삭돌기가 관찰되었다. 정상비교군의 단면에서는 반흔 조직 없이 정상적인 신경외피들도 관찰되었는데, 상대적으로 실험군의 신경외피는 약간 변형된 모습을 보였고 대조군에서는 많이 변형된 모습을 보였다.
5. 수초화 지수 (Myelination index [MI])도 대조군 및 실험군에

서 각각 0.172, 0.447 로서 상대적으로 실험군에서 세배 가까이 큰 수초화 정도를 보였다.

6. 주사전자현미경 평가에서는 정상비교군의 좌골 신경 단면들은 슈반세포와 세포외기질들이 균일하게 배열된 잘 수초화된 신경섬유들로 채워져 있었으며, 실험군에서는 비교적 덜 균일화되고 상대적으로 많은 세포외기질들이 관찰되었으며 정상비교군에 비해 슈반세포들의 크기가 작고 수초화 정도도 얇게 이루어진 것을 관찰할 수 있었다.
7. 좌골신경 기능 지수 (SFI [standard sciatic function index])는 12주 뒤, 실험군에서 -47.2 ± 3.9 (n=2)로서 대조군의 -80.4 ± 7.4 (n=3)보다 증가된 값을 보였으나 통계적 유의성은 없었다.
8. 발목관절 각도 (ASA [ankle stance angle])도 실험군에서 $35.5^\circ \pm 4.9^\circ$ (n=2)를 보여서 대조군의 $29.2^\circ \pm 5.3^\circ$ (n=3) 보다 우수하였다.

이상의 본 결과에서 생체 친화성 유도막이라 조심스럽게 명명할 수 있으리만큼 셀룰로오스막 도관의 내면을 따라 축삭돌기가 재생되었고 많은 슈반 세포가 증식한 것을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. Brett CT: Cellulose microfibrils in plants: Biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall. *International Review of Cytology* 2000;199:161-199.
2. Kroon-Batenburg LM, Kroon J: The crystal and molecular structures of cellulose I and II. *Glycoconjugate J* 1997;14:677-690.
3. Kim SM, Lee JH, Jo JA, Lee SC, Lee SK: Development of a bioactive cellulose membrane from sea suirt skin for bone regeneration-a preliminary research. *J Kor Oral Maxillofac Surg* 2005;31:440-453.
4. Hadlock TA, Sundback CA, Hunter DA, Vacanti JP, Cheney ML: A new artificial nerve graft containing rolled schwann cell monolayers. *Microsurg* 2001;21:96-101.
5. Bryan DJ, Wang KK, Chakalis-Haley DP: Effect of schwann cells in the enhancement of peripheral-nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg* 1996;12:439-446.
6. Tseng CY, Hu G, Ambron RT, Chiu DT: Histologic analysis of Schwann cell migration and peripheral nerve regeneration in the autogenous venous nerve conduit (ANVC). *J Reconstr Microsurg* 2003;19:331-340.
7. Koshimune M, Takamatsu K, Nakatsuka H, Inui K, Yamano Y, Ikada Y: Creating bioabsorbable Schwann cell coated conduits through tissue engineering. *Biomed Mater Eng* 2003;13:223-229.
8. Kim SM, Lee JH: Peripheral nerve regeneration using a three-dimensionally cultured schwann cell conduit. *J Kor Oral Maxillofac Surg* 2004;30:1-16.
9. Evans GRD, Brandt K, Katz S, Chauvin P, Otto L, Bogle M, Wang B, Meszlenyi RK, Lu L, Mikos AG, Patrick CW: Bioactive poly(L-lactic acid) conduits seeded with Schwann cells for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 2002;23:841-848.
10. Toriumi DM, Woolford TJ, Teitlebaum B: Growth factors in nerve regeneration. *Fac Plas Surg Clin Nor Am* 1995;3:287-300.
11. Ahmed Z, Underwood S, Brown RA: Nerve guide material made from fibronectin: assessment of in vitro properties. *Tissue Eng* 2003;9:219-231.
12. Terris DJ, Cheng ET, Utley DS, Tarn DM, Ho PR, Verity AN: Functional recovery following nerve injury and repair by silicon tubulization: comparison of laminin-fibronectin, dialyzed plasma, collagen gel, and phosphate buffered solution. *Auris Nasus Larynx* 1999;26:117-122.

13. Kluver H, Barrera E: A method for the combined staining of cells and fibers in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 1953;12:400-403.
14. Clasen RA, Simon RG, Scott R, Pandolfi S, Laing I, Lesak A: The staining of the myelin sheath by Luxol dye techniques. *J Neuropathol Exp Neurol* 1973;32:271-283.
15. Dijkstra JR, Meek MF, Robinson PH, Gramsbergen A: Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. *J Neurosci Methods* 2000;96:89-96.
16. Varejao ASP, Cabrita AM, Patricio JA, Bulas-Cruz J, Gabriel RC, Melo-Pinto P, Couto PA, Meek MF: Functional assessment of peripheral nerve recovery in the rat: gait kinematics. *Microsurg* 2001;21:383-388.
17. De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ: An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol* 1982;77:634-643.
18. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA: Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1989;83:129-136.
19. Lee JH, Hwang SJ, Choi WJ, Kim SM, Kim NY, Ahn KM, Myung H, Seo BM, Choi JY, Choung PH, Kim MJ, Kim HM, Park KP, Kim JS: Development of microporous calcium phosphate coated nerve conduit for peripheral nerve repair. *J Kor Oral Maxillofac Surg* 2003;29:151-156.
20. Valenti RF, Aebischer P: Strategies for the engineering of peripheral nervous tissue regeneration, in Lanza RP, Langer R, Chick WL.(eds): Principles of tissue engineering. Austin:Academic Press, 1997:678.
21. Dahlin LB, Lundborg G: Use of tubes in peripheral nerve repair. *Neurosurg Clin N Am* 2001;12:341-352.
22. Hadlock T, Sundback C, Hunter D, Cheney M, Vacanti JP: A polymer foam conduit seeded with Schwann cells promotes guided peripheral nerve regeneration. *Tissue Eng* 2000;6:119-127.
23. Bryan D, Holway A, Wang KK, Silva AE, Trantolo DJ, Wise D, Summerhayes I: Influence of glial growth factor and Schwann cells in a bioresorbable guidance channel on peripheral nerve regeneration. *Tissue Eng* 2000;6:129-138.
24. Lee JG, Brown RM, Kuga S, Shoda SI, Kobayashi S: Assembly of synthetic cellulose I. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:7425-7429.
25. Park JH: Studies on the development of Aquaculture technology for Ascidians, *Styela clava* Herdman, 1997, National Marine Center.
26. Hashimoto T, Suzuki Y, Suzuki K et al.: Peripheral nerve regeneration using non-tubular alginate gel crosslinked with covalent bonds. *J Materials Science: Mat Med* 2005;16:503-509.
27. Varejao ASP, Cabrita AM, Meek MF, Geuna S, Patricio JA, Azevedo HR, Ferreira AJ, Meek MF: Functional assessment of sciatic nerve recovery: biodegradable poly(DLLA- ϵ -CL) nerve guide filled with fresh skeletal muscle. *Microsurg* 2003;23:346-353.
28. Lee JH, Hwang SJ, Ahn KM, Kim SM, Nam DW, Kim JH, Park YW, Kim NY, Jang JW, Lee SK: Dynamic evaluation of sciatic nerve function in animal model: video gait analysis. Abstracts in Congress of Korean Academy Maxillofac Reconstruct Surg Associat 2003;68,204.
29. Lin FM, Pan YC, Hom C, Sabbahi M, Shenaq S: Ankle stance angle: a functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery after complete transection. *J Reconstruct Microsurg* 1996;12:173-177.
30. Walker JL, Evans JM, Meade P, Resig P, Siskin BF: Gait-stance duration as a measure of injury and recovery in the rat sciatic nerve model. *J Neurosci Methods* 1994;52:47-52.
31. Menzel LP, Lee IH, Sjostrand B, Lehrer RI: Immunolocalization of clavanins in *Styela clava* hemocytes. *Developmental Comparative Immunology* 2002;26:505-515.
32. Zhao C, Liaw L, Lee IH, Lehrer RI: cDNA cloning of Clavanins: antimicrobial peptides of tunicate hemocytes. *FEBS Letters* 1997;410:490-492.
33. Lee IH, Zhao C, Nguyen T, Menzel L et al.: Clavaspilin, an antibacterial and haemolytic peptide from *Styela clava*. *J Peptide Res* 2001;58:445-456.
34. Lee IH, Cho Y, Lehrer RI: Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavanins. *Infection and Immunity* 1997;65:2898-2903.
35. Zhao C, Liaw L, Lee IH, Lehrer RI: cDNA cloning of three cecropin-like antimicrobial peptides (Styelins) from the tunicate, *Styela calva*. *FEBS Letters* 1997;412:144-148.
36. Taylor SW, Craig AG, Fischer WH, Park MK et al.: Syelin D, an extensively modified antimicrobial peptide from ascidian hemocytes. *J Biological Chemistry* 2000;275:38417-38426.
37. Pratt AB, Weber FE, Schmoekel HG et al.: Synthetic extracellular matrices for in situ tissue engineering. *Biotech Bioengineer* 2004;86:27-36.
38. Jeffery WR: Role of PCNA and ependymal cells in ascidian neural development. *Gene* 2002;287:97-105.
39. Riemer D, Wang J, Zim ek A, Swalla BJ et al.: Tunicates have unusual nuclear lamins with a large detection in the carboxyterminal tail domain. *Gene* 2000;255:317-325.
40. Mahanthappa NK, Anton ES, Matthew WD: Glial growth factor 2, a soluble neuregulin, directly increases Schwann cell motility and indirectly promotes neurite outgrowth. *J Neurosci* 1996;16:4673-4683.
41. Rosner BI, Hang T, Tranquillo RT: Schwann cell behavior in three-dimensional collagen gels?: Evidence for differential mechano-transduction and the influence of TGF-beta 1 i morphological polarization and differentiation. *Experimental Neurology* 2005;195:81-91.
42. Masahebi A, Fuller P, Wiberg M, Terenghi G: Effect of allogenic Schwann cell transplantation on peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol* 2002;173:213-223.
43. Mohanna PN, Young RC, Wiberg M et al.: A composite poly-hydroxybutyrate-glial growth factor conduit for long nerve gap repairs. *J Anat* 2003;203:553-565.