

Nylon Thread를 이용한 mouse 에서의 Transient middle cerebral artery occlusion (MCAO) model 확립 Transient Middle Cerebral Artery Occlusion Model in Mouse using Nylon Thread

임병철*, 성지희*, 김하나**, 박승우*

강원대학교 의학과대학원 신경외과학교실*, 강원대학교 의학과대학원 진단검사의학교실**

Byung-Chul Lim(malguns@naver.com)*, Ji-Hee Sung(sung6164@gmail.com)*,
Ha-Na Kim(hana7862@naver.com)**, Seoung-Woo Park(nsped@kangwon.ac.kr)*

요약

서론: 최근 노년층에서 뇌졸중 발병률이 증가하고 있다. 현재 뇌졸중 치료제 및 방법이 많이 개발되어 있으나 치료 후에도 후유증 등이 많이 남게 된다. 그래서 아직도 많은 과학자나 임상 의사들이 이를 치료하기 위한 약물 및 방법을 연구하고 있는 실정이다. 많은 연구 중 뇌졸중 치료 연구를 위한 표준화된 실험 동물연구는 드물며, 표준화된 Nylon thread를 이용한 중대뇌동맥 폐쇄모델(MCAO, middle cerebral artery occlusion)의 성공률에 대한 연구는 거의 없다

방법: 본연구는 0.18±0.02mm의 지름을 가진 5-0 Nylon thread를 중대뇌동맥에 삽입하였다. 60분 동안 삽입한 후에 봉합해 놓았던 부위를 다시 절개하여 Nylon thread를 빼내고, 막았던 혈관의 매듭을 풀어주어, 다시 혈액이 공급되게 하였다. 그로부터 23시간 후에 뇌를 내어 1mm 두께로 자른 후 1.5% TTC (2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride)로 15분간 염색하고, 4% PFA(paraformaldehyde)로 15분 동안 고정하였다.

결과: Nylon thread를 삽입하여, MCA occlusion 50마리, ICA occlusion 14마리, 제대로 된 MCAO model보다 좀 더 깊게 들어간 distal MCAO model 36마리, 너무 깊은 MCA나 ACA까지 들어가서 상보적인 괴사를 나타내는 occlusion model 1마리, 그리고 경색이 일어나지 않은 마우스 50마리를 확인하였다.

결론: 이에 본 연구에서는 Nylon Thread를 생쥐의 무게에 따라 32~36g인 생쥐는 9mm로 삽입하여주고, 37~40g인 생쥐는 9mm+0.5mm의 길이로 삽입하여서 1hr의 occlusion과 23hr의 reperfusion을 주어 생쥐를 TTC 염색을 통하여 괴사가 일어난 부분을 확인하였고, 생쥐에서 가역적인 뇌혈관 경색으로 151마중 101마리에서 뇌경색을 유도 할 수 있었다(66.9%).

■ 중심어 : | 뇌경색 | MCAO model | 뇌졸중 | Nylon thread |

Abstract

Introduction: In aged people, stroke incidence is increased. But standardized experimental animal protocol study for the research of stroke therapy is rare. There is little report on the success rate of cerebral artery occlusion model using standardized Nylon thread length of precise thread end-size controlled.

Method: In this study, the operator intended the occlusion of middle cerebral artery (MCA) using 0.18±0.02mm end 5-0 Nylon thread. Middle cerebral artery occlusion was induced for 60min under isoflurane anesthesia. After 60min, the operator removed the Nylon thread and reperfusion was induced for 23hrs. The mice was killed 23hrs after reperfusion and infarction area of brain was confirmed by 1.5% TTC (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) staining.

Results: According to end size and insert length of Nylon thread, Middle cerebral artery occlusion (n= 50), internal carotid artery occlusion (n= 14), distal middle cerebral artery occlusion (n= 36), anterior cerebral artery (n= 1) were induced. And no infarction (n= 50) was observed.

Conclusion: According to weight of mice, the operator induced reversible cerebral artery occlusion model by different insert length (30.0~36.9g : 9.0mm, 37.0~40.0g : 9.5mm) of Nylon thread. Success of cerebral artery occlusion model was confirmed by checking infarction area using TTC staining. The success rate (66.9%, 101/151) of reversible cerebral artery occlusion model in the mouse and the operational conditions are shown.

■ keyword : | Ischemia | Reversible Cerebral Artery Occlusion | Infarct | Reperfusion |

* 2016년도 강원대학교 대학회계 학술연구조성비로 연구하였음(관리번호-520160263)

접수일자 : 2019년 04월 15일

심사완료일 : 2019년 07월 23일

수정일자 : 2019년 07월 02일

교신저자 : 박승우, e-mail : nsped@kangwon.ac.kr

I. 서론

뇌졸중(Stroke)은 cerebrovascular accident (CVA) 라고도 불리며 뇌조직의 경색을 유발할 수 있는 혈전, 색전과 출혈로 뇌의 혈액순환이 급격히 저하되어 뇌의 신경기능에 장애가 나타난다. 출혈성 뇌졸중이 전체의 20%를 차지하며[1][2], 혈전 및 색전에 의한 국소적 빈혈성 뇌졸중이 전체의 80%를 차지하고 있다. 우리나라에서 사망률이 2번째로 차지할 정도로 빈도가 높은 질환으로 향후 지속적인 연구가 필요한 분야이다.

이에 연구를 위해서는 동물 모델이 필요하며, 현재는 설치류를 이용한 MCAO (middle cerebral artery occlusion) model이 뇌경색 연구에 널리 사용되고 있다. 뇌경색을 만드는 방법으로는 영구적인 뇌경색과 일시적인 뇌경색이 있는데, 영구적인 뇌경색으로 실험 할 경우는 비가역적으로 경색을 주는 것이고, 일시적인 뇌경색은 일시적으로 혈관을 막았다가 reperfusion을 유도하는 실험이다. 뇌경색 연구로는 주로 비가역적인 뇌허혈 모형을 이용해 왔었는데, 임상적으로 비가역적이고 영구적인 뇌경색 보다는 주로 가역적이며 일시적인 뇌허혈 손상을 경험하는 경우가 많기때문에, 가역적이고 일시적인 뇌경색의 모형의 개발이 필요하다. 가역적 뇌경색을 일으키는 방법으로는 두개골을 절제하여, 직접적으로 눈으로 보면서 뇌경색을 만드는 방법과[3], 수술 부위를 보지 않고 혈관 안으로 Thread를 삽입하여 경색을 일으키는 수술방법이 있다[4-7]. 두개골을 절제 하여 수술하는 경우, 수술 시간이 오래 걸리고 수술 절차에 의해 조직이 손상되는 단점은 있지만 수술 부위를 정확히 확인할 수 있어서 확실한 MCAO 모델을 만들 수 있다. 그리고 개두술 없이 Nylon thread를 이용하는 기술은 제일 처음 Koizumi에 의해 처음으로 소개 되었는데[8], 장점으로는 수술 시간이 짧다는 것과, 수술 부위의 손상이 적은 점, 그리고 간단한 수술절차를 들 수 있지만, 확실히 middle cerebral artery를 막았는지는 확인할 수는 없는 단점이 있다.

이에 본 연구에서는 Nylon thread를 이용하여 1hr의 occlusion과 23hr의 reperfusion 을 이용한 모델을 만들고자 한다[9]. MCAO 에 의한 뇌의 괴사 부위를 확인하기 위해서 1.5% 2,3,5-Triphenyltetrazolium

chloride (TTC)를 사용하여 염색하였다. TTC는 뇌경색에 의한 상해를 확인할 때 가장 흔히 사용되는 염색약으로서, 제일 처음 Jestaedt와 Sandritter (1959)에 의해 심근경색의 병변을 확인하기 위한 염색약으로 소개되었다. TTC는 미토콘드리아 내의 dehydrogenase와 반응하여 정상적으로 살아있는 세포는 붉은색을 나타내고, 괴사가 일어난 비정상적인 세포에서는 미토콘드리아 내의 dehydrogenase가 소실되어 염색이 되지 않아, 뇌경색의 범위를 확인할 수 있다는 장점이 있다.

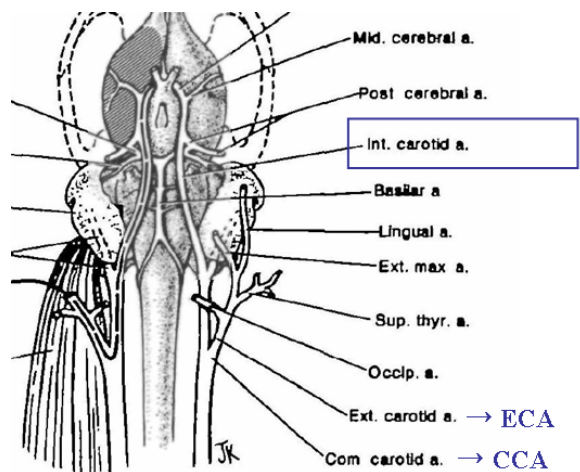


그림 1. 생쥐의 혈관 해부도
(Nylon thread를 ECA부터 시작하여 ICA를 통해 MCA 입구까지 삽입)

II. 재료 및 방법

2008년 6월부터 2008년 11월까지 151마리의 생쥐를 수술하였다. 32~40g 짜리 BKW CD-1 생쥐 수컷을 12 시간씩 light/dark cycle을 유지하였으며, 물과 사료를 공급하였다. 수술 시에는 heating pad 위에서 체온을 37°C로 유지시켜, 산소와 isoflurane을 혼합하여 흡입 마취 시킨다. 생쥐를 하늘을 향하게 눕힌 후 사지를 고정하고, 목 부위를 절개하였다. 혈관주위의 신경과 근육을 최대한 다치지 않게 하여, CCA, ECA를 찾은 후 출혈이 일어나지 않도록 6-0 mersilk (Johnson & Johnson, NJ, USA)로 매듭을 지어가며[그림 2. A~D] 흡집을 낸 ECA로 Nylon thread를 삽입하였다[그림 2. E~F]. Koizuminylon 방법을 이용하여 thread로는 5-0

nylon (AILEE Co, Korea) 을 미리 불에 가까이하여 끝을 $0.18\pm 0.02\text{mm}$ 로 만든 후 사용하였다. 9mm 정도가 혈관 안에 들어가도록 하였다. 이 정도의 삽입으로 middle cerebral artery(MCA)가 막히게 되어, MCA 폐색 모델이 만들어지게 된다. 모든 수술 절차는 10분 안에 행해졌다. 60분 동안 삽입한 후에 봉합해 놓았던 부위를 다시 절개하여 Nylon thread를 빼내고, 막았던 혈관의 매듭을 풀어주어, 다시 혈액이 공급되게 하였다. 그로부터 23시간 후에 뇌를 꺼내어 1mm 두께로 자른 후 1.5% TTC (2',3',5'-triphenyl-tetrazolium chloride)로 15분간 염색하고, 4% PFA(paraformaldehyde)로 15분 동안 고정하였다 [5][10].

수술이 모두 끝난 후에도 생쥐가 사료와 물을 먹을 수 있도록 하였다.

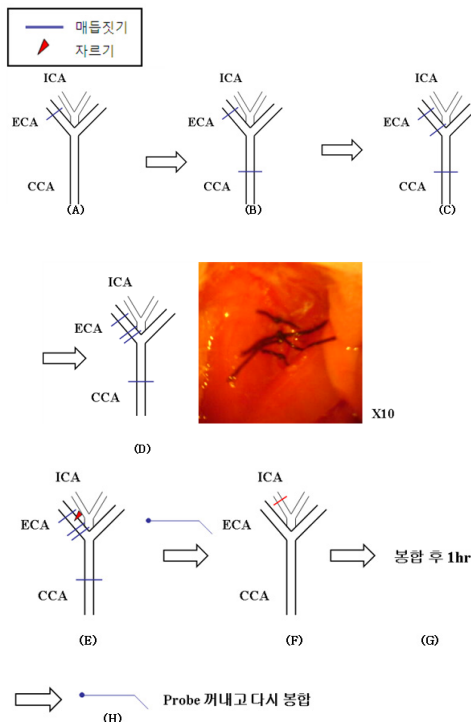


그림 2. 실험 과정 모식도

(A) ECA 뒷부분 2번 매듭; (B) CCA 1번 매듭; (C) ECA 아랫부분 1번 매듭; (D) (C)번 매듭 위 1번 매듭; (E) (A)(D) 매듭 사이 Nylon thread 들어갈 만큼 절개; (F) Nylon thread 삽입 하여 Nylon thread가 들어가는 혈관 (ICA) 를 통하여 MCA 까지 삽입; (G) 봉합 후 1시간 동안 occlusion; (H) 1시간 후 삽입한 Nylon thread 빼고 23시간 reperfusion

III. 결과

1hr occlusion을 주고 23hr reperfusion 후 TTC 염색을 하여, 괴사가 일어난 부위를 확인하였다. 총 151마리의 생쥐를 사용하여 수술한 결과, 5가지 결과를 얻었다(그림 3). Nylon thread를 삽입하여, MCA occlusion 50마리, ICA occlusion 14마리, 제대로 된 MCAO model보다 좀 더 깊게 들어간 distal MCAO model 36마리, 너무 깊은 MCA나 ACA까지 들어가서 상보적인 괴사를 나타내는 occlusion model 1마리, 그리고 경색이 일어나지 않은 마우스 50마리를 확인하였다(그림 3. A-E). 수술한 전체 생쥐 중 28마리는, 1hr occlusion과 47hr reperfusion 후 brain 염색을 하여 결과를 관찰했기 때문에, 회복되어 infarct이 나타나지 않는 것이 많았다. 20 마리는 과다출혈이나, 너무 심한 infarct으로 인해 죽었다[표 2].

표 1. 생쥐 무게에 따른 MCAO model 수

| | 32~36g | 37~40g |
|-----|--------|--------|
| 마리수 | 21 | 29 |

0.18±0.02mm size의 Nylon thread를 같은 길이로 삽입했을 때 무게에 따른 MCAO model 수

표 2. 생쥐의 죽은 원인

| Cause of death | 마리수 |
|----------------|-----|
| 심한 infarct | 11 |
| 과다출혈 | 1 |
| 이유 모름 | 8 |
| 전체 | 20 |

죽은 생쥐 전체 20마리 중, 11마리는 Nylon thread를 삽입한 후 reperfusion 하는 시간에 몸이 휘어 심한 발작을 일으키다 죽었고, 1마리는 수술도중 과다출혈로, 나머지 8마리는 정확한 이유를 알 수 없었음

IV. 고찰

큰 동물이나 작은 동물 (e.g., mice, rats, gerbils, rabbits, cats, dogs, pigs, sheep, and monkeys) 모두 ischemia model로 만들 수 있는데, 각각은 서로 장단점이 있다. 먼저, 큰 동물을 사용하면 작은 동물을 사용하는 것 보다 국소 부위의 imaging이나, functional imaging을 하기 쉽고, regional cerebral

blood flow와 metabolism도 측정하기 쉽다. 하지만 가격이 비싸고, occlusion이 명확하지 않다는 단점을 가지고 있다. 반면에 작은 동물로 모델을 만들 경우, 특히 설치류와 같은 동물은 구입하거나 유지할 때 큰 동물을 사용할 때 보다 많은 비용을 절감할 수 있다. 그 중에서도 마우스는 유전적인 변형과 조작이 쉬워, 다양한 종류가 있기 때문에 실험에 따라 알맞은 모델을 선택하여 사용하기에 더욱 좋다. 그 외에 실험 키트등도 rat에 비하여 다양하게 사용할 수 있다는 장점이 있다. 하지만 rat에 비하여 뇌가 너무 작고, 사람의 뇌와는 해부도에서나, 기능적인 면에서 차이를 나타내는 단점을 가지고 있다[11]. 과거에는 rat를 많이 사용하였으나 최근에는 유전자 변형에 대한 연구가 늘어남에 따라서 mouse를 이용한 실험이 늘어나고 있는 경향이 있다.

뇌경색을 일으키는 수술 방법으로는 두개골을 절제하여, 직접적으로 눈으로 보면서 폐색을 일으키는 수술방법이 있는데, 이는 정확하게 수술할 수 있다는 장점을 가지지만, 노출시켜야하는 부위도 많고 두개골까지 절제하여야 하는 단점이 있다. 반면에 목의 일부만 절개하여 수술 부위를 보지 않고 혈관 안으로 Nylon thread를 삽입하여 경색을 일으키는 수술방법이 있는데, 이는 목 부위의 간단한 절개만으로 수술을 할 수 있는 장점을 가지지만, 막고자 하는 부위를 정확하게 막을 수 없는 단점을 가지기 때문에 많은 연습을 하여 성공률을 높일 필요가 있다[5]. 본 연구에서는 후자인 목 부위만 절개하여 Nylon thread를 삽입하여 뇌경색을 일으키는 수술방법을 이용하여 성공률을 높이까지 어느 정도 깊이까지 즉 mouse의 몸무게에 따른 Nylon thread의 길이를 알아보고자 하였다.

적절한 MCAO model을 만들기 위해서는 0.18 ± 0.02 mm 지름의 Nylon thread가 필요하고, 또한 이 Nylon thread를 얼마만큼 삽입해야 하는지도 중요하다. Nylon thread로는 5-nylon (AILEE Co, Korea) 실을 사용하며, 실의 끝을 뜨거운 열을 사용하여 둥글게 만드는데, 이 Nylon thread 끝 지름이 infarct size를 결정하는데 큰 역할을 한다[2][10][12]. Nylon thread의 삽입 길이는 생쥐의 무게에 따라 혈관의 길이 및 두께가 각각 다르기 때문에 오차는 있지만, 보통 32~36g의 생쥐는 9mm로, 37~40g의 생쥐는

9+0.5mm 정도로 삽입하였다.

즉 이 연구에서는 Nylon thread를 이용한 효과적인 MCAO model을 만들기 위해서는 Nylon thread의 끝 지름을 0.18 ± 0.02 mm로 만들고, 32~36g의 생쥐는 9mm로, 37~40g의 생쥐는 9+0.5mm로 삽입하여 수술하면 좀 더 명확한 MCAO model을 만들 수 있었다.

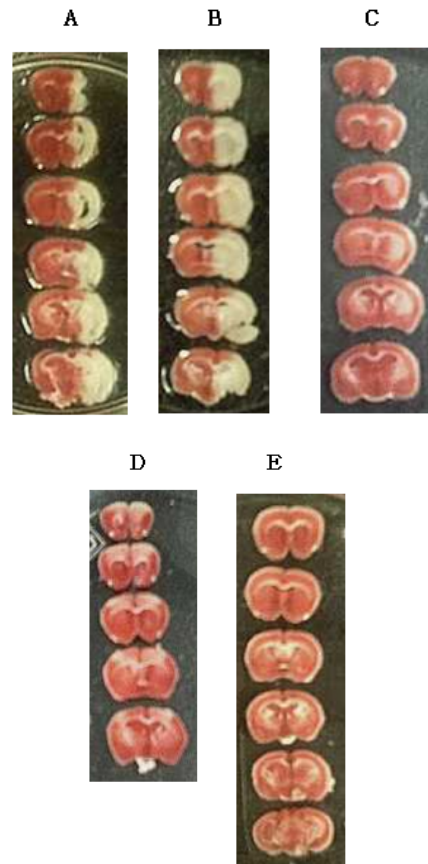


그림 3. TTC 염색 결과

Nylon thread 로 인해 뇌경색이 일어난 부위는 과색이 일어나, 염색이 되지 않음. (A) MCA occlusion model (n= 50) ; (B) ICA occlusion model (n= 14) ; (C) distal MCAO occlusion model (n= 36) ; (D) 너무 깊게 MCA나 ACA 까지 들어 가서 상보적인 과색을 나타내는 occlusion model (n=1) ; (E) No infarction 생쥐 (n= 50)

Nylon thread를 너무 조금 넣으면 ICA가 막혀서, ACA와 MCA까지 모두 막혀 infarct size가 너무 많이 나오게 되고, 너무 깊게 넣어줄 경우에는, MCA의 branch로 혈액이 흐르게 되어, infarct size가 작게 나오므로, 연습을 많이 해야 될 필요성을 느꼈다.

TTC 염색은 미토콘드리아의 탈수소효소를 염색하는 생리적 염색(physiological conditioning staining)이라고도 불린다. 다시 말해 신경세포가 사멸하게 되면 미토콘드리아에서 탈수소효소를 분비할 수 없으므로 염색이 되지 않는다. 일반적으로 TTC 염색은 허혈성 뇌손상이나 심근경색시 뇌와 심장조직을 적출하여 즉시 염색하여 경색의 크기를 비교하기 위해 많이 사용된다. 일반적으로 1.5% TTC 용액을 생리적 온도에서 염색하는 것으로 37도의 생리식염수에 1.5% TTC power를 녹인다. (이때 빛을 꼭 차단하여 함) 그리고 샘플을 용액에 담귀 15-30분간 37도씨에서 incubation하면 된다. 그리고 뇌 조직은 적출 후 30분 정도 지나면 흐물흐물 해지기 때문에 뇌조직의 병변크기(경색크기)를 비교하기 위해서는 10% FA나 4% PFA에서 4도씨에서 4시간 정도 고정 후 사진 촬영하면 된다.

수술을 마친 직후부터 마우스가 오른쪽 뒷다리를 정상적으로 사용하지 못하여, 한쪽방향으로 원을 그리며 돌아다니는 것을 확인할 수 있었다. 수술 후, occlusion을 주는 동안이나, reperfusion 하는 동안에 죽은 마우스도 있는데, 이는 저체온이나 수술 도중의 과도한 출혈과 같은 이유 때문으로 판단되었다. 그래서 그 이후에는 저체온으로 죽는 생쥐를 줄이기 위하여 occlusion을 주는 동안에는 따뜻한 pad 위에 두어 체온이 떨어지는 것을 방지하였다.

151마리 중 MCAO, ICAO, distal MCAO 까지 합해서 뇌경색을 일으킨 경우가 101마리이므로 확률은 66.9% 정도였다. 그리고 151마리에는 연구자가 처음 1주일간 성공하지 못했던 수도 포함되어 있으므로 나중에 하는 실험일수록 성공률이 높았다. 즉 처음 1주일동안은 성공이 된 경우가 없었다. 실험을 진행할수록 성공률이 점점 향상되었으므로 지금 실험을 하면 성공률은 좀 더 높일 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결론

한 사람이 같은 조건으로 수술한다고 해서 매년 같은 MCAO model이 만들어 지지는 않지만, Nylon thread의 끝 지름을 $0.18 \pm 0.02\text{mm}$ 로 만들고, 32~36g의 생쥐

는 9mm로, 37~40g의 생쥐는 9+0.5mm로 삽입하여 수술하면 MCAO model을 만들 수 있었다.

참고 문헌

- [1] 윤해상, 김영숙, *임상의학개론*, 청구문화사, 2000.
- [2] 이용하, *병리학*, 신광출판사, 2002
- [3] M. G. Hamilton, B. I. Tranmer, and R. N. Auer, "Insulin reduction of cerebral infarction due to transient focal ischemia," *J Neurosurg*, Vol.82, pp.262-268, 1995.
- [4] J. B. Bederson, L. H. Pitts, M. Tsuji, M. C. Nishimura, R. L. Davis, and H. Bartkowski, "Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination," *Stroke*, Vol.17, No.3, pp.472-476, 1986.
- [5] S. Kawamura, N. Yasui, M. Shirasawa, and H. Fukasawa, "Rat middle cerebral artery occlusion using an intraluminal thread technique," *Acta Neurochirurgica*, Vol.109, pp.3-4, 1991.
- [6] J. H. Garcia, K. F. Liu, and K. L. Ho, "Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and corte," *Stroke*, Vol.26, pp.636-643, 1995.
- [7] H. Nagasawa and K. Kogure, "Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion," *Stroke*, Vol.20, pp.1037-1043, 1989.
- [8] J. Koizumi, Y. Yoshida, T. Nakazawa, and G. Ooneda, "Experimental studies of ischemic brain edema. I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area," *Stroke*, Vol.8, pp.1-8, 1986.
- [9] Y. Mao, G. Yang, L. Zhou, J. Stern, and A. Betz, "Focal cerebral ischemia in the mouse: description of a model and effects of permanent and temporary occlusion,"

Molecular Brain Research, Vol.63, pp.366-370, 1999.

[10] M. R. Ardehali and G. Rondouin, "Microsurgical intraluminal middle cerebral artery occlusion model in rodents," Acta Neurologica Scandinavica, Vol.107, No.4, pp.267-275, 2003.

[11] Richard J. Traystman, "Animal Models of Focal and Global Cerebral Ischemia," ILAR Journal, Vol.44, No.2, 2003.

[12] D. S. Song, M. B. Yim, C. C. Lee, E. I. Son, D. W. Kim, and I. H. Kim, "Cerebral infarction size according to the duration of the middle cerebral artery occlusion in the revingible and irrevingible ischemic infarction models in the rats," J Korean Neurosurg, Vol.24, No.9, pp.985-995, 1995.

김 하 나(Ha-Na Kim)

정회원



- 2014년 2월 : 강원대학교 의생명공학(학사)
- 2016년 2월 : 강원대학교 의과대학 진단검사의학전공(의학석사)
- 2016년 3월 ~ 현재 : 강원대학교 의과대학 진단검사의학전공(박사과정)

〈관심분야〉 : 의학, 진단검사의학, 멀티미디어

박 승 우(Seoung-Woo Park)

정회원



- 1989년 2월 : 연세대학교 의과대학 의학과(의학사)
- 2000년 2월 : 아주대학교 의과대학 신경외과학교실(의학석사)
- 2002년 2월 : 아주대학교 의과대학 신경외과학교실(의학박사)
- 2002년 ~ 현재 : 강원대학교 신경

외과 교수

〈관심분야〉 : 신경외과, 의학, 멀티미디어

저 자 소 개

임 병 철(Byung-Chul LIM)

정회원



- 1997년 2월 : 고려대학교 의과대학 의학과(의학사)
- 2007년 12월 : 고려대학교 의과대학 의학과(신경외과학석사)
- 2015년 3월 ~ 현재 : 강원대학교 의과대학 신경외과학전공(박사과정)

■ 2011년 5월 ~ 현재 : 다나신경외과의원 원장

〈관심분야〉 : 척추관절통증치료 및 뇌혈관질환

성 지 희(Ji-Hee Sung)

정회원



- 2009년 2월 : 강원대학교 생명과학부(이학사)
- 2011년 2월 : 강원대학교 의과대학 생화학교실(의학석사)
- 2012년 3월 ~ 현재 : 삼성서울병원 삼성생명과학연구소 연구원

〈관심분야〉 : 치료제 연구