

당뇨병 및 Recombinant Bovine Basic-Fibroblast Growth Factor가 흰쥐의 좌골신경 분절 결손 치유에 미치는 영향

가톨릭대학교 의과대학 정형외과학교실

김 인 · 김정만 · 이인주 · 최남용 · 김용식 · 송석환 · 권순용 · 한석구

— Abstract —

Effect of Diabetes Mellitus and Recombinant Bovine Basic-Fibroblast Growth Factor on Healing of Sciatic Nerve Defect in Rat

In Kim, M.D., Jung-Man Kim, M.D., In-Ju Lee, M.D., Nam-Yong Choi, M.D., Yong-Sik Kim, M.D.,
Seok-Whan Song, M.D., Soon-Yong Kwon, M.D., Seok-Koo Han, M.D.

Department of Orthopedic Surgery, Catholic University Medical College

The purpose of this study was to assess the impact of diabetes mellitus and fibroblast growth factor(FGF) on healing process of nerve defect in rat. Sixty-three adult female Wistar rats weighing between 200 and 250g were divided into a control group(32) and a diabetic group(31). To make diabetic rats, Streptozotocin(50mg/kg) was injected into tail vein after dissolution in saline solution. Each group was further divided into two subgroups respectively, FGF and non-FGF, according to the filling material of the silicone tube.

A 5mm segmental defect was made at right sciatic nerve. Both proximal and distal nerve ends were connected with 9mm long silicone tube with internal diameter of 1.57mm. The defect was filled with 10 μ l FGF(recombinant bovine basic-fibroblast growth factor: final concentration 400ng/ml)-collagen solution(FGF group) or 10 μ l collagen(Vitrogen 100: final concentration 2.4mg/ml) solution(non-FGF group).

After 2 and 4 weeks, electromyographic studies including the latency and the amplitude of action potentials in soleus muscle of the operated limb were checked. After the sacrifice, the regenerated nerves were examined histologically after toluidine blue staining. Cross-sectional area, the number of myelinated axons, non-neuronal cells and vessels were recorded at mid-chamber cross section. Statistical analysis was carried out with the results.

From these results, it would be suggested that diabetes mellitus retarded the healing process of sci-

※ 통신저자: 송 석 환

서울특별시 영등포구 여의도동 62번지

가톨릭대학교 의과대학 성모병원 정형외과의국

atic nerve defect in rat, however FGF prompted and accelerated the healing process both in control and diabetic groups so as to overcome the adverse effect of diabetes mellitus.

Key Words: Nerve healing process, Diabetes mellitus, Fibroblast growth factor

연구재료 및 방법

서 론

당뇨병은 아직도 그 발생 기전이 명확하게 밝혀지지 않은 복잡한 대사질환으로 상처 치유에 직접 및 간접적으로 많은 영향을 끼치며 정형외과적으로 말초신경염이나 연부조직 궤양, 심한 경우 신경성 관절증(neurogenic arthropathy) 등을 일으킨다²³⁾.

최근 실험적 당뇨쥐에서 혈청내 뿐 아니라¹⁶⁾ 좌골신경을 포함한 여러 조직에서도 nerve growth factor (NGF)가 감소하였다고 보고되었으며¹⁵⁾, 당뇨병 환자에서도 혈청내 NGF의 감소가 보고되었다¹⁰⁾. 이것은 당뇨병성 신경병변에 NGF가 관련되어 있다는 것을 의미하는 한편 brain-derived neurotrophic factor, neuroleukin, laminin, insulin-like growth factor I(IGF-I) 및 fibroblast growth factor(FGF)등의 다른 neuronotrophic factor(NTF)¹⁷⁾의 영향도 있을 수 있다는 것을 암시한다. 그중 FGF는 강력한 맥관 형성 인자일 뿐 아니라 섬유모세포, 내피세포, 말초 및 중추신경 교외세포(glial cell)의 mitogen으로 알려져 있다

8, 12, 13, 30)

최근 silicone tube를 이용한 정상 말초신경 분절 결손치료에 대해서 다양한 실험 및 그 결과가 발표되었으나^{5, 6, 11, 34)} 당뇨병이 말초신경 분절 결손 치유에 미치는 영향에 대하여는 아직 보고된 바가 없다. 또한 FGF를 이용한 정상 말초 신경 재생에 대한 실험은 있으나^{5, 6, 7, 8)} 당뇨병에서의 이러한 실험은 없었다. 우리들은 실험적 당뇨쥐에서 좌골신경 분절 결손을 만들고, silicone tube를 이용한 치료시 당뇨병이 말초신경 재생에 대하여 어떠한 영향을 끼치며, NGF가 감소하였을때 FGF를 투여하여 이를 극복할 수 있는지를 연구함으로써 당뇨병성 신경 병변의 치료에 기초적 자료를 얻고자 하였다.

1. 재 료

생후 8주된 체중 200-250g의 건강한 Wistar계 암컷 흰쥐 63마리를 사용하였다. 모두 실험 1주일전부터 동물 실험실에서 동일한 조건하에 사육하여 주위 환경에 적응시킨후 실험하였으며, 동일한 고형사료와 물을 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다.

2. 방 법

실험동물을 대조군(32마리)과 당뇨군(31마리)으로 나누고 이들을 각각 FGF 비투여군과 투여군으로 다시 나누었다. 즉 대조군에서 FGF 비투여군은 총 17마리로 2주에 8마리, 4주에 9마리를 관찰하였으며, 투여군은 총 15마리로서 2주에 7마리, 4주에 8마리를 관찰하였다. 당뇨군은 FGF 비투여군이 총 16마리로 2주에 7마리, 4주에 9마리를 관찰하였고, 투여군은 총 15마리로서 2주에 7마리, 4주에 8마리를 관찰하였다(Table 1). 대상 신경은 우측 좌골 신경만을 사용하였다.

Table 1. Grouping of experimental rats

Follow-up period	Control		Diabetes mellitus		Total
	non-FGF*	FGF**	non-FGF	FGF	
2week	8	7	7	7	29
4week	9	8	9	8	34
Total	17	15	16	15	63

*non-FGF : Collagen only

**FGF : Collagen + basic-fibroblast growth factor(400ng/ml)

FGF를 투여하기 위하여 제 1형 collagen(Vitrogen 100, Celtrix Laboratories, 2500 Faber Place, Palo Alto, California 94303; 최종농도: 2.4mg/ml)을 사용하였다. 따라서 FGF 투여군에서는 FGF(recombinant bovine basic-fibroblast growth factor ; Boehringer Mannheim Bio-

chemica, GmbH; 이하 FGF; 최종농도 400 ng/ml)를 collagen과 병용 투여하였고, 비투여군은 collagen만을 투여하였다. collagen 용액은 Vitrogen 100(3mg/ml) 500 μ l에 (x10)phosphate buffered saline 62.5 μ l, 0.1M NaOH 62.5 μ l를 혼합하여 만들었으며, FGF 용액은 Vitrogen 100 500 μ l에(x 10)phosphate buffered saline 37.5 μ l, 0.1M NaOH 62.5 μ l와 FGF 용액(10 μ g/ml) 25 μ l를 혼합하여 만들었다. 모든 용액은 0.1M phosphate buffer로 만들었으며, pH 7.5로 교정하였고 4 $^{\circ}$ C에서는 액체상태이나 체온에서 최소 60분이 경과 하면 gel 상태로 되었다⁵⁾.

혈당농도는 꼬리 정맥에서 채취한 전혈을 Life Scan(Johnson & Johnson Co. USA)으로 측정하였으며, 혈당량이 80-120mg/100ml인 쥐를 대조군으로 사용하였다.

당뇨군은 몸무게 kg당 50mg의 Streptozotocin (Boehringer Mannheim Biochemica, GmbH; 이하 STZ)을 생리식염수에 용해하고 꼬리정맥에 주사하여 당뇨병을 유발하였으며, 3일후의 전혈의 혈당량이 300-400mg/100ml인 쥐를 사용하였다.

모든 수술은 ketamine(100mg/kg) 근육주사 마취하에 우측 대퇴부 및 둔부를 탈모하고 복와위로 고정된 후 수술확대경(Loupe, Heine, 독일, x4)을 이용하여 무균조작하에 시행하였다. 대퇴부 후면 피부를 3cm 종절개하고 대둔근을 박리후 좌골신경을 노출시켰다. 좌골신경을 대퇴부 중간지점에서 미세 수술겸자로 잡아 2mm를 절제하였다. 9mm길이의 잘라 놓은 silicone tube(Silastic Medical-Grade Tubing, Dow Corning Asia Ltd. Hong Kong, 내경 : 1.57mm, 외경 : 2.41mm)에 원위 신경절 단단을 2mm 중첩되게 삽입하고 10-0nylon으로 silicone tube와 신경외막을 봉합하여 신경단이 빠지는 것을 방지하였다(Fig. 1). 백색 바셀린(Witco B.V., Netherland)으로 밀봉하고 FGF 비투여군에서는 collagen 용액을 25 μ l Hamilton micro-liter syringe를 사용하여 10 μ l씩 도관 근위부를 통하여 도관내에 주사하였다(Fig. 1-A). FGF 투여군에서는 collagen에 섞은 FGF 용액을 10 μ l씩 같은 방법으로 silicone tube내에 주사하였다. 근위 신경단을 도관 근위부에 원위 신경단과 같은 방법으로 고정된 후 백색 바셀린으로 밀봉하였다(Fig. 1-B).

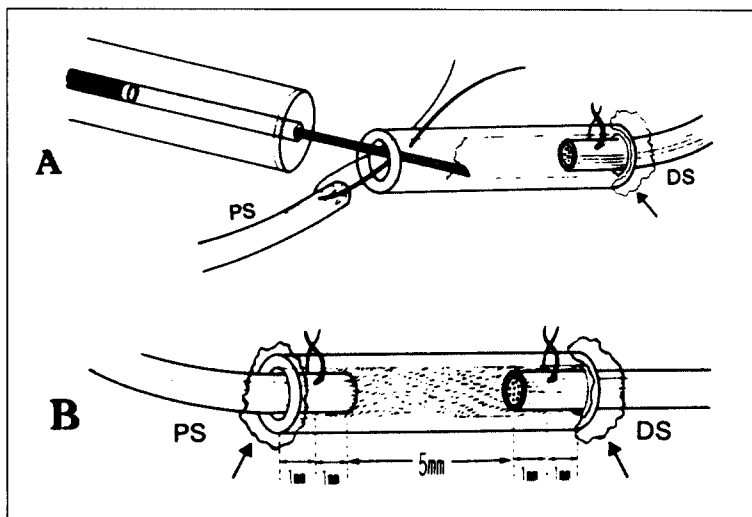


Fig. 1. Schematic drawing of the procedure.

- A: After putting the distal stump(DS) into the silicone tube the collagen +/- FGF mixture is injected in liquid form followed by sealing off the distal end with vaseline(↑). Then the proximal stump(PS) of the nerve is being introduced.
- B: Both ends are sealed with vaseline(↑). At body temperature the mixture gels.

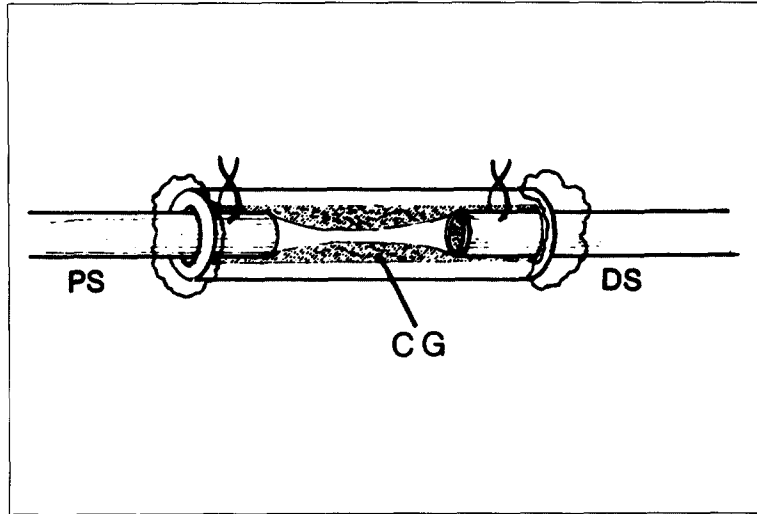


Fig. 2. Schematic drawing of experimental model.

Note the regenerate interconnecting two nerve stumps with its waisted figure. Oblique broken-lined area represents whitish collagen gel(CG).

3. 평 가

수술후 2주 및 4주에 각 실험군을 근전도 검사하였고 그 후 고정액 관류로 희생하여 조직검사 하였다.

1) 근전도 검사

실험쥐를 ketamine 마취하에 복와위로 고정후 수술한 좌골신경을 좌골공(sciatic foramen)으로부터 silicone tube까지 노출시키고, 침전극(Cadwell 7400 Lab., Kennewick, WA)을 사용하여 검사하였다. 활동기록 전극은 경골 결절 1cm 하방의 비복근에, 표준기록전극은 발등에 삽입하였으며, 접지전극은 대퇴부의 피하에 삽입하였다. silicone tube 근위부(활동기록전극에서 근위 6cm)의 좌골신경을 정한 후 쌍극자극전극으로 초당 1회의 비율로 최대상자극(supramaximal stimulation)하여 비복근에서의 복합근 활동전위의 원위 잠시(distal latency)와 진폭(amplitude)을 측정하였다²⁾.

2) 조직학적 관찰

근전도 검사후 양와위에서 개복하여 복대동맥에 18 gauge 주사바늘을 말단부로 삽입후 견사로 결찰하였다.

heparin-생리식염수(20 μ /ml) 100ml로 관류후 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.3)로 만든 1% paraformaldehyde와 2% glutaraldehyde의 고정액 200ml, 15% sucrose 100ml로 관류하여 전고정하였다. silicone tube의 근위 및 원위 2mm 부위의 좌골신경을 절단하여 떼어냈으며, 미세 수술가위로 도관의 한면을 종절개하여 고정액이 잘 스며들도록 한후 paraformaldehyde와 glutaraldehyde 고정액에 넣어 재고정하였다.

계측용 Vernier Caliper(Mitutoyo사, 일본)를 사용하여 silicone tube 및 조직의 정중간을 정한후 조직절단용 칼로 절단하였으며, 10-0 nylon사 제거후 tube내에 재생된 조직을 분리하였다.

buffered 2% osmium tetroxide에 후고정후 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.3)로 세척하고, 탈수 후 Epon 812에 포매하였다. 재생조직의 절단면에서 1 μ m 두께의 횡단 초박절편을 만들어 toluidine blue 염색후 횡단면적은 화상 분석장치인 Vidas 2.0(Kontron bildanalyse, GmbH)을 이용하여 측정하였고, 유수화 측정될기 수, Schwann 세포를 비롯한 비신경 세포수(non-neuronal cell) 및 혈관의 수를 OHP film에 복사한 방안을 이용하여 계산하였다.

Table 2. Result of electromyographic studies (Compound muscle action potentials, mean \pm SD)

Group	Latency(msec)		Amplitude(mv)	
	2week	4week	2week	4week
Control				
non-FGF	1.27 \pm 0.15	1.16 \pm 0.13	5.65 \pm 2.92	8.64 \pm 4.17
FGF	1.20 \pm 0.10	0.82 \pm 0.16	6.13 \pm 2.18	22.35 \pm 6.09
Diabetes mellitus				
non-FGF	1.38 \pm 0.09	1.24 \pm 0.16	4.66 \pm 3.26	7.54 \pm 2.68
FGF	1.29 \pm 0.24	0.92 \pm 0.08	5.43 \pm 4.26	10.23 \pm 2.46
Normal*				
Control	0.71 \pm 0.14	0.71 \pm 0.14	81.83 \pm 10.26	81.83 \pm 10.26
Diabetes mellitus	0.64 \pm 0.10	0.86 \pm 0.13	77.97 \pm 13.21	71.89 \pm 9.36

+ Normal : Result of non-operated sciatic nerve of rat

4. 통 계

근전도 소견 및 조직학적 결과를 대조군 대 당뇨병군, FGF 투여군 대 비투여군으로 나누어 2-way ANOVA로 분석하였다. 대조군과 당뇨병군내의 FGF 투여군대 비투여군 차이는 1-way ANOVA로 분석한 후 유의한 차이를 보인 경우에만 Scheffé의 다중 비교로 구체적으로 비교하였다. 또한 FGF 투여군과 비투여군에서의 대조군과 당뇨병군의 차이는 Student t test로 비교하였으며, 각 군에서의 2주에서 4주로의 변화는 3-way ANOVA로 분석하였다. 검정의 유의수준은 $\alpha=0.05$ 로 하였다.

결 과

1. 근전도 검사(Table 2)

1) 수술후 2주

(1) 원위잠시는 대조군은 1.24 \pm 0.13msec, 당뇨병군은 1.34 \pm 0.18msec로서 두 군 사이에 유의한 차이는 없었으며 ($p>0.05$), FGF 비투여군(1.32 \pm 0.23msec)의 대조군이 1.27 \pm 0.15msec, 당뇨병군이 1.38 \pm 0.9msec로서 FGF투여군(1.25 \pm 0.18msec)의 대조군(1.20 \pm 0.20msec), 당뇨병군(1.29 \pm 0.04msec)과 유의한 차이가 없었다($p>0.05$).

(2) 진폭은 대조군이 5.78 \pm 2.52mv, 당뇨병군이 5.04 \pm 3.66mv로 유의한 차이가 없었고($p>0.05$), FGF 비투여군(5.19 \pm 3.19mv)과 투여군(5.78 \pm

3.27mv)사이에도 차이가 없었다($p>0.05$).

2) 수술후 4주

(1) 원위잠시는 대조군이 1.00 \pm 0.23msec, 당뇨병군이 1.07 \pm 0.20msec로 유의한 차이가 없었다($p>0.05$). FGF 비투여군은 1.20 \pm 0.14msec로 FGF 투여군인 0.87 \pm 0.14msec보다 유의하게 지연되었다($p<0.01$). 대조군에서 FGF 비투여군(1.16 \pm 0.13msec)은 FGF 투여군(0.82 \pm 0.16msec)보다 매우 유의하게 지연되었고($p<0.01$), 당뇨병군에서도 FGF 비투여군(1.24 \pm 0.16msec)이 FGF 투여군(0.92 \pm 0.08msec)보다 매우 유의하게 지연되었다($p<0.01$). 4주에서의 FGF 효과는 2주에서의 FGF 효과보다 더 컸다($p<0.01$).

(2) 진폭은 대조군이 15.09 \pm 8.64mv로 당뇨병군인 8.80 \pm 2.86mv보다 매우 유의하게 컸고($p<0.01$), FGF 투여군(16.29 \pm 7.70mv)이 비투여군(8.09 \pm 3.45mv)보다 매우 유의하게 컸다($p<0.01$). 대조군의 FGF 투여군(22.35 \pm 6.09mv)이 비투여군(8.64 \pm 4.17mv)보다 컸으며($p<0.01$), 당뇨병군의 FGF 투여군(10.23 \pm 2.46mv)도 비투여군(7.54 \pm 2.68mv)보다 컸다($p<0.05$). 4주에는 2주보다 FGF 비투여군, 투여군 모두 그 값이 커졌으며($p<0.01$), FGF 투여군이 비투여군보다 더 크게 증가하였고($p<0.01$), FGF 투여군이 비투여군보다 더 크게 증가하는 정도가 당뇨병군보다 대조군에서 컸으며($p<0.01$), FGF는 당뇨병군보다는 정상쥐에서, 시

간이 진행하면서 진폭에 대하여 더 큰 효과를 나타내는 것으로 보였다.

2. 조직학적 관찰

1) 수술후 2주 (Table 3, Fig. 3)

다소간의 collagen기질이 재생된 신경조직내에 남아 있었다. 유수화 축색돌기는 발견되지 않았고 Schwann세포와 섬유모세포, 염증세포와 같은 비신경 세포가 조직내에 산재되어 있었다. 직경이 작은 많은 혈관들이 있었다.

(1) 비신경세포수는 대조군(1743.73 ± 854.85)보다 당뇨군(3396.07 ± 1311.25)에서 많았는데 ($p < 0.01$), 이 차이는 대조군의 FGF 비투여군(1378.75 ± 874.85)과 당뇨군의 FGF비투여군(3665.43 ± 1586.25)의 차이 (Fig. 3; CC 대 DC, $p < 0.05$) 때문이었다.

(2) 혈관의 수는 FGF 비투여군인 31.60 ± 19.67 보다 투여군이 74.64 ± 27.54 로 매우 유의하게 많았다 ($p < 0.01$). 대조군의 FGF 투여군은 75.29 ± 29.34 로 비투여군인 27.00 ± 17.83 보다 매우 유의하게 많았으며 (Fig. 3; CC 대 CF, $p < 0.01$), 당뇨군의 FGF 투여군(74.00 ± 27.96)도 비투여군(36.86 ± 21.71)보다 유의하게 더 많았다 (Fig. 3; DC 대 DF, $p < 0.05$).

(3) 횡단면적은 당뇨군이 0.33 ± 0.11 로서 대조군인 0.25 ± 0.08 보다 유의하게 컸고 ($p < 0.05$), FGF 비투여군(0.33 ± 0.12)이 FGF 투여군(0.24 ± 0.06)보다 매우 유의하게 컸다 ($p < 0.01$). 대조군과 당뇨군 사이의 차이는 대조군의 FGF 비투여군(0.26 ± 0.10)과 당뇨군의 FGF 비투여군(0.41 ± 0.08)사이의 차이 때문이었다 (Fig. 3; CC 대 DC, $p < 0.01$). 당뇨군에서 FGF 비투여군은 투여군보다 매우 유의하게 컸다 ($p < 0.01$).

2) 수술후 4주 (Table 4, Fig. 4)

(1) 2주에 볼수 없었던 2,000개에서 4,000개의 유수화 축색돌기들이 형성되어 있었으며 fascicle을 형성하는 경향도 있었다. 유수화 축색돌기수는 대조군(3545.29 ± 598.64)이 당뇨군(2709.00 ± 988.96)보다 매우 유의하게 많았고 ($p < 0.01$), FGF 투여군(3747.00 ± 644.59)이 비투여군(2576.17 ± 746.75)보다 매우 유의하게 더 많았다 ($p < 0.01$). 유수화 축

Fig. 3. Transverse sections of chamber midpoint at 2 week.

Toluidine blue stain, A: x100, B: x400.

CC : Control non-FGF group.

A : Perineurium-like circumferential cells(P) surround the central area(C).

B : Magnification of the same section shows scattered Schwann's cells with nonmyelinated axons in their cytoplasm.

CF : Control FGF group.

A : Although the diameter of the cross section is similar to that of CC, more numerous vessels are noted.

B : Magnification of the same section shows that Schwann's cells which contain nonmyelinated axons are organized in clusters.

DC : Diabetic non-FGF group.

A : Perineurium-like circumferential cells(P) surround the central core(C).

B : Magnification of the same section shows that scattered Schwann's cells contain very few nonmyelinated axons in their cytoplasm.

DF : Diabetic FGF group.

A : The vessels are more numerous than the diabetic non-FGF group.

B : Magnification of the same section shows that scattered Schwann's cells contain numerous nonmyelinated axons compared with diabetic non-FGF group.

Table 3. Result of histologic studies at the midcross-section of the regenerated nerve, 2 weeks after entubulation
(mean \pm SD)

Group	Number of myelinated axons	Number of non-neuronal cells	Number of vessels	Area (mm ²)
Control				
non-FGF	None	1378.75 \pm 874.85	27.00 \pm 17.83	0.26 \pm 0.10
FGF	None	2160.86 \pm 656.96	75.29 \pm 29.34	0.24 \pm 0.06
Diabetes mellitus				
non-FGF	None	3665.43 \pm 1586.25	36.86 \pm 21.71	0.41 \pm 0.08
FGF	None	3126.71 \pm 1019.72	74.00 \pm 27.96	0.24 \pm 0.07

색돌기가 대조군보다 당뇨군에서 적은것은 대조군의 FGF 비투여군 (3135.22 \pm 335.44) 과 당뇨군의 FGF 비투여군 (2017.11 \pm 607.64)의 차이에 의한 것으로 (Fig. 4; CC 대 DC, $p < 0.01$), 대조군의 FGF 투여군 (4006.63 \pm 480.74) 과 당뇨군의 FGF 투여군 (3487.78 \pm 710.75) 사이의 유의한 차이는 없었다 (Fig. 4; CF 대 DF, $p > 0.05$). 이것은 FGF의 투여로 축색돌기의 유수화과정에 대한 당뇨병의 악영향이 극복된 것으로 풀이된다. 대조군에서 FGF 투여군이 비투여군보다 매우 많았으며 ($p < 0.01$). 당뇨군에서도 FGF 투여군이 비투여군보다 매우 유의하게 많았다 ($p < 0.01$).

(2) 비신경세포수는 2주보다 급격한 감소를 보였으며 ($p < 0.01$), 그 감소하는 정도가 대조군보다 당뇨군에서 심하였다 ($p < 0.01$). 대조군의 FGF 비투여군 (802.11 \pm 140.18) 이 당뇨군의 FGF 비투여군 (998.33 \pm 150.45) 보다 유의하게 적었다 (Fig. 4; CC 대 DC, $p < 0.05$).

(3) 혈관수는 2주와 비교하여 유의한 변화가 없었다 ($p > 0.05$). 대조군의 FGF 비투여군 (33.22 \pm 12.57) 보다 투여군 (68.50 \pm 17.04) 이 유의하게 많았고 (Fig. 4; CC 대 CF, $p < 0.01$), 당뇨군에서도 FGF 비투여군 (20.22 \pm 10.35) 보다 투여군 (60.50 \pm 20.32) 이 매우 유의하게 많았다 (Fig. 4; DC 대 DF, $p < 0.01$). 또한 대조군의 FGF 비투여군이 당뇨군의 FGF 비투여군보다 혈관수가 유의하게 많았으나 ($p < 0.05$) 대조군의 FGF 투여군과 당뇨군의 FGF 투여군이 유의한 차이가 없는것은 ($p > 0.05$) FGF의 투여로 당뇨병의 혈관성장에 대한 악영향을 극복한 것으로 보였다.

(4) 횡단면적은 대조군 (0.24 \pm 0.05) 과 당뇨군 (0.21 \pm 0.06), FGF 비투여군 (0.22 \pm 0.06) 과 투여군 (0.24 \pm 0.05) 사이에 유의한 차이가 없었다 ($p > 0.05$). 그러나 4주에 횡단면적이 감소하는 정도는 대조군보다 당뇨군에서 심하였고 ($p < 0.01$), FGF 비투여군이 투여군보다 심하였다 ($p < 0.01$). 또한 FGF 비투여군이 투여군보다 심한 정도가 대조군보다 당뇨군에서 심하였다 ($p < 0.05$).

고 찰

당뇨병성 말초신경병은 당뇨병 발병 수년 후에 발생하며²⁰⁾ 크게 대칭성 감각 신경병, 뇌신경 및 말초신경병, 자율신경병으로 나눌 수 있다^{9,32)}. 그 원인은 Schwann세포의 장애³¹⁾나 축색돌기의 구조적 변화 후 분절성 수초탈락, 혹은 무수화 또는 유수화 축색돌기의 손실에 의한 대사성 축색돌기병 (axonopathy)으로 보는 견해가^{9,27,32,36)} 지배적이다.

또한 실험적 당뇨쥐에서 현미경적 구조적 변화의 유^{18,27)}, 무²⁶⁾에 대하여는 논란이 많았으나, 말초신경의 신경전도 속도나 진동감각이 감소한다는 것은 잘 알려진 사실이다^{1, 19)}.

Hellweg과 Hartung¹⁵⁾, 그리고 Hellweg등¹⁶⁾은 당뇨쥐에서 당뇨병 발생후 2주에 이미 교감신경이 분포된 흉체와 악하선, 좌골신경 등에서 NGF의 전달이 정상보다 46-65%가 감소된다고 하였다. 또한 Faradji와 Sotelo¹⁰⁾는 당뇨병 신경병이 있는 환자의 혈청에서 NGF가 감소하였고, 운동신경 전도속도가 정상보다 10% 이상 감소한 환자에서는 10% 미만 감소한 환자보다 NGF의 양이 더 크게 감소하였

다고 하여 NGF가 당뇨병성 신경병과 연관이 있음을 알려주었다.

당뇨병은 결체조직대사에 전반적인 장애를 일으키고 당뇨병 쥐의 혈청은 관절연골 세포배양에서 collagen 합성을 억제한다²⁸⁾. 또한 당뇨병 발생 2주에 이미 골과 관절연골에서 collagen 합성이 혈당량이 높을수록 많이 억제 된다고도 하였다²⁹⁾.

그러나 이상의 보고들은 당뇨병성 말초신경병을 모두 기능적, 대사성 측면에서 관찰, 실험한 것이며 정형외과적 임상에서 종종 접하게 되는 말초 신경의 손상 및 절제후 신경재생에 대하여 당뇨병이 미치는 영향에 대한 구조적 관찰 및 실험에 대한 보고는 없다.

Greene등¹⁴⁾과 Jakobsen¹⁸⁾은 당뇨병 발생후 1일부터 신경전도 속도의 감소가 나타나며, 2주부터는 통계적 의미가 있는 변화가 나타난다 하였으나, 본 실험에서는 측정하지 않았다. Sharma등²⁵⁾과 Carsten등⁴⁾은 진폭이 당뇨유발 초기부터 감소한다고 보고하였다. 원위잠시에 대하여는 보고가 많지 않으며 김과 안²⁾은 당뇨발생후 1주부터 20%정도 유의하게 지연된다고 하였다.

본 실험에서는 당뇨군의 정상대조값이 대조군보다 원위 잠시와 진폭 모두 4주가 되어서야 의미있는 차이를 보였으며, 타 실험에 비해 늦게 나타나는 이유는 알 수 없었다. 실험군의 대조군과 당뇨군 사이의 차이가 2주에서는 없었으며 4주에 유의한 차이를 보인 것은 시간이 경과하면서 당뇨병에 의한 영향이 심해짐을 나타낸 것이며 본 실험의 정상대조값의 변화와 일치하였다.

FGF 투여군과 비투여군의 차이는 원위잠시와 진폭 모두 4주에서 나타났으며, 이는 acidic-FGF를 사용하여 정상신경에서 5mm의 간격을 만들어 효과를 측정했을 때 원위잠시와 진폭에서 통계적으로 유의한 차이는 없었다고 한 Cordeiro등⁵⁾의 결과와 달랐다.

조직학적으로 대조군과 당뇨군의 차이는 주로 유수화 축색돌기 수에서 나타났다. 2주군에서는 모두 유수화 축색돌기가 발견되지 않아 비교할 수 없었으나 4주가 되면서 2주 사이에 각 군에 많은 유수화 축색돌기가 나타났다. 그러나 당뇨군은 대조군보다 그 수가 적었고, FGF 비투여군에서는 대조군과 당뇨군간의 차이가 많았으나 FGF 투여군에서 대조군

Fig. 4. Transverse sections of chamber midpoint at 4 week.

Toluidine blue stain, A: x100, B: x400.

CC : Control non-FGF group.

A : Diameter is reduced compared to that of 2 week.

B : Magnification of the same section shows that myelinated axons appear.

CF : Control FGF group.

A : Diameter is similar to that of control non-FGF group.

B : Magnification of the same section shows that myelinated axons are reduced in diameter and more numerous, compared with control non-FGF group.

DC : Diabetic non-FGF group.

A : Diameter is similar to that of control group, but vessels are fewer in number.

B : Magnification of the same section shows that myelinated axons are fewer than in control group.

DF : Diabetic FGF group.

A : Although diameter is similar to that of diabetic non-FGF group, vessels are more numerous.

B : Magnification of the same section shows that myelinated axons are more numerous than diabetic non-FGF group.

Table 4. Result of histologic studies at the midcross-section of the regenerated nerve, 4 weeks after entubulation

(mean \pm SD)				
Group	Number of myelinated axons	Number of non-neuronal cells	Number of vessels	Area (mm ²)
Control				
non-FGF	3135.22 \pm 335.44	820.11 \pm 140.18	33.22 \pm 12.57	0.23 \pm 0.05
FGF	4006.63 \pm 480.74	899.75 \pm 172.74	68.50 \pm 17.04	0.25 \pm 0.05
Diabetes mellitus				
non-FGF	2017.11 \pm 607.64	998.33 \pm 150.45	20.22 \pm 10.35	0.20 \pm 0.06
FGF	3487.38 \pm 710.75	899.50 \pm 249.59	60.50 \pm 20.32	0.23 \pm 0.05

대 당뇨군의 차이가 통계적으로 의미가 없는 것은 축색돌기의 성장과 유수화 과정이 FGF의 작용에 의해 촉진되며 당뇨병의 영향을 FGF투여로 극복하는 것으로 풀이된다.

Cordeiro등⁵⁾은 FGF투여시 유수화 축색돌기 및 혈관형성이 뚜렷하다 하였으나 통계적 의미를 갖는 정도는 아니라고 하였다. 하지만 FGF의 신경세포에 대한 직접적인 효과는 이미 증명되어 있다.^{12,13,30,33)}

Danielson등⁷⁾은 silicone tube내의 충전물로서 흰쥐 양수막에 laminin을 흡착시켜서 사용하였고, Madison등^{21,22)}은 제 4형 collagen으로 laminin gel을 만들어 실험하였으며, Müller등²⁴⁾은 laminin을 포함한 혼합물을 사용하여 2주와 16일에 이미 몇몇 표본에서 유수화 축색돌기가 근위부 3mm까지 자라 들어온 것을 발표하였다. 그러나 본 실험에서는 2주군에서 유수화 축색돌기를 발견할 수가 없었으며, 이것이 실험방법의 차이에 의한 것인지, FGF의 신경재생에 대한 효과가 laminin의 효과보다 적은 때문인지, 그 이외의 다른 어떤 원인이 있는지는 알 수 없다.

본 실험에서 혈관의 수는 대조군과 당뇨군 사이에는 차이가 없었으나 FGF 투여군에서 비투여군보다 크게 증가하였으며 2주와 4주에서 모두 FGF의 혈관형성 효과를 보였다. 2주와 4주의 비교에서는 그 수가 크게 변하지 않아 일단 자라들어온 혈관이 줄어들지는 않는 것으로 보였다.

그러나 비신경세포는 2주보다 4주에 심하게 감소하였는데 이는 Schwann 세포의 감소가 아니고 섬유모세포와 염주세포가 재생된 신경조직의 성숙으로 사라지기 때문인 것으로 풀이된다. 비신경세포의 출

현은 2주에 당뇨군에서 대조군보다 아주 많았으나 4주에 그 차이가 없어지는 것으로 보아 2주 당뇨군에서 2주 대조군보다 재생조직이 미성숙되었던 것으로 생각되며, 유수화 과정이 끝나가는 4주에 그 성숙도는 대조군에 접근하였던 것으로 보였다.

한편 Danielson⁶⁾과 Danielson등⁸⁾은 silicone tube를 이용한 two-compartmental chamber model에서 FGF의 사용으로 Schwann세포를 비롯한 신경외초(perineurial)세포의 이동이 촉진되며, 혈관의 수나 면적은 증가하지만 재생조직의 횡단면적은 감소한다 하였다. 이들의 관찰기간은 수술작 후 16일로, FGF 투여군에서 재생된 신경조직의 성숙이 빨라 비투여군보다 단면적이 감소하였다는 것이다. Williams등³⁵⁾도 재생된 신경조직의 직경이 1주에 가장 크고 이후 계속 적어진다 하였으며, 이는 신경손상(혹은 silicone tube 수술)후 형성된 fibrin matrix의 경화(consolidation)에 의한다고 풀이하였다. 그러나 신경절단 손상 후 4-5개월에 신경 섬유직경은 정상화 된다고 하며³⁾, 그러기 위하여는 신경의 직경도 다시 커져야 하는데 그 시기에 대하여는 언급이 없다.

본 실험에서는 당뇨군의 FGF 비투여군에서만 2주에 횡단면적이 타군에 비해 의미있게 컸으며, 4주에는 모든 군이 비슷해졌다. 즉 FGF 투여에 따른 효과는 당뇨군 2주에서 볼 수 있었고, 이는 수술 후 2주에 이미 어느 정도의 재생 조직의 성숙이 이루어진 것으로 풀이되었다.

이상의 결과로 보아 당뇨병은 흰쥐 좌골신경 결손 치유를 전반적으로 저해시킴을 알 수 있었다. FGF의 투여는 대조군과 당뇨군에서 모두 신경결손 치유

를 촉진시켰고, 당뇨군에서 FGF의 투여군은 대조군에서의 FGF의 투여군과 비교하여 근전도의 진폭을 제외한 5가지 변수(parameter)에서 차이가 없어 비견할만한 좋은 결과를 보였고, 대조군의 FGF 비투여군과 비교하면 오히려 원위잠시와 혈관수에서는 우수하고 나머지 4개 변수에서도 차이가 없어 당뇨병의 악영향을 FGF의 투여로 극복할 수 있는 것으로 풀이된다.

그러나 당뇨병에 의한 신경재생 저해가 과연 NGF의 감소에만 의한 것인지, 미세혈관장애나 당뇨병에 특유한 hemorheology²³⁾에 의한 것인지, 또는 이들 모두의 영향인지는 알 수 없다. 또한 FGF의 효과가 시간이 흐를수록 가중되는 이유가 FGF가 tube내에 계속 유효한 농도로 잔류하기 때문인지, 혹은 초기 성장 분화 세포들에 대한 영향이 시간이 흐를수록 뚜렷하게 나타나기 때문인지는 의문이다.

요 약

당뇨병이 흰쥐의 말초신경 분절결손후의 치유에 미치는 영향과 basic-fibroblast growth factor (FGF)가 이에 미치는 효과를 밝히기 위하여 실험을 실시하였다. 8주된 건강한 암컷 Wistar계 흰쥐 63마리를 대조군(32마리)과 당뇨군(31마리)으로 나누고 각각 FGF 투여군과 비투여군으로 나누었다. 실험후 2주와 4주에 근전도 검사 및 재생신경의 중간부의 횡단면에서 조직학적으로 유수화 축색돌기수, 비신경 세포수, 혈관의 수 및 횡단면적을 관찰하였다.

1. 근전도 검사에서 복합근 활동전위의 원위 잠시는 4주에서 FGF의 투여에 의한 효과를 대조군과 당뇨군 모두에서 볼 수 있었다($p<0.05$, $p<0.05$).

2. 복합근 활동전위의 진폭은 4주에서 대조군과 당뇨군 사이에 차이가 있었고($p<0.01$), FGF에 의한 효과도 4주에 나타났다($p<0.01$). 또한 FGF의 효과는 당뇨군보다 대조군에서 더 컸으며($p<0.01$), 진폭이 2주보다 4주에서 커지는 경향이 당뇨군보다 대조군에서 뚜렷하였고($p<0.01$), FGF 비투여군보다 투여군에서 더 현저하였다($p<0.01$).

3. 유수화 축색돌기는 4주에 나타났으며, 대조군이 당뇨군보다 유의하게 많았고($p<0.01$), FGF 투여군이 비투여군보다 유의하게 많았다($p<0.01$).

4. 비신경세포수는 2주에만 대조군이 당뇨군보다 작았을뿐($p<0.01$) FGF 투여에 의한 차이는 보이지 않았다($p>0.05$). 4주에는 2주보다 감소하였고($p<0.01$), 당뇨군에서 대조군보다 감소의 정도가 심하였다($p<0.01$).

5. 혈관의 수는 당뇨병에 의한 영향은 보이지 않았고($p>0.05$), FGF에 의한 효과는 대조군과 당뇨군, 2주와 4주에서 모두 나타났다(각 $p<0.05$). 2주와 4주의 변화는 없었다($p>0.05$).

6. 횡단면적은 2주에 대조군보다 당뇨군이 유의하게 컸고($p<0.05$), 당뇨군에서 FGF 투여군이 비투여군보다 작았다($p<0.01$). 4주가 되면서 면적이 감소하였으며 그 정도가 당뇨군에서 심하여($p<0.01$) 대조군과 비슷하였고, 특히 FGF 비투여군에서 심하였다($p<0.01$).

이상의 결과로 보아 당뇨병은 흰쥐의 좌골신경 결손 치유를 저해시키나, FGF의 투여가 대조군과 당뇨군에서 모두 신경치유를 촉진시켜 당뇨병으로 인한 저해효과를 극복할 수 있는 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) 김충남, 최기홍 : 정형외과 영역에서의 당뇨병에 대한 고찰. *대한정형외과학회지*, 12:225-229, 1977.
- 2) 김문태, 안용팔 : 실험적 당뇨쥐에서 운동신경 원위잠시와 근 활동전위의 초기 변화. *가톨릭대학 의학부 논문집*, 44:341-346, 1991.
- 3) **Bowe CM, Hildebrand C, Kocsis JD and Waxman SG** : Morphological and physiological properties of neurons after long-term axonal regeneration: Observations on chronic and delayed sequelae of peripheral nerve injury. *J Neurol Sci*, 91:259-292, 1989.
- 4) **Carsten RE, Whalen LR and Ishii DN** : Impairment of spinal cord conduction velocity in diabetic rats. *Diabetes*, 38:730-736, 1989.
- 5) **Cordeiro PG, Seckel BR, Lipton SA, D'Amore PA, Wagner J and Madison R** : Acidic fibroblast growth factor enhances peripheral nerve regeneration in vivo. *Plast Reconstr Surg*, 83:1013-1019, 1989.
- 6) **Danielson N** : Regeneration of the rat sciatic nerve in the silicone chamber model. *Restor Neurol Neurosci*, 1:253-259, 1990.
- 7) **Danielson N, Müller H, Pettmann B, Williams LR, Davis GE, Engvall E, Manthorpe M and**

- Varon S** : Rat amnion membrane matrix as a substratum for regenerating axons from peripheral and central neurons : effects in a silicone chamber model. *Dev Brain Res* , 39:39-50, 1988.
- 8) **Danielson N, Pettmann B, Vahlsing HL, Manthorpe M and Varon S** : Fibroblast growth factor effects on peripheral nerve regeneration in a silicone chamber model. *J Neurosci Res* , 20:320-330, 1988.
 - 9) **Editorial** : Diabetic neuropathy-where are we now? *Lancet* , 1:1366-1367, 1983.
 - 10) **Faradji V and Sotelo J** : Low serum levels of nerve growth factor in diabetic neuropathy. *Acta Neurol Scand* , 81:402-406, 1990.
 - 11) **Gibson KL, Remson L, Smith A, Satterlee N, Strain GM and Daniloff JK** : Comparison of nerve regeneration through different types of neural prostheses. *Microsurgery* , 12:80-85, 1991.
 - 12) **Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L and Neufeld G** : Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocrine Reviews* , 2:95-114, 1987.
 - 13) **Gospodarowicz D, Neufeld G and Schweigerer L** : Fibroblast growth factor : Structural and biological properties. *J Cell Physiol Suppl* , 5:15-26, 1987.
 - 14) **Greene DA, De Jesus PV and Winegrad AI** : Effects of insulin and dietary myoinositol on impaired peripheral motor nerve conduction velocity in acute streptozotocin diabetes. *J Clin Invest* , 55:1326-1336, 1975.
 - 15) **Hellweg R and Hartung HD** : Endogenous levels of nerve growth factor(NGF) are altered in experimental diabetes mellitus : A possible role for NGF in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *J Neurosci Res* , 26:258-267, 1990.
 - 16) **Hellweg R, Wöhrle M, Hartung H, Stracke H, Hock C and Federlin K** : Diabetes mellitus associated decrease in nerve growth factor levels is reversed by allogeneic pancreatic islet transplantation. *Neurosci Lett* , 125:1-4, 1991.
 - 17) **Hurst LC and Badalamente MA** : Biochemical properties of peripheral nerve. In : Gelberman RH ed. *Operative nerve repair and reconstruction*. 1st ed. Philadelphia , J.B. Lippincott Co. Vol. 1:55-72, 1991.
 - 18) **Jakobsen J** : Early and preventable changes of peripheral nerve structure and function in insulin-deficient rats. *J Neurol Neurosurg Psychi* , 42:509-518, 1979.
 - 19) **Lippman EM and Grow JL** : Neurogenic arthropathy associated with diabetes mellitus. *J Bone Joint Surg* , 37-A(5): 971-977, 1955.
 - 20) **Lundbaek K** : Long-term diabetes. 1953(cited from Jakobsen J ed. Early and preventable changes of peripheral nerve structure and function in insulin-deficient diabetic rats. *J Neurol Neurosurg Psychi* , 42:509-518, 1979).
 - 21) **Madison R, Da Silva CF, Dikkes P, Chiu T and Sidman RL** : Increased rate of peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guides and a laminin-containing gel. *Exp Neurol* , 88:767-772, 1985.
 - 22) **Madison RD, Da Silva C, Dikkes P, Sidman RL and Chiu T** : Peripheral nerve regeneration with entubulation repair : Comparison of biodegradable nerve guides versus polyethylene tubes and the effects of a laminin-containing gel. *Exp Neurol* , 95:378-390, 1987.
 - 23) **Morain WD and Colen LB** : Wound healing in diabetes mellitus. *Clin Plast Surg* , 17(3):493-501, 1990.
 - 24) **Müller H, Williams LR and Varon S** : Nerve regeneration chamber : Evaluation of exogenous agents applied by multiple injections. *Brain Res* , 413:320-326, 1987.
 - 25) **Sharma AK, Thomas PK and Baker RWR** : Peripheral nerve abnormalities related to galactose administration in rats. *J Neurol Neurosurg Psychi* , 39:794-802, 1976.
 - 26) **Sharma AK, Thomas PK and De Molina AF** : Peripheral nerve fiber size in experimental diabetes. *Diabetes* , 26:689-692, 1977.
 - 27) **Sidenius P** : Review : The axonopathy of diabetic neuropathy. *Diabetes* , 31:356-363, 1982.
 - 28) **Spanheimer RG** : Direct inhibition of collagen production in vitro by diabetic rat serum. *Metabolism* , 37:479-485, 1988.
 - 29) **Spanheimer RG, Umpierrez GE and Stumpf V** : Decreased collagen production in diaretic rats. *Diabetes* , 37:371-376, 1988.
 - 30) **Thomas KA** : Fibroblast growth factors. *FASEB J* , 1:434-440, 1987.
 - 31) **Thomas PK and Lascelles RG** : Schwann-cell abnormalities in diabetic neuropathy. *Lancet* , 1:1355-1357, 1965.
 - 32) **Unger RH and Foster DW** : Diabetes mellitus. In : Wilson JD and Foster DW ed. *Williams textbook of endocrinology*. 7th ed. Philadelphia, W.B.Saunders

Co:1036-1054, 1985.

- 33) **Walicke P, Cowan WM, Ueno N, Baird A and Guillemin R** : Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances dendrite extension. *Proc Natl Acad Sci USA* , 83: 3012-3016, 1986.
- 34) **Williams LR, Danielson N, Müller H and Varon S** : Exogenous matrix precursors promote functional nerve regeneration across a 15mm-gap within a silicone chamber in the rat. *J Comp Neurol* , 264:284-290, 1987.
- 35) **Williams LR, Longo FM, Powell HC, Lundborg G and Varon S** : Spatial-temporal progress of peripheral nerve regeneration within a silicone chamber : Parameters for a bioassay. *J Comp Neurol* , 218:460-470, 1983.
- 36) **Winegrad AI, Simmons DA and Martin DB** : Has one diabetic complication been explained? *N Eng J Med* , 308:152-154, 1983.