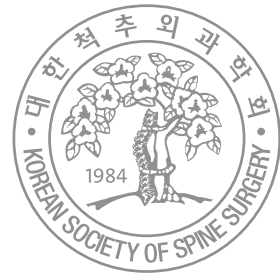


Journal of Korean Society of Spine Surgery



Variations of Neurotrophic Factors and It's Importances in Spinal Cord Injured Rats and Beagle Dogs

In-Soo Song, M.D., Jun-Young Yang, M.D., June-Kyu Lee, M.D.,
Yong-Bum Joo, M.D., Soo-Min Cha, M.D.

J Korean Soc Spine Surg 2011 Mar;18(1):1-12.

Originally published online March 31, 2011;

doi: 10.4184/jkss.2011.18.1.1

Korean Society of Spine Surgery

Department of Orthopaedic Surgery, Ewha Womans University Collge of Medicine
#911-1 Mok-dong, Yangcheon-gu, Seoul, 158-710, Korea Tel: 82-2-2646-6808 Fax: 82-2-2646-6804

©Copyright 2011 Korean Society of Spine Surgery

pISSN 2093-4378 eISSN 2093-4386

The online version of this article, along with updated information and services, is
located on the World Wide Web at:

<http://www.krspine.org/DOLx.php?id=10.4184/jkss.2011.18.1.1>

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Variations of Neurotrophic Factors and It's Importances in Spinal Cord Injured Rats and Beagle Dogs

In-Soo Song, M.D. *, Jun-Young Yang, M.D., June-Kyu Lee, M.D., Yong-Bum Joo, M.D., Soo-Min Cha, M.D.

Department of Orthopaedic Surgery, Chungnam National University School of Medicine, Research Institute of Medical Science, Daejeon, Korea

Department of Orthopaedic Surgery, Sun General Hospital, Daejeon, Korea*

Study Design : Experimental, prospective study

Objectives : To examine the changes in the variable factors after an acute spinal cord injury(SCI) in rats and dogs simultaneously.

Summary of Literature Review : No study has examined the variations of several factors in a SCI model in different species.

Materials and Methods : In rats, a laminectomy was performed at the T10 level and the injured spinal cord was extracted. In Beagle dogs, the laminectomy level was T10 and T11. The motor function was evaluated using a modified Tarlov's scale. A RT2 profiler PCR array was used to examine each factor (inflammatory cytokines, factors-related with apoptosis, neurotrophic factors, factors-related with extracellular matrix).

Results : IL-2, TNF, TNFRSF11B increased with time and showed no statistical difference between two species, but TNFSF13B showed a significant difference. BDNF decreased with time in both species, and GDNF was significantly lower in dogs. NGF β , CTNF and its receptors showed no significant changes in the two species. MMP1 increased in both species but MMP7 decreased in rats and increased in dogs with time, and showed a significant difference between species.

Conclusion : The change in inflammatory cytokines and extracellular matrix correlates with each factor in the combined patterns. Moreover, during the first week after SCI, inflammatory cytokines, apoptosis, neurotrophic factors, and extracellular matrix factors may show a partial difference between experimental animals, which means that an animal model can be selected according to the particular experimental plan.

Key Words : Spinal cord injury, Inflammatory cytokines, Factors-related with apoptosis, Neurotrophic factors, Factors-related with extracellular matrix

서론

척수 손상은 주로 외상에 의한 척추의 변위에 의하여 척수가 척수강 내에서 압박되면서 발생한다. 현재, 척수 손상 환자의 신경 장애를 최소화하고 신경 기능의 회복을 촉진시킬 수 있는 치료 방법의 개발에 많은 연구와 노력이 진행 중에 있다. 척수 손상의 치료에 효과가 인정된 것은 손상 후 24시간 또는 48시간 이내에 신경 조직의 손상을 줄여주기 위하여 시도되는 methylprednisolone만이 임상에서 허용된 유일한 약물이며 수술적 치료로 조기 감압술이 권장되는 치료 방법이나,^{1,2)} 아직도 그 효용성에 대해서는 논란이 있다. 이 밖에도 많은 종류의 신경 보호 치료제에 대한 연구가 활발하게 진행되어 왔고, 향후 급성기 신경 손상을 최소화할 수 있는 효과적인 신경 보호 약물의 개발이 기대되고 있다. 최근에는 급성기 이후 이미 손상된 신경 조직의 재생 혹은 복구를 시도하는 치료들에 대한 연구도 매

Received: October 27, 2010

Revised: February 18, 2011

Accepted: February 21, 2011

Published Online: March 31, 2011

Corresponding author: Jun-Young Yang, M.D.

Department of Orthopedic Surgery, Chungnam National University School of Medicine, 640, Daesa-Dong, Jung-Gu, Daejeon, Korea

TEL: 82-42-280-7351, **FAX:** 82-42-252-7098

E-mail: jyyang@cnu.ac.kr

"This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited."

우 활발하게 진행되고 있다.³⁾ 특히, 손상 받은 척수 신경 축색들의 성장을 촉진시키기 위하여 대표적인 축색 성장 저해 물질인 마이엘린 수초나 신경아교세포 흥터에서 기원하는 세포의 기질(extracellular matrix) 단백질을 분해하는 방법들이 설치류를 이용한 동물 시험에서 시행되어져 왔고,⁴⁾ 양 등⁵⁾은 개를 이용한 실험에서도 이를 확인한 바 있다. 그 외 축색의 성장을 도와줄 수 있는 여러 가지 세포나 조직을 손상 부위에 이식하는 방법들도 손상된 축색의 재생을 촉진하고 신경 기능의 회복을 촉진시킬 수 있음이 알려져, 최근에는 각종 줄기 세포의 기초 연구가 더욱 발전하고 있다. 줄기 세포를 이식하여 손상된 신경 및 각종 교세포를 대체하거나 축색의 재생을 유도하는 치료법들에 대한 관심이 높아지고 있고, 이미 척수 손상 동물 모델에서 기능적 회복을 유도할 수 있다는 연구 결과들이 발표되어 그 치료적 가능성을 인정받고 있다.⁶⁾

많은 동물 연구들에 주로 사용되는 종(種)은 설치류로, 이들의 신경 조직 자체가 신경 가소성(neuroplasticity)을 가지고 있어⁷⁾ 척수 손상의 만성기 변화를 반영하는데 한계가 있을 수 있으며 또한 인간에게 적용하기 위해서는 개와 같은 포유류에서의 변화에 대한 연구가 수행되어야 다양한 신경 보호 물질의 임상적 사용 전 안전성 확보에 유리할 것이다. 따라서 저자는 이번 실험에서 다양한 신경인자의 척수 손상 후 변화를 쥐와 개에서 동시에 살펴 보아 종(種)간의 차이가 있는지를 확인하고자 하였으며 이러한 실험 시도는 척수 손상의 동물 연구에서 최초인 것으로 생각된다.

연구 대상 및 방법

1. 실험 동물

(1) Sprague Dawley rat(쥐, 설치류)

평균 16주된 Sprague Dawley rat, 수컷 4 마리를 사용하였고, 평균 체중은 324g(285–378g)이었다. 수술 시 할로탄(halothane)을 이용하여 흡입 마취 시키고, 추궁 절제(laminectomy)는 경막이 손상되지 않게 10번째 흉추에서 시행하였고, 추궁 절제 후 10g의 봉막대를 20mm 높이에서 떨어뜨렸으며 사용된 봉의 단면적은 지름이 3mm였다. 근육과 피부를 3-0 실크를 이용 봉합하였다.

(2) Beagle Dog(개, 포유류)

평균 18개월 된 Beagle dog, 수컷 4 마리를 사용하였고, 평균 체중은 5.8kg(3.7–7.2kg)이었다. 척수 손상을 유도하기 위하여 케타민(ketamine)의 정맥 내 주사로 유도 마취 후 기관지관을 삽입하고, 마취 유지는 propofol을 baxter를 이용하여 지속

적으로 투여하였다. 요추부 전체를 무균 조작한 후에 피부와 근육을 절개하고 경막이 손상되지 않게 추궁 절제(laminectomy)를 하였고 부위는 모두 10번째와 11번째 흉추였다. 추궁 절제 후 Weight-drop injury 방법으로 척수 손상을 유도하였으며(200mm/5g) 사용된 봉의 단면적은 지름이 3mm였다.⁸⁾

(3) 척수 신경 감시

두 종류 동물 군에서 수술 조작 중의 척수 손상을 배제하고 또한 정확한 척수 손상 유도를 확인하기 위하여 척수 신경 감시(spinal cord monitoring)를 시행하였다. 신경 감시는 경두개 전기 자극 운동유발전위 검사(transcranial electrical stimulation-motor evoked potential)와 지속적인 근전도 감시(continuous electromyography monitoring)가 가능한 NIM-SPINE™(Medtronic, Sofamor Danek)기기를 사용하였다. 경피적 전기자극을 위하여 두피에 2개의 전극을 삽입하였으며, 기록 전극은 수술 부위를 고려하여 상하지 좌우측에 각각의 운동신경단위에 삽입하였다. 봉막대를 이용한 직후에 나타나는 근전도와 운동유발전위 검사에서 이상 파형을 확인하여 척수 손상을 확인하였다(Fig. 1).

(4) 술 후 관리

척수 손상 후 적당한 온도와 습도를 유지하였으며, 물과 먹이를 충분히 제공하였다. 사용된 실험동물은 척수신경감시와 술 후 다리의 운동을 평가하여 모든 기준에 맞는 동물만을 실험 대상으로 하였다. 척수 손상을 가하지 않은 쥐 1 마리와 개 1 마리를 대조군으로 하였다. 그 후, 표준화된 실험 동물의 수술 후 처치 방법에 따라 온도와 습도를 유지하였으며, 물과 먹이를 충분히 제공하였다.

요로 감염 예방 및 방광 기능을 유지하기 위하여 인공 배뇨(2 times/day)를 시행하였고 술 후 3일간 cefazoline(0.5mg/kg)을 투여하였다.

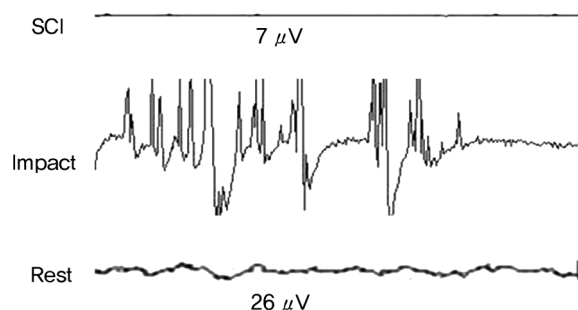


Fig. 1. EMG recorded after spinal cord injury in dog: Noted severe training wave when spinal cord impacted. *SCI, spinal cord injury.

Table 1. Modified Tarlov's scale for motor function evaluation

Scale	Degree of Paraplegia	Symptoms
0	Flaccid	Minimal or no leg movements; variable tone; loss of bowel/bladder control
1	Spastic	Moderate or vigorous purposeless leg movements; leg spastic and extended; no sitting; loss of bowel/bladder control
2	Severe	Only moderate spasticity in legs; vigorous, coordinated movements suggesting walking; can sit and stand; loss of bowel/bladder control
3	Moderate	Sitting, standing, and walking are shown; legs and hips obviously unstable; leg lagging; loss of bowel/bladder control
4	Mild	Walking with some leg and hip instability; bowel/bladder functional
5	Normal	Hip instability seen only with jumping or running

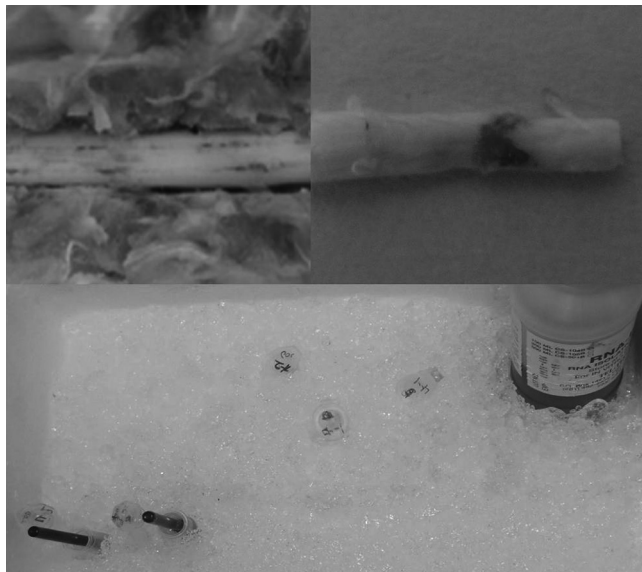
2. 운동 이상 측정

척수 손상에 의한 신경 결손은 0점(flaccid)부터 5점(normal walking)까지 있는 변형된 Tarlov's scale을 이용해서 다음 항목과 같이 평가하였다(Table 1).

3. 조직 준비

척수 손상 후 1일째와 7일째에 동물들을 희생시킨 후 4% paraformaldehyde를 이용하여 관류 고정하였다. 척수는 최대한 빨리 외부 손상 없이 제거하였으며, 0.1mol/L phosphate buffer에 있는 4% formaldehyde에 넣어 4° C에 보관하였다. 이 조직들을 paraffin에 넣고 8mm 두께로 잘라 H-E 염색을 시행하였다.

운동섬유소원의 양적인 분석을 위해 각각의 잘라낸 부분(section)에서 전방 척수각을 포함하는 2개의 중배율(20배율)을 채택하여 '전방 척수각 당 운동섬유소원 수(표준편차)'의 형태로 표현하였다.

**Fig. 2.** This photograph shows the procedure and instrument of extraction RNA.

4. RT² PCR array

본 연구를 위해 사용된 시발체(primer)는 각각 인자들의 촉진 유전자(promoter) 부위 및 인트론(intron)을 포함하는 부분으로 하였다. 각각의 감각 시발체(sense primer)를 합성한 후 DNA 증폭을 위한 PCR은 추출된 100ng/ul의 DNA 1.5ul에 10 x PCR 완충용액(pH 8.3, 100mM Tris-HCl, 500mM KCl, 15mM MgCl₂) 3.0 ul, 2.5mM dNTP 1.0 ul, 10pM primer 0.5ul, Taq DNA polymerase 0.2 ul, 3차 증류수 23.3ul 혼합하여 총 30ul를 만든 후 유전자 증폭기(master cycler gradient)에서 시행하였다. 온도 주기는 섭씨 95도에서 5분을 유지한 후 DNA 변성(denaturation)은 94도에서 45초, 시발체의 결합(annealing)은 60도에서 45초, 확장(extension)은 72도에서 1분으로 45회 반복한 후 확장(extension)을 극대화하기 위하여 72도에서 5분을 유지하였다. 반응 생성물 Bsa I으로 절단하고 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel에서 전기영동 시킨 후 자외선 조사기(UV transilluminator) 위에서 DNA 절편의 길이를 관찰하였다.

(1) 유전체 DNA 제거 혼합물(Genomic DNA Elimination Mixture)

척수 손상 부위와 위아래를 포함한 조직을 마취하에 적출하였다. 적출된 조직은 liquid nitrogen을 이용하여 급냉하고 TRIzol 시약을 이용하여 total RNA를 뽑아내었다(Fig. 2).

그 후 약 10-15초 동안 모든 시약을 원심 분리하고 유전체 DNA 제거 혼합물을 준비하며 그 단계는 아래와 같다.

a. 각각의 RNA 표본을 소독된 PCR tube에 아래의 비율로 넣고 혼합한다.

Total RNA	25.0	ng to 5.0 μ g
GE** (5 X gDNA Elimination buffer)		2.0 μ l
H ₂ O to a final volume of		10.0 μ l

Table 2. Prepare of RT Cocktail

RT Cocktail	1 reaction	2 reaction	4 reaction
BC3(5X Rt Buffer 3)	4 μ l	8 μ l	16 μ l
P2(Primer & External Control Mix)	1 μ l	2 μ l	4 μ l
RE3(RT Enzyme Mix3)	2 μ l	4 μ l	8 μ l
H ₂ O	3 μ l	6 μ l	12 μ l
Final Volume	10 μ l	20 μ l	40 μ l

b. 간단한 원심 분리 후 pipetorr 피펫을 이용하여 혼합물을 부드럽게 섞는다.

c. 42°C에서 5분 동안 배양한다

d. 마지막 단계로 1분 동안 얼음에서 급냉 시킨다.

(2) RT Cocktail

이후 cDNA 첫 번째 가닥의 합성 반응을 위하여 RT Cocktail 10 μ l을 각각의 10- μ l 유전체 DNA 제거 혼합물에 첨가하고, pipetorr 피펫을 사용하여 부드럽게 잘 섞는다. 그 후 42°C에서 정확히 5분 동안 배양하고, 95°C에서 5분 동안 가열한 다음 즉시 멈춘다. H₂O 91 μ l을 각각의 20- μ l cDNA 합성반응에 첨가한다.

cDNA의 첫 번째 가닥 합성반응이 끝나면 다음 단계까지 얼음에 보관하거나 -20°C에서 밤새 저장한다(Table 2).

(3) RNA Quality Control Check

희석된 cDNA template 부분 표본(6 μ l)을 정확한 종 특이성(species-specific)과 기기 특이성(instrument-specific) RT² RNA QC PCR Array로 분류한다. 나머지는 -20°C에 보관한다(Fig. 3).

(4) 자료 분석

Web-based software를 이용하여 원시 값을(raw value)를 접이식 변환 값(fold change value)으로 환산하여 표시하였다.

5.통계분석

모든 통계적 분석은 SPSS 12.0을 이용하였다. 변이의 분석을 통해 군 간의 운동신경세포의 평균값을 비교하였다. 신경학적 점수는 반복 측정에 대한 일반화된 선형 모형(Repeated Measures of the General Linear Model)과 다변량 분석법(Multivariate

Analysis)을 이용해 두 군의 차이를 분석하였다. 데이터들은 평균값±표준편차로 표시하였고 통계학적 유의성은 p<0.05로 설정하였다.

결과

1. 운동학적 평가

손상 후 명확한 파형(training wave)가 보인 후 평탄 파형(flat wave)을 보이는 경우는 쥐4마리, 개 3마리였으며 보이는 이들의 1일째와 7일째 운동학적 평가의 평균은 쥐는 0.4 ± 0.032 , 2.3 ± 0.044 그리고 개는 각각 0.2 ± 0.014 , 1.5 ± 0.002 이었다. 통계학적 차이는 없었다($p > 0.05$, Fig. 4A).

2. 조직학적 검사

실험군에서의 쥐나 개 모두에서 척수 손상 후 척수는 부종, 출혈 및 괴사를 나타냈고, 척수 손상 1일째에는 혈구의 침습 및 탈수초화 등의 백색질 손상 소견도 보였다. 운동신경세포(motor neuron)의 손상 소견은 초기부터 보였고, Nissl 신경원의 염색 소실 및 국소 괴사 소견을 보였다. 7일 째에 백색질 손상도 심한 부종, 수초막의 손실 및 공포 형성 등이 명확하게 나타났다(Fig. 4C) 운동신경세포의 수는 감소하였으며 1일째와 7일째에서 운동신경세포의 감소 변화 정도는 동물 간에 차이가 없었다($p > 0.05$, Fig. 4B).

3. 급성 염증 사이토카인의 분석

이 분석에 사용된 인자들은 interleukin-2(IL-2), tumor necrosis factor(TNF), 그리고 TNF의 수용체로 알려진 TNFRSF11B와 TNFSF13B이다. IL-2의 변화는 척수 손상 후 시간이 경과함에 따라 증가하였고, 그 변화의 비는 쥐는 $0.488(14.64 \pm 2.43/29.99 \pm 1.55)$, 개는 $0.503(13.54 \pm 1.67/26.91 \pm 2.02)$ 로 나타났으나, 두 종간에 통계학적 차이는 없었다($p > 0.05$).

TNF의 변화는 역시 시간이 경과할수록 두 종 모두에서 증가하였으며 증가 정도는 두 군간에 차이가 없었다($p > 0.05$). 그러나 TNF의 수용체 변화에서 TNFRSF11B의 변화 정도는 두 종간에 통계학적 차이가 없었으나(0.88 ± 0.065 , 0.95 ± 0.057 , $p > 0.05$)

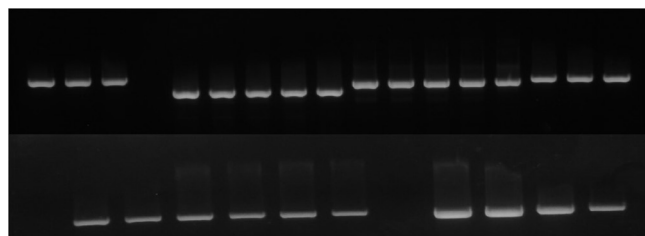


Fig. 3. Quality control of total RNA. All experimental material was well controlled.

,TNFSF13B는 쥐에서 1.19 ± 0.043 , 개에서 1.38 ± 0.071 로 의미 있는 차이를 보였다($p < 0.05$, Fig. 5).

4. 급성기 세포사멸과 관계된 인자의 분석

여러 가지 다양한 인자가 포함되지만 본 실험에서는 JUN과 NFK β 1을 실험하였다. 이 두 인자의 변화 정도는 척수 손상 1일째와 7일째 모두 의미 있는 차이를 보이지 않았다($p > 0.05$) 세포사멸과 밀접한 JUN의 활성도는 척수 손상 후부터 증가하여 거의 안정 수준을 유지하므로($22.3 \pm 1.57/24.2 \pm 2.01$, $23.8 \pm 1.12/25.4 \pm 2.11$) 손상 7일까지 지속적인 세포사멸이 이루어짐을 알 수 있으며 이와 동시에 세포사멸을 방지하는 NFK β 1 역시 활성도가 증가함을 알 수 있었다(Fig. 6).

5. 신경영양인자들의 분석

(1) Brain-derived neurotrophic factor(BDNF)와 glial cell-line-derived nerve factor(GDNF)

BDNF는 두 종 모두 시간이 경과하면서 감소하였다. 쥐에서는 24.27 ± 3.13 에서 20.02 ± 1.59 로 개에서는 25.48 ± 2.02 에서 23.24 ± 1.38 로 변화를 보였다. 두 군간에 의미 있는 차이는 관찰

되지 않았다($p > 0.05$).

그러나 GDNF는 쥐에서는 시간이 경과할수록 변화의 폭은 거의 없었으나 개에서는 감소하였고(0.97 ± 0.04 , 1.13 ± 0.01) 이는 통계적으로 의미 있는 차이를 보였다($p < 0.05$, Fig. 7A).

(2) NGF β 와 수용체의 분석

두 종 모두 시간이 경과하면서 감소하는 양상을 보였으며 종간의 차이는 관찰되지 않았다($p > 0.05$, Fig. 7B).

(3) CNTF와 수용체의 분석

CNTF는 시간이 경과할수록 증가하나 그 수용체는 오히려 감소하는 양상을 보였다. 그러나 두 종간에 의미 있는 차이는 볼 수 없었다($p > 0.05$, Fig. 7C).

6. 세포의 기질과 관계된 인자의 분석

신경 재생을 방해하는 기능을 갖고 있는 chondroitin sulfate proteoglycan(CSPG)는 두 종 모두 시간이 경과할수록 증가하였으며 종간의 의미 있는 차이는 없었다(0.902 ± 0.047 , 0.908 ± 0.051 , $p > 0.05$). 또한 MMP1과 7의 실험에서

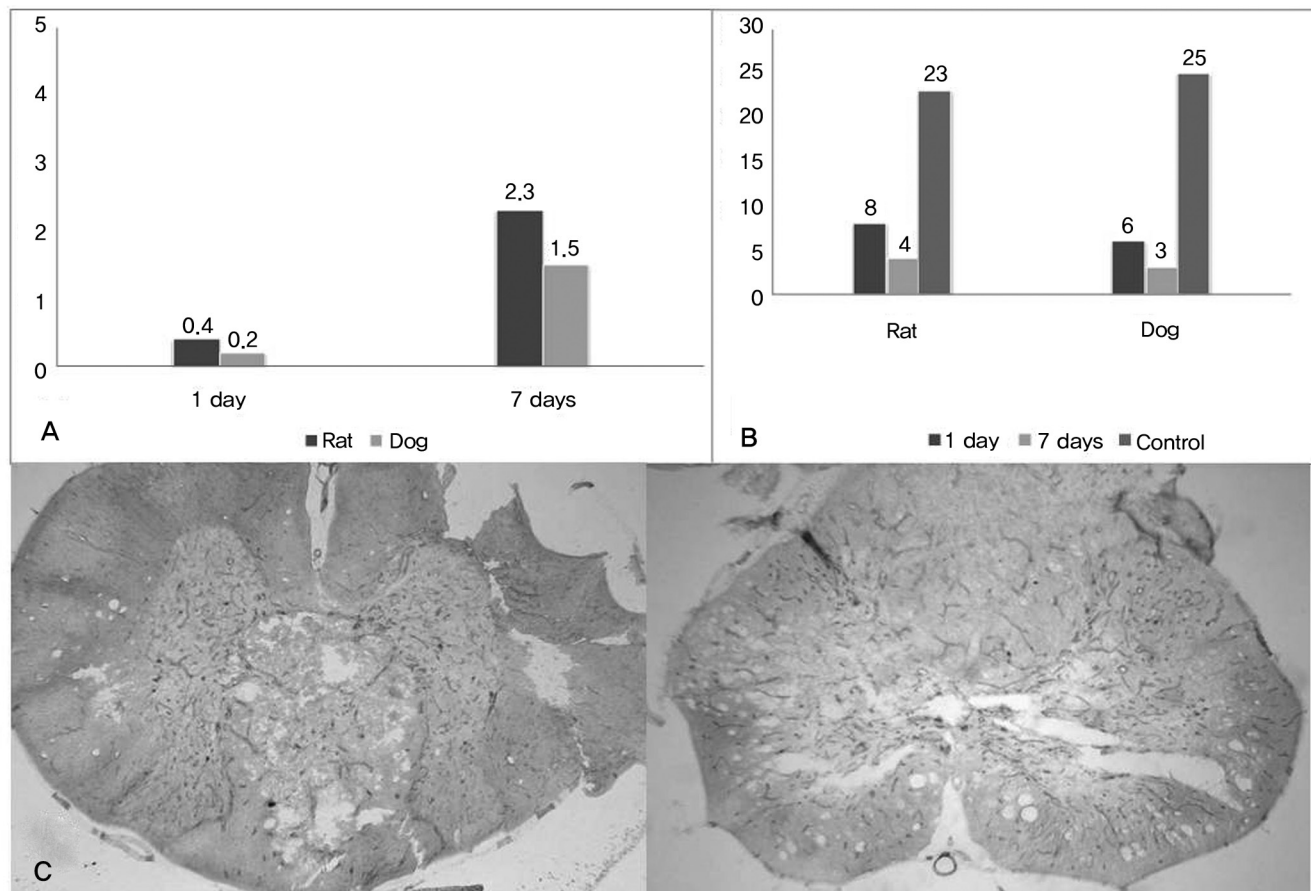


Fig. 4. (A) Motor function after spinal cord injury at 1 day, 7 days by Tarlov's scale. **(B)** The count of motor function; There was no statistical difference between two groups. **(C)** Slides from Extracted spinal cord, vesicle and infiltration of inflammatory cells, edema was shown(H&E stain, $\times 20$).

도 MMP1은 모두 증가하였으나 MMP7은 쥐에서는 시간이 경과할수록 감소하고 개에서는 증가하는 양상을 보였으며, 두 종간에 의미 있는 차이를 나타내었다($p < 0.05$, Fig. 8A-C).

고찰

척수 손상 후 다양한 인자들의 변화를 쥐와 개, 즉 설치류와 포유류에서 동시에 살펴보았다. 척수 손상 후 운동학적 평가에서 두 종(種)간의 신경 회복 정도를 비교하는 것은 표준화가 없

어 정확한 비교가 어렵다. 따라서 저자는 Tarlov 평가 방법을 이용하여 뒷다리의 운동 능력만을 평가하였다. 척수 손상 후 7일 까지만을 비교한 이유는 설치류의 경우 신경 가소성 때문에 시간이 지날수록 자발적 운동 능력의 회복이 가능하기 때문이다. 조직학적 검사에서 운동신경세포의 수가 시간이 지날수록 감소하고 중심의 공동이 형성됨에도 불구하고, 쥐와 개의 실험군에서 일부 신경 기능의 호전을 확인할 수 있었다. 이와 같은 자발적인 신경 기능 회복은 척수의 주변 부위에서 남아있는 축색으로 부터의 새로운 재생과 매우 관련이 있다. 또한 운동발생중

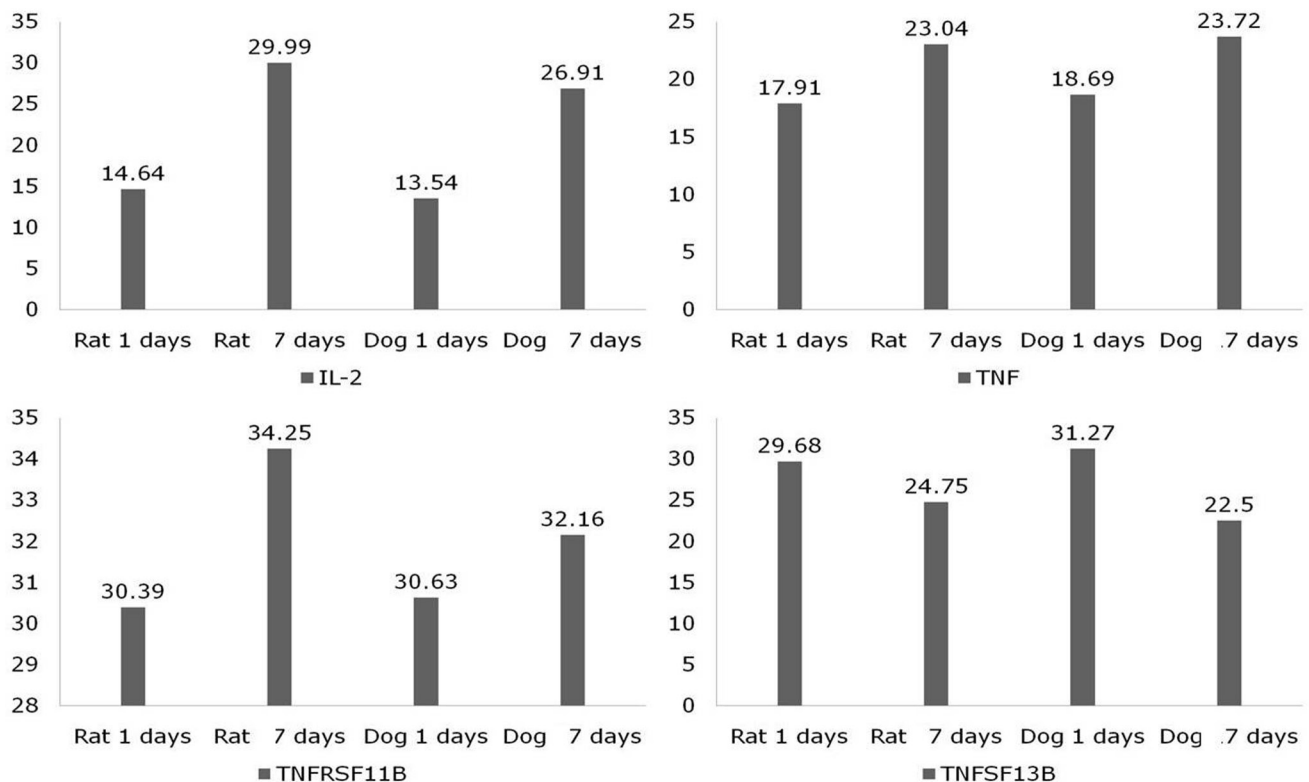


Fig. 5. This graphs show the acute inflammatory cytokines changes after spinal cord injury. Between two species, there was no significant difference($p > 0.05$).

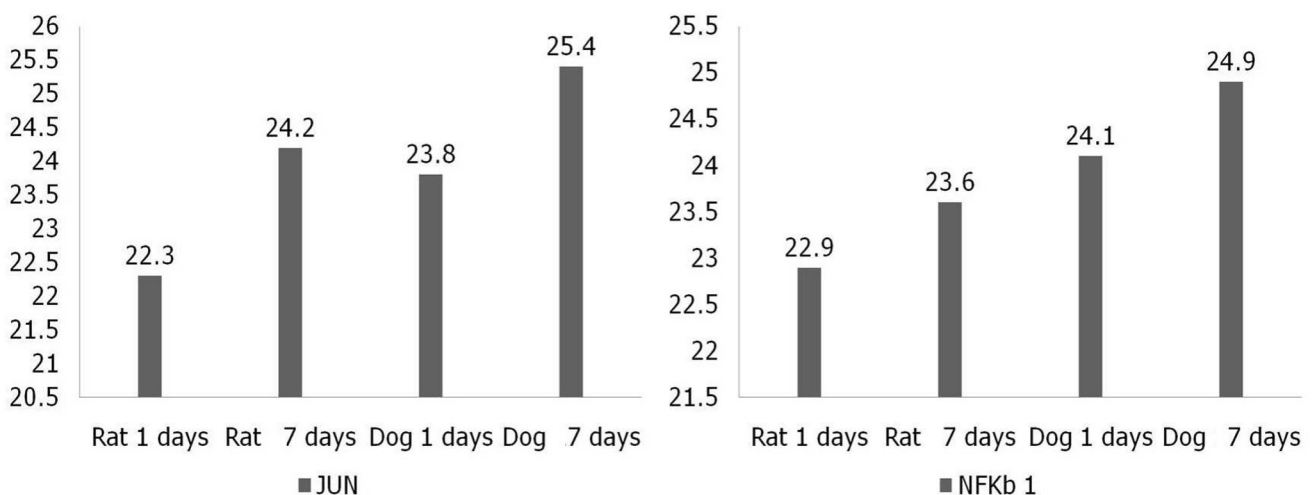


Fig. 6. This graphs show the factors related with apoptosis. Also, there was no significant differences after spinal cord injury($p > 0.05$).

추(central pattern generator; CPG)의 흥분성 증가, 그리고 일부 Nor-1, Nor 77, c-fos와 같은 자발적 활성화 등이 중요한 기전으로 생각된다.

Interleukin-2(IL-2)는 CD4 cell로 알려진 T-cell에 의해 몸속에서 생성되는 특별한 단백, 즉 사이토카인이다. 활동 기전은 면역 조절기로서 면역계를 지지 하는 것이다. 이는 CD4 세포의 수(count)와 생성(production)의 증가로 감염에 저항하기 위한 기전이다. 본 연구에서 IL-2의 변화는 척수 손상후 시간이 경과함에 따라 증가하였고 그 변화의 비는 두 종간에 통계학적 차이는

없었다. 실험 계획이 1일과 7일째만을 보는 것이었기에 과연 이 기간 중 어느 기간이 최고점(peak) 이었는지는 알 수 없었다.

Tumor necrosis factor는 단구세포와 대식세포에 의해 일차적으로 생성되는 사이토카인(cytokine)이다. 이는 조직 내의 활액막 세포와 대식세포에서 발견된다. 척수 손상 후 대식세포의 증가를 볼 수 있고 이의 증가는 세포사멸 등과 밀접하여 최근에는 대식세포의 증가를 막는 시도가 척수 신경의 재생에 도움이 되는 것으로 알려져, 여러 기관에서 phase I과 II 연구를 진행 중이다. 이 사이토카인은 IL-1, IL-2, 그리고 GM-CSF를 자극하며,

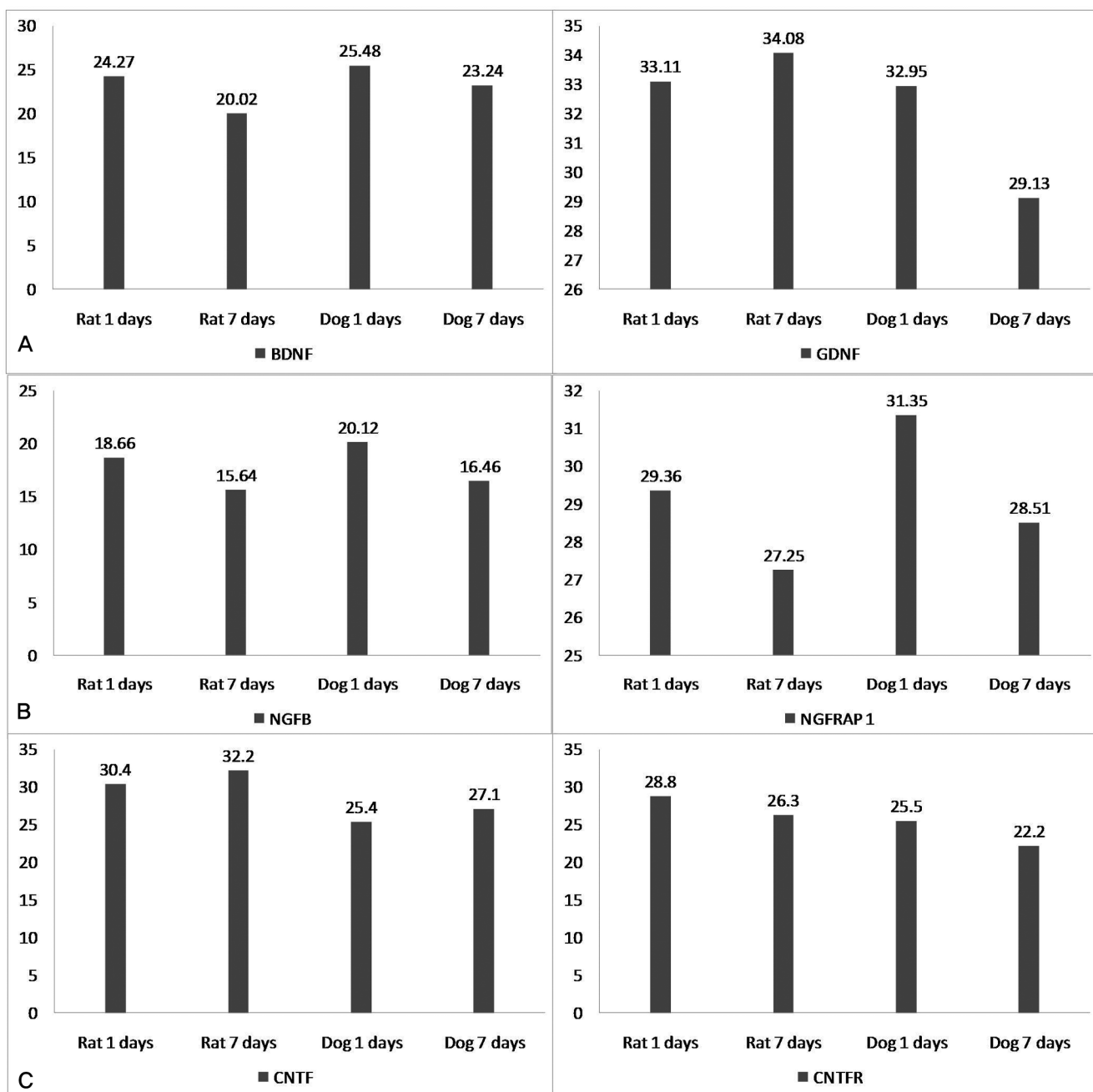


Fig. 7. This graphs show the changes of several neurotrophic factors. **(A)** GDNF was reduced more, statistically in dogs($p < 0.05$). **(B),(C)** These factors were no statistically differences($p > 0.05$).

IL-1에 의해 조직 손상을 증가시킨다. 또한 섬유모세포와 연골 세포들에 의한 collagenase를 유도하고, 결합 분자의 역할 외에도, HLA class 2 발현 조절의 역할도 있다. TNF의 수용체는 혈액막과 말초 혈액, 등 여러 단핵 세포에 존재한다. 또한 TNF의 용해성 수용체도 존재하며 용해성 TNF 수용체는 TNF와 결합하여 TNF의 수를 감소시키고 이로 인해 단핵 세포를 활성화시킬 수 있는 수가 줄어든다. 따라서 그들은 자연적인 억제제로 활동한다. 용해성 수용체 수치의 발생과 범위는 질환의 활성도와 상관 관계가 있다.

척수 손상 시에는 염증반응을 일으키는 사이토카인인 TNF가 체외(in vitro)에서 희소돌기아교세포와 신경세포에서 세포 사멸을 일으킨다. 생체 내에서 희소돌기아교세포의 지연된 세포 사멸이 TNFRI의 과발현에 의해 일어나며, TNFRI과 다른 관련 수용체들의 사멸 부위(death domain)에 관한 연구에서 caspase-8

과 caspase-3의 활동으로 세포사멸이 일어난다는 세포 신호 전달 시스템이 보고되었다.⁹⁾ 양 등¹⁰⁾은 신경 세포에서의 TNFR 발현은 신경 세포의 생존과 연관이 있다는 결과를 발표하였다. TNFRI 유전자는 정상 척수의 신경 세포에서 발현되지 않지만, TNFRII 유전자는 상당수의 신경세포에 발현되었다. 이는 신경 세포에서 TNFRI과 TNFRII의 기능이 다를 수 있음을 보여준다. TNFRI은 세포 사멸과 관계 있으며, TNFRII는 신경 세포 생존과 관계 있다는 보고도 있지만, TNFRI과 TNFRII 유전자를 타락(knock-out) 시킨 쥐에 척수 손상을 준 실험 결과는 TNFRI 및 TNFRII 모두 신경세포를 보호하는데 관련한다고 밝혀졌다.¹¹⁾ 본 실험에서 TNF의 변화는 역시 시간이 경과할수록 두 종 모두 증가하였으며 증가 정도는 두 군간에 차이가 없었다. 그러나 TNFRSF11B의 변화 정도는 두 종간에 통계학적 차이가 없었으나, TNFRSF13B는 쥐에서 평균 1.199, 개에서는 평균 1.389로 의미 있는 차이를 보였다. TNFRII가 개에서 보다 많이 증가한 점이 아주 흥미로운데 이것이 종간의 차이인지 아니면 다른 염증 요소가 관여한 것인지는 명확하지 않다.

세포가 유전자에 의해 제어되어 죽는 방식의 한 형태로 세포 사멸(apoptosis)이 있다. 세포 사멸은 일반적인 생리학적 변화이기도 하며, 세포 증식과 세포 발달을 겪는 중 조직에서 일정한 세포 수를 유지하기 위한 반응이다. 세포 사멸의 조절은 어떤 경로는 세포를 사멸시키고 어떤 경로는 세포의 생존을 촉진하기도 하는 다양한 신호전달에서 통합된 활성도에 의해 중재된다.^{8,12)} 이번 연구에서는 c-Jun과 nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells(NF- κ B)를 이용하여 두 종간의 세포 사멸의 변화를 알아보려고 하였다. c-Jun은 c-Fos와 결합되어 AP-1 조기 반응 전사 인자(transcription)를 형성하는 유전자와 단백질의 명칭이다. 이는 세포 사멸과 관계된 JNK 경로에 의해 이중 인산화(double phosphorylation)를 통해 활성화되나, 인산화(phosphorylation)와 독립적인 기능도 가지고 있다.¹³⁾ c-Jun 타락(knockout)은 치명적이나, 인산화가 되지 않는 c-Jun이 변이된 유전자 교합 동물(transgenic animals)은 생존할 수 있었다. 이 인자의 신경 재생과 관계된 부분은 신경아교 섬유성 산성 단백질(glial fibrillar acid protein; GFAP)의 상관 관계로 알 수 있다. 즉, 이 인자의 증가는 신경 변성 또는 신경 재생의 억제와 밀접한 관련이 있는 것이다.

NF κ B는 1986년 최초 발견 당시 kappa 면역글로불린 경쇄 변이(kappa variety of the immunoglobulin light chain)를 조절하는 인자로 알려졌다. “NF κ B family”는 두개의 아과(subfamily)로 나뉜다. NF κ B의 활성화는 I κ B 억제 단백질(inhibitory I κ B protein)들에 의하여 엄격히 조절된다. I κ B protein들은 NF κ B에 따라 몇 가지가 있는데 그것들은 각각의 NF κ B 이합체(dimer)에 대하여

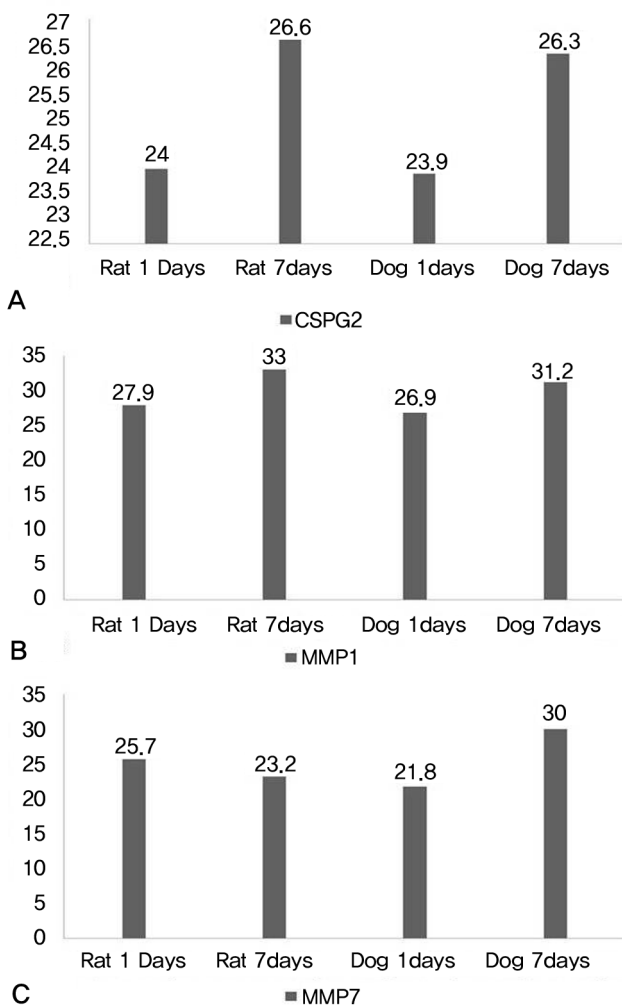


Fig. 8. This graphs show the changes of factors related with extracellular matrix. (A), (B) These factors were all increased after spinal cord injury and there was no statistical differences($p>0.05$). (C) MMP7 was reduced in rat, but increased in dog, also there was significant difference in changes(<0.05).

상이한 친화도(affinity)를 가지고 있다. 일반적으로 대부분의 세포에서 NF κ B는 “잠재성(latent)” 상태로 존재하거나 혹은 불활성화된 상태로 I κ B 복합체(complex) 형태로 세포질에 존재한다. NF- κ B는 거의 모든 동물 세포 형태에서 발견되고 스트레스(stress), 사이토카인, 자유 라디칼(free radical), 자외선 조사 그리고 세균이나 바이러스성 물질에 의한 자극에 반응한다. NF- κ B는 감염에 대한 면역 반응 조절에서 결정적 역할을 한다. 역으로, NF- κ B의 부적절한 조절은 암, 염증과 자가면역 질환, 패혈성 쇼크(septic shock), 바이러스 감염, 그리고 부적절한 면역 발달과 연관되어 있다. NF- κ B는 연접 과정(process of synaptic) 과도 연관이 있고 이 인자의 활성화에 따라 신경 세포의 사멸 조절도 가능하다. 본 연구에서 아주 흥미로운 결과를 얻을 수 있었다. JUN과 NFK β 1, 두 인자의 변화 정도는 척수 손상 1일째와 7일째 모두 의미 있는 차이를 보이지 않았고, JUN의 활성도는 척수 손상 후부터 7일째까지 안정 수준을 유지하므로 척수 손상 7일까지 지속적인 세포사멸이 이루어짐을 암시한다. 이와 동시에 세포 사멸을 방지하는 NFK β 1 역시 활성도가 증가함을 알 수 있었다. 즉, 한쪽에서는 신경 조직의 파괴, 그리고 다른 면에서는 보호의 상반 작용이 동시에 일어난다는 것이며 이는 설치류와 포유류의 두 종 모두에서 동일하다는 결론을 낼 수 있다는 것이다. 따라서 어느 쪽을 방어하고 촉진하느냐에 따라 신경 보호 작용의 가부를 결정할 수 있을 것이다. 즉, 한 쪽에서는 신경 조직의 파괴, 그리고 다른 면에서는 보호의 상반 작용이 동시에 일어난다는 것이며 이는 설치류와 포유류의 두 종 모두에서 동일하다는 결론을 낼 수 있다는 것이다.

신경양양인자(neurotrophic factors, NTFs)는 신경 세포의 성장, 분화, 그리고 생존을 돕는 폴리펩타이드(polypeptide)이다. Nerve growth factor(NGF)는 최초로 발견된 신경양양인자이며 다른 인자들로는 brain-derived neurotrophic factor(BDNF), neurotrophin-3(NT-3), 그리고 neurotrophin-4/5(NT-4/5)이 있다. Neurotrophin은 trk 유전자 군의 특정 수용체에 결합함으로써 작용한다.¹⁴⁾ 활성화된 trk 유전자는 세포내 신호를 전달시켜 유전자를 발현시키고, 신경 세포의 형태와 기능을 변화시킨다.¹⁵⁾ 최근의 연구들은 수많은 다른 NTFs를 특징화 하는데 초점이 맞춰져 왔다.¹⁶⁾ 본 연구에서는 뇌유래 신경양양인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF), 신경아교 세포유래 신경양양인자(glial cell-line-derived nerve factor, GDNF), 신경성장인자(nerve growth factor, NGF), 그리고 섬모양양인자(ciliary neurotrophic factor, CNTF)만을 실험하였다. 추후 insulin-like growth factors (IGFs), fibroblast growth factors (FGFs) 등에 관해서도 동일한 실험을 시행할 예정이다.

BDNF는 신경성장촉진인자중의 하나인 작은 이합체 단백질

(dimeric protein)이며 성장한 동물의 뇌에서 광범위하게 발견된다. 이는 신경 계통의 유지와 발달에 관여하며 특히 신경전달물질의 조절이나 신경 가소성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁾ BDNF의 유전자는 11번째 염색체의 장완 중 p13에서 p14사이에 위치하고 있으며 현재 세 가지 다형성이 밝혀져 있는데 이 인자의 과발현 또는 저발현 모두 신경 재생에는 좋지 않은 영향을 주는 것으로 밝혀졌다.¹⁸⁾

또한 최근에는 siRNA 기법을 이용하여 통증에 대한 BDNF의 발현 연구가 이루어진 바, 소교세포에서의 BDNF의 발현이 저해될 경우, 통증 과민화 현상이 줄어들 뿐만 아니라 laminar I 영역 신경 세포내 이온의 변화가 감소하는 것을 발견하였다. 이러한 발견은, 활성화된 소교세포에서 유리되는 BDNF에 의하여 laminar I 신경 세포의 신경전달물질에 대한 흥분성이 증가하며, 이에 따라 통증의 과민화가 발생한다는 새로운 신경병성 통증발생 가설을 제시한다. 이러한 연구 결과는, 소교세포에서 BDNF의 발현을 저해하면, 말초신경 손상에 의한 신경병성 통증이 발생 또한 저해될 수 있다는 가능성을 보여주고 있으며, 이러한 관점에서 척수 손상 후 발생하는 신경병성 통증을 조절하는 약물 개발에 이 인자의 중요성이 있는 것이다.^{19,20)}

GDNF family of ligands(GFL)는 4 가지 신경영양인자들로 이루어져 있다. GDNF, NRTN, ARTN, 그리고 PSPN이 그것이다.²¹⁾ GFL은 세포 생존, 신경 돌기 성장, 세포 분화와 세포 이동을 포함하는 여러 가지 생물학적 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 특히 이번 실험에서 사용된 GDNF에 의한 신호는 도파민성(dopaminergic) 신경 세포의 생존을 항진 시키는 것으로 알려져 있다.²²⁾ GDNF는 파킨슨 병의 병인 및 치료 연구에 많이 이용되는 신경영양인자인데, 이들의 연구 결과를 간략히 종합하여 보면 GDNF는 중추 운동 신경세포의 강력한 생존 인자이고 외상성 또는 퇴행성 모두를 포함하는 다양한 척수 질환의 치료에 임상적 중요성을 지닐 수 있다.¹⁹⁾

이번 실험에서 척수 손상 후 BDNF는 두 종 모두 시간이 경과하면서 감소하였으며 두 종간에 의미 있는 차이는 관찰되지 않았다. 이에 반하여 GDNF는 쥐에서는 시간이 경과할수록 변화의 폭은 거의 없었으나 개에서는 통계학적으로 의미 있게 감소하였다. 두 인자가 신경 재생에 아주 중요한 인자임을 고려할 때, 포유류에서의 GDNF의 감소는, 설치류에서 시간이 지날수록 자연 신경 회복이 되는 신경 가소성과 일부 연관이 있을 것으로 추정하나 이 부분에 대하여는 추후 신경 가소성만을 주로 하는 실험 계획이 있어야 할 것이다.

신경성장인자(nerve growth factor, NGF)는 교감신경 신경세포의 성장과 그 형태 및 기능을 유지하는데 필수적인 단백질이다. 이는 사람을 포함하여 많은 동물의 혈장(plasma)과 다른 조

직 세포에 존재한다. 분자량은 13,000g/mol이고 α , β 및 γ 로 다시 나눈다. β -unit는 모든 신경에서 성장 작용을 촉진시키나 α 와 γ -unit는 그 생물학적 기능을 알 수 없다. 따라서 본 실험에서는 NGF β 를 이용한 것이다. NGF는 교감 신경세포와 감각 신경세포의 생존과 유지에 중요하다. 이는 신경세포의 사멸을 막는 역할을 하며 축색의 성장을 유발한다. NGF가 높은 친화도의 tyrosine kinase 수용체인 TrkA에 결합하면, TrkA를 인산화시켜, PI 3 Kinase, ras, 그리고 PLC 신호 경로를 활성화시킨다. NGF의 전구 물질인 pro-NGF 역시 그 풍부함 때문에 세포 사멸과 신경영양 특성을 갖고 있다.²³⁾ 이번 실험에서 이 물질의 감소는 두 종 모두에서 의미 있는 차이 없이 시간이 경과할수록 감소하는 양상을 보였다. 즉, BDNF, GDNF, 그리고 NGF β 역시 감소하는 것으로 보아 신경영양인자의 증가 시도가 신경 재생에 아주 중요함을 다시 확인할 수 있었다. 또한 본 실험에서 시행한 염증과 관련된 사이토카인의 결과와 비교하여 보면 IL-2, TNF의 증가가 NGF의 감소를 유도한 것으로 추정된다. 즉, 염증 사이토카인의 발현과 신경영양인자의 발현은 상반관계가 있음을 알 수 있었다.

섬모영양인자(ciliary neurotrophic factor; CNTF)는 인체 내에서 CNTF 유전자에 의해 부호화(encode)되는 단백질이다. 이 유전자에 의해 부호화되는 단백질은 성상세포(astrocyte)를 포함하는 특정 신경 집합의 신경 전달 물질의 합성과 신경 돌기 성장을 촉진 하는, 신경계에서 그 활동이 국한되는 호르몬이면서 신경 성장 인자이다.²⁴⁾ 이 단백질은 신경 세포와 희소돌기세포(oligodendrocyte)의 강력한 생존 인자이면서 염증 과정 중의 조직 파괴를 감소시키는 것과 관련이 있다.²⁵⁾ 이 실험에서는 아주 결과가 복잡하데, CNTF는 시간이 경과할수록 증가하나 그 수용체는 오히려 감소하는 양상을 보였다. CNTF의 증가는 성상세포의 증가를 반영하는 것이 아닌가 하는 추론과 함께 CNTFR의 감소가 결국 신경 재생에 방해 인자로 작용할 것으로 추정된다.

모든 인자와 그 수용체의 변화는 항상 일치하지 않으며 그 이유는 서로 다른 기능이 존재하거나, 이 수용체가 이중 결합이 가능한 수용체일 수 있기 때문이다. 이 부분에 대한 추가적인 연구는 아주 흥미롭고 의미 있는 결과를 제시할 수 있을 것이다.

과거의 여러 체외(in vitro) 연구에서 신경세포의 생존, 또는 신경세포의 돌기 성장을 유도할 수 있었지만 실제 신경 회복의 제한을 일으켰던 가장 큰 이유는 척수 손상 후 발생하는 아교 반흔이다. 최근에 아교반흔은 세포분자적 장애물(molecular barrier)로 설명되고 있으며, 당단백(glycoprotein)인 다양한 분자는 신경의 재생을 방해하는 세포외 기질(extracellular matrix), 즉 아교 반흔의 주변부에서 발견되고 있다.²⁶⁾ 신경성 손상 부위에서

세포 구성 물질에 의해 합성된 억제성 물질로는 콘드로이틴 황산 단백당(CSPG), neurocan, versican, brevican, phosphocan이 있는데 이것들은 성장 촉진 물질인 라미닌(laminin)에 결합하여 성장성의 콘 모양 수용체인 인테그린에 접촉하는 것을 차단하여 신경 돌기가 밖으로 성장하는 것을 막는다고 알려지고 있다.^{27,28)} 양과 홍 등^{5,29)}은 CSPG의 발현 변화를 RT-PCR을 이용하여 개와 쥐 모두에서 척수 손상 후 증가함을 보고하였고, 칼슘경로 차단제와 메틸프레드니솔론의 투여 등으로 CSPG의 감소를 발표하였다. 이번 실험에서는 CSPG의 변화를 정량적으로 분석하였는데 두 종 모두에서 증가하는 양상을 보여 이전의 실험 결과와 동일하였다. 또한 종간의 차이도 없어 의미 있는 결과를 보였다.

마지막으로, 세포외 기질과 관련된 인자로 MMP1과 MMP7을 실험하였다. MMP 인자들(family)은 관절염과 전이(metastasis)와 같은 질환의 진행 과정뿐 아니라 배아 발달, 재생산, 그리고 조직의 재형성과 같은 정상 생리적 과정 내의 세포외 기질의 파괴와 연관된다. 대부분의 MMP들은 세포외 단백질 분해 효소에 의해 파괴될 때 활성화되는 비활성 전단백질(proprotein)의 형태로 분비된다. 이 실험에서 MMP1의 증가는 세포외 기질 파괴를 암시하는 소견으로 쉽게 이해가 되나, MMP7은 쥐에서는 시간이 경과할수록 감소하고 개에서는 증가하는 양상을 보였으며 두 종간에 의미 있는 차이를 보여 세포외 기질을 변화시킬 수 있는 다른 요소가 두 종간에 있을 것으로 생각된다.

신경영양인자를 중심으로 이번 실험을 종합하여 보면 염증 인자와 세포외 기질 인자의 변화는 서로 다르게 작용하는 것이 아니라 인자들간 상호 작용하는 것으로 확인되었다.

한번 발달하고 있는 신경세포가 신경 세포 돌기까지 성장을 하려면, 발달하고 있는 같은 형태의 다른 신경세포와 제한된 신경영양인자의 공급에 대해 경쟁해야 할 것이다. 신경영양인자가 신경세포의 돌기에 국한된 특정 세포 표면 수용체에 작용하여야 하기 때문에, 신경 손상 후 신경영양인자의 필요 농도가 증가할 때 이 수요를 맞추어 공급할 수 있으면 신경 재생에 훨씬 유리한 것이고 이에 미치지 못하면 신경 회복에 불량한 것이다. 즉, 상호생물학적인 측면으로 접근할 때 종양괴사인자(tumor necrosis factor; TNF)와 같은 인자들이 중요하고 이들이 방아쇠 같은 역할을 할 것이다. 그러나 처음 예상보다 그 이상으로 복잡성과 다양성이 있어 향후 더 많은 연구가 시행되어야 할 것이다.

정상 신경세포의 분화와 생존에 강력한 신경영양인자의 효과는 이런 인자들이 척수 손상 후 세포사멸 등 신경세포를 파괴하는데 있어 신경세포의 생존과 기능을 향상시키는데 사용될 수 있을 것이다. 이번 실험에서 쥐와 개를 동시에 대상으로 한 실험은 현재까지 없었으며 실험의 결과를 볼 때 척수 손상 후 급성기 중 일주일까지 염증, 세포사멸, 신경영양인자, 그리고 세포외 기

질의 연구에 일부 차이가 있음을 알 수 있어 향후 실험 계획 중 동물 모델의 선정에도 많은 도움을 줄 수 있을 것이다. 그리고 본 실험에서 나타난 차이에 대한 완전한 해석이 아직 이루어지지 않아 향후 인간에게 적용시킬 동물 모델이 포유류라고 단정 짓긴 어려우나 설치류와 포유류의 분자 생물학적 차이점을 발견하고 그 분석을 시도했다는 점에서 본 실험의 의미가 있을 것이다. 향후 보다 체계적이고 많은 개체를 이용한 연구를 통해 추가적으로 규명해야 할 부분도 있는 것이 사실이다.

결론

척수 손상 후 신경영양인자의 발현과 염증 인자의 변화, 세포 사멸인자의 변화, 세포외 기질과 관련된 인자의 변화 등을 살펴보고 그 변화의 의미를 알아보고자 쥐와 개를 이용한 척수 손상 모델에서 RT² profiler PCR array를 이용하여 실험하였다. 운동학적 평가는 통계학적 차이는 없었다. 실험군에서의 쥐나 개 모두에서 척수 손상 후 척수는 부종, 출혈 및 괴사를 나타냈고, 운동 신경세포의 감소 변화 정도는 동물 간에 차이가 없었다.

염증 인자와 세포외 기질 인자의 변화는 서로 다르게 작용하는 것이 아니라 상호 작용하는 것이며, 척수 손상 후 급성기 중 일주일까지 염증, 세포사멸, 신경영양인자, 그리고 세포외 기질의 연구에 실험 동물간에 일부 차이가 있음을 알 수 있어 향후 실험 계획시 동물 모델의 선정 자료로 활용할 수 있을 것이며 이번 연구에서 나타난 차이에 대한 추가적 연구가 필요할 것이다.

REFERENCES

1. Lee JK. Pathophysiology of acute spinal cord injury. *J Korean Soc Spine Surg.* 2009;16:64-70.
2. You JW, Sohn HM. Recent advances in the pathophysiology and treatment of acute spinal cord injury. *J Korean Soc Spine Surg.* 2008;15:204-13.
3. Fernandez E, Pallini R, Marchese E, et al. Experimental studies on spinal cord injuries in the last fifteen years. *Neurol Res.* 1991;13:138-59.
4. West NR, Leblanc V, Collins GH. Support of axonal regrowth by endogenous mechanisms following spinal cord injury in adult rats. *Neuropathology.* 2001;21(3):188-202.
5. Yang JY, Lee HH, Lee JK. The Impact of Combined Treatment with Aminoguanidine and Methylprednisolone on Neurological Recovery after Spinal Cord Injury. *J Korean Orthop Assoc.* 2007;42:444-52.
6. Becker D, Sadowsky CL, McDonald JW. Restoring function after spinal cord injury. *Neurologist.* 2003;9:1-15.
7. Gonçalves L, Silva R, Pinto-Ribeiro F, et al. Neuropathic pain is associated with depressive behaviour and induces neuroplasticity in the amygdala of the rat. *Exp Neurol.* 2008;213:48-56.
8. Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, Masters JN, Beattie MS. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med.* 1997;3:73-6.
9. Akassoglou K, Bauer J, Kassiotis G, et al. Oligodendrocyte apoptosis and primary demyelination induced by local TNF/p55TNF receptor signaling in the central nervous system of transgenic mice: Models for multiple sclerosis with primary oligodendroglialopathy. *Am J Pathol.* 1998;153:801-13.
10. Yang JY, Lee JK, Kim KT, Lee HJ, Byun BN, Ahn SH. The Expression and Function of the Tumor Necrosis Factor Receptor I (TNFR1), TNFR2, and X-Linked Inhibitor of Apoptosis Genes after Spinal Cord Injury in Rats. *J Korean Soc Spine Surg.* 2004;11:14-23.
11. Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene.* 1998;17:3261-70.
12. Johnson Jr EM, Greenlund LJ, Akins PT, Hsu CY. Neuronal apoptosis: current understanding of molecular mechanisms and potential role in ischemic brain injury. *J Neurotrauma.* 1995;12:843-52.
13. Olson L. Medicine: clearing a path for nerve growth. *Nature.* 2002;416:589-90.
14. Conover JC, Erickson JT, Katz DM, et al. Neuronal deficits, not involving motor neurons, in mice lacking BDNF and/or NT4. *Nature.* 1995;375:235-8.
15. Coumans JV, Lin TT, Dai HN, et al. Axonal regeneration and functional recovery after complete spinal cord transection in rats by delayed treatment with transplants and neurotrophins. *J Neurosci.* 2001;21:9334-44.
16. Davies AM. Role of neurotrophins in the developing nervous system. *J Neurobiol.* 1994;25:1334-48.
17. Hofer MM, Barde YA. Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death in vivo. *Nature.* 1988;331:261-2.
18. Baker-Herman TL, Fuller DD, Bavis RW, et al. BDNF is necessary and sufficient for spinal respiratory plasticity following intermittent hypoxia. *Nature Neurosci.* 2004;7:48-55.
19. Lawrence JM, Keegan DJ, Muir EM, et al. Transplantation of Schwann cell line clones secreting GDNF or BDNF into the retinas of dystrophic Royal College of Surgeons rats. In-

- vest Ophthalmol Vis Sci. 2004;45:267-74.
20. Longo FM, Holtzman DM, Grimes ML, Mobley WC. Nerve growth factor: actions in the peripheral and central nervous systems. In: Fallon J, Loughlin S, eds. Neurotrophic factors. New York: Academic Press. 1993. 209-56.
 21. Arenas E, Trupp M, Akerud P, Ibanez CF. GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo. *Neuron*. 1995;15:1465-73.
 22. Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*. 1993;260:1130-2.
 23. Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*. 2001;294:1945-8.
 24. DeChiara TM, Vejsada R, Poueymirou WT, et al. Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell*. 1995;83:313-22.
 25. Sleeman MW, Anderson KD, Lambert PD, et al. The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha. *Pharmacologica acta Helvetiae*. 2000;74:265-72.
 26. Busch SA, Silver J. The role of extracellular matrix in CNS regeneration. *Curr Opin Neurobiol*. 2007;17:120-7.
 27. Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull*. 1999;49:377-91.
 28. Sandvig A, Berry M, Barrett LB, Butt A, Logan A. Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia*. 2004;46:225-51.
 29. Hong CH, Yang JY, Lee JK, Song HS. The Effect of Methylprednisolone and Riluzole on Axonal Growth after Acute Spinal Cord Injury in Rats. *J Korean Orthop Assoc*. 2008;43:783-90.

쥐와 개의 척수 손상 모델에서 신경영양인자의 변화 및 의미

송인수*, 양준영 • 이준규 • 주용범 • 차수민

충남대학교 의학전문대학원 정형외과학교실, 충남대학교 의과학 연구소, 대전 선병원 정형외과*

연구방법: 실험적, 전향적 연구

목적: 급성 척수 손상 후 다양한 인자의 변화가 쥐와 개에서 어떻게 일어나는 지 동시에 알아보고자 하였다.

선행문헌의 요약: 다른 종(種)간의 급성 척수 손상 후 다양한 신경 인자(염증 사이토카인, 세포 사멸과 연관된 인자, 신경영양인자, 세포외 기질과 연관된 인자)들의 변화를 비교하는 연구는 지금까지 없었다.

대상 및 방법: 쥐의 10번째 흉추 위치에서 추궁 절제를 시행 후, 인위적 척수 손상을 유발하였고 개에서는 10번째와 11번째 흉추에서 추궁 절제, 척수 손상을 유발하였다. 운동학적 평가는 변형된 Tarlov's scale을 이용하였다. 염증 사이토카인(IL-2, TNF, TNFRSF11B, TNFSF13B), 세포 사멸과 연관된 인자(JUN, NFKB1), 신경영양인자(BDNF, GDNF, NGF, NGFRAP1, CNTF, CNTFR), 세포외 기질과 연관된 인자(CSPG2, MMP1, MMP7) 분석에 RT² profiler PCR array를 이용하였다.

결과: IL-2, TNF, TNFRSF11B는 시간이 경과함에 따라 증가하였고 두 종간에 통계학적 차이는 없었으나 TNFSF13B는 통계학적으로 의미 있는 차이를 보였다. BDNF는 두 종 모두 시간이 경과하면서 감소하였고 GDNF는 개에서는 확연히 감소하였고 이는 통계적으로 의미 있는 차이를 보였다. NGF, CNTF와 그 수용체들은 종간의 뚜렷한 차이는 관찰되지 않았다. MMP1은 두 종 모두에서 증가하였으나 MMP7은 쥐에서는 시간이 경과할수록 감소하고 개에서는 증가하는 양상을 보였으며, 두 종간에 의미 있는 차이를 나타내었다.

결론: 신경영양인자를 중심으로 염증 사이토카인과 세포외 기질 인자의 변화는 상호 작용하는 것이며, 척수 손상 후 급성기 중 일주일까지 염증, 세포 사멸, 신경영양인자, 그리고 세포외 기질의 연구에 실험 동물간에 일부 차이가 있음을 알 수 있어 향후 실험 계획 중 동물 모델의 선정 자료로 활용할 수 있을 것이다.

색인 단어: 척수 손상, 염증 사이토카인, 세포 사멸 인자, 신경영양인자, 세포외 기질 인자

약칭 제목: 척수 손상 후의 신경인자들의 변화