

WGA-HRP법을 이용한 두피와 안면부의 신경지배에 관한 연구

가톨릭대학교 의과대학 대전성모병원 마취과

강 준 구

= Abstract =

Experimental Study for Innervation of Scalp and Face with WGA-HRP Method

Jun Goo Kang, M.D.

*Department of Anesthesiology, Daejeon St. Mary's Hospital,
Catholic University Medical College Daejeon, Korea.*

Aim of this study was to discover the projection area of the first cervical spinal nerve. Subcutaneous injection of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase(WGA-HRP) was done at five points of young dogs' scalp and face. After two days of survival time, animals were sacrificed by perfusion through the left ventricle of the heart. Trigeminal ganglion, first and second cervical dorsal root ganglion, superior cervical ganglion, middle cervical ganglion and stellate ganglion were removed. Projection area of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase investigated into above ganglions.

Projection into the first cervical dorsal root ganglion and stellate ganglion was not found. This experiment is deemed valuable for the study of neuronal connection on the central nervous system.

Key Word: WGA-HRP

서 론

두피에 대한 신경지배영역의 이해는 두통의 치료방침 결정에 중요한 요소의 하나이다. 두피의 신경지배영역은 이미 잘 알려져 있으나 제 1 경신경(first cervical nerve)의 지배영역은 불분명한 점이 있어 제 1 경신경의 지각섬유가 두부의 표면에 분포하는지를 알아보기 위해서 HRP법을 사용하여 두부표피의 신경지배에 관한 역행성 조사를 실시하였으며 부수적으로 삼차신경절, 제 1 경후근절(first cervical dorsal root ganglion), 제 2 경후근절, 상경신경절(superior cer-

vical ganglion), 중경신경절(middle cervical ganglion), 성상신경절로의 투사를 조사하였다.

대상 및 방법

체중 2.5~4 kg의 강아지 5마리를 암수 구분없이 선택하여 케타민 40 mg/kg을 근주하여 마취한 후 Hamilton microsyringe를 사용하여 좌측의 후두부, 두정부, 눈직상부, 하악골 하연, 후두골 하연에 Wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase(WGA-HRP) 0.3 µg씩을 피하주사한 뒤 2일간 생존시켰다. 2일후 다시 케타민 마취후 앞발의 무릎부

위의 피부를 절개하여 정맥을 노출시킨 뒤 헤파린 1 ml를 정맥주사했다. 개흉한 후 좌심실을 천공시켜 좌심실을 통해 대동맥에 관류기를 설치하였다(그림 1). 동시에 우심방을 천공시켜 관류액이 흘러나오도록 했다. 생리식염수 500 ml를 관류한 후 3% formalin, 1% glutaldehyde, 수소이온농도 7.4인 0.1 M 인산완충액 혼합액 3000 ml로 관류고정했다. 관류고정이 끝난 뒤 좌우의 삼차신경절, 제1경후근절, 제2경후근절, 상경신경절, 중경신경절, 성상신경절을 채취하여 sucrose에 2일간 냉장 보관하였다. cryostat를 사용하여 50 μ m의 두께로 동결절편을 만들었다.

발색과정은 동결절편을 올려놓은 슬라이드를 염색바스켓에 넣고 acetate buffer액에 가볍게 흔들면서 2회 세척하였다. HRP를 발색(發色)시키는 용액을 조제하는데 500 ml 비커에 HRP액 400 ml를 취한후 Sodium nitroprusside 400 mg, TMB액 12 ml, 과산화수소 0.8 ml를 혼합하여 만들었고 이때 Sodium nitroprusside는 광선에 의해 변성이 있으므로 단시간에 시행하였다. 상기 용액을 유리각욕조(角浴槽)에 넣고 염색바스켓에 있는 슬라이드와 함께 넣은 다음 이것을 냉장고에 1시간 인큐베이트시켰다. 1시간 후 상기 슬라이드를 acetate buffer로 5회 세척한뒤

5%모리부덴산암모니움 400 ml를 각욕조에 넣고 상기 슬라이드를 담근 후 실온에서 15분간 차광시켜 인큐베이트하였다. 15분뒤 증류수로 5회 세척한후 슬라이드를 꺼내 실온에서 건조시켰다.

이 슬라이드를 neutral red염색과정을 거쳐 봉입한 후 광학현미경으로 HRP의 투사여부를 관찰하였다.

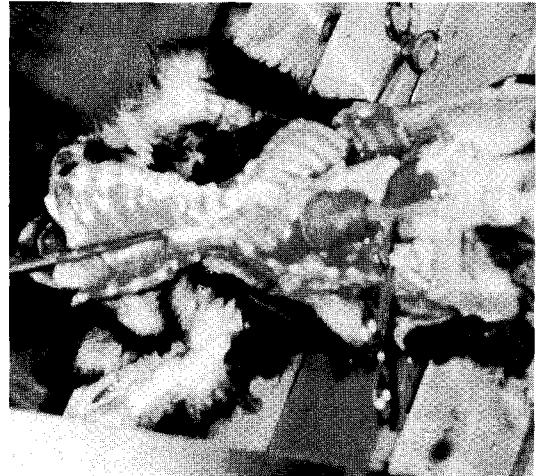


그림 1. 개에서 좌심실을 통해 대동맥에 관류기를 설치한 모습.

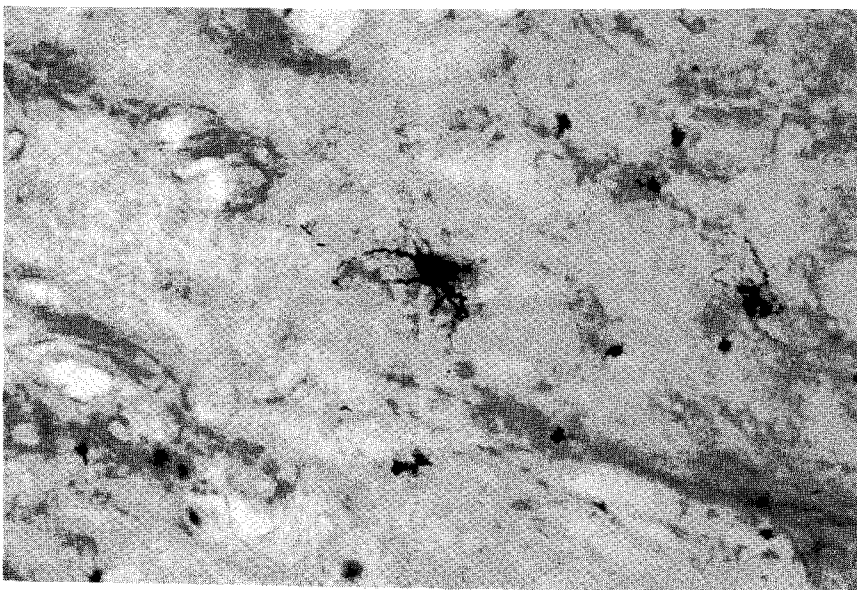


그림 2. 상경신경절에서 HRP의 투사.

표 1. HRP의 투사부위

	두정부	눈직상부	후두부	하악골	후두골
				하연	하연
삼차신경절	+	+		+	
제 1 경후근절					
제 2 경후근절			+	+	
상상신경절					
중경신경절					
상경신경절	+	+	+	+	+

결 과

다섯마리 모두 좌측에 WGA-HRP를 주입한 결과 우측에서는 어떤 신경절에서도 HRP의 투사를 볼 수 없었다. 광학현미경적 소견은 세포체에서 HRP의 투사가 관찰되었는데(그림 2) 좌측의 각 신경절에서 HRP의 투사가 발견된 부위는 표 1과 같이 나타났으며 삼차신경절은 안면부와 두정부, 상경신경절은 두부 전체, 후두부는 제 2경후근절에 투사되는 것을 발견하였으나 기대했던 제 1경후근절로의 투사는 발견할 수 없었다.

고 찰

신경의 연결상황을 정확히 아는 것은 신경차단술을 많이 이용하는 통증클리닉의 특성상 대단히 중요한 요소라 하겠다. 뉴론의 연결을 조사하는 방법으로서 그동안 몇가지 방법이 제시되었으나 본 실험에서 행했던 HRP법 또는 오토라디오그래피법이 현재 널리 이용되는 방법으로 생각된다. 신경원(neuron)과 신경교(neuroglia)로 이루어진 중추신경계의 연구에는 축삭(axon)의 추적(tracing)이 중요하다. 역사적으로 보면 1950년대 이후엔 뇌 일부에 손상을 주어 특수염색으로 변성된 축삭을 볼 수 있도록 하는 변성축삭도염법이 유일한 방법이었다. 이 방법은 Nauta가 변성된 축삭에 은진입(Silver impregnation)을 시켜 정상 축삭은 염색이 안되고 이들 축삭만 황금색으로 염색되도록 한 것으로서 Fink와 Heimer를 위시한 여러 학자들에 의해 변형 발전되었다. 그러나 이 방법은 손상

에 의해 일어난 변성변화를 추적하는 것이므로 목적인 뉴론이외의 뉴론의 손상에 의한 영향을 배제하기가 곤란한 단점이 있었다.

그후 Straus¹⁾에 의해 소개된 HRP조직화학에 대한 개념은 1971년에 Kristenson과 Olsson²⁾이 말초신경에, 1972년에 La Vail과 La Vail이 중추신경에 적용하면서 HRP신경조직화학은 중추신경연결 추적방법중 가장 많이 사용하게 되었다³⁾. 이것은 세포내 물질이 축삭을 따라 움직이는 것에 기초를 둔 것으로서 HRP를 신경조직에 주사하면 미세음세포작용(micropinocytosis)에 의해 뉴론에 들어 가는데 축삭종말(axon terminal)에서 가장 저명하다. 따라서 주입된 HRP는 세포체(Cell body)로 가게 되며 이를 역행성 운반(retrograde transport)이라고 한다. 이때 tetramethyl benzidine같은 적당한 기질과 반응하면 불용성 중합체를 형성하며 이것을 관찰하므로써 신경연결을 알 수 있게 된다.

HRP법을 포함한 효소항체법의 장점은⁴⁾, ① 광학현미경과 전자현미경에 같은 방법으로 같은 절편을 이용할 수 있다. ② HRP가 표식과정의 제조기에 저항성이 커서 표식후의 보존중에도 거의 활성저하가 없는 점. ③ 반응 부위가 잘 보이고 관찰이 용이한 점. ④ 표식 염색과정이 비교적 쉽다는 점. ⑤ 형광현미경처럼 특수 장비가 필요치 않은 점. 이 표식항체가 상품화되어 실용할 수 있는 점등이 있다.

HRP의 역행성축삭수송은 Wheatgerm agglutinin(WGA)을 결합시킨 것이 HRP단독보다 40배나 예민하다는 보고⁵⁾가 있으며 따라서 보다 저농도로 충분하다고 한다. 본 실험에서도 HRP단독 대신 WGA-HRP를 쓴 이유도 여기에 있다.

실험동물의 마취는 HRP의 흡수나 수송에 뉴론의 활동성이 상관관계가 있으므로 마취제의 선택에 유의해야 한다고 하며 일반적으로 심마취는 피하는 것이 좋다고 한다. 본 실험에서는 케타민을 사용했으며 40 mg/kg로 인간보다 용량이 많지만 하등동물일수록 많은 양이 필요하다고 한다.

HRP주입후 동물을 생존시켜 흡수된 HRP가 운반되도록 하는 기간은 축삭류의 속도, 해당신경절의 길이, 동물의 종류, 연령 기능적 활동성 등에 의해 영향을 받으므로 각각 실험적으로 정해야 된다고 하며 본 실험에서는 48시간에 도달하였다.

HRP란 식물계에 널리 존재하는 과산화효소(peroxidase)의 하나로서 다음의 성질때문에 뉴론의 연구에 이용된다고 한다. 첫째는 세포내 이입에 의해 뉴론에 취해져 축삭류에 의해 수송되는 성질이며 둘째는 과산화효소로서 효소의 활성을 나타내 신경조직내의 존재가 조직화학적으로 검출되어지는 현상이다. 이런 성질을 이용한 뉴론의 연구는 그 범위가 중추신경계, 신경절, 말초신경, 근, 피부, 내장의 신경지배등에 넓게 적용되며 역행표식, 순행표식, 다중표식등에 응용할 수 있다. 역행성 표식법이 제일 많이 쓰인다.

HRP의 투여방법은 보통 액체 용액 상태로 투여되나 정제나 서방형 겔로 만들어 좀 더 우수한 국소화(localization)와 감도를 얻었다는 보고⁷⁾도 있다.

본 실험동기는 제 1 경추부근에 병변이 있는 환자에서 두정부에 통증을 호소하는 경우가 있어 제 1 경신경이 지금까지 알려진 부위외에 분포되어 있는 곳이 있는지 여부를 찾아보기 위함이었다. Bonica⁸⁾는 제 1 경신경의 지각섬유는 환추(atlas)와 후두골의 골막, 제 1 경추와 후두골의 연결부(atlanto-occipital joint), 환추관절(atlanto-axial joint)들과 이 관절주위의 인대에 분포하며 때로는 두피로 가는 후두동맥을 동반하여 대후두신경이나 소후두신경과 연락한다고 했다. 따라서 제 1 경신경의 지각분포가 검출되려면 후두부나 삼차신경과 제 2 경신경 피부절(dermatome)의 경계 부위에 가능성이 높다고 생각하고 5군데에 WGA-HRP를 주입하였으나 제 1 경후근절에서는 HRP를 검출하지 못했다.

실험상 수기의 시행에 경험적 기술이 필요하고 앞으로 제 1 경신경의 지각분포에 대한 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

결 론

HRP법을 이용한 두부표피의 신경지배영역실험에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) 실험했던 5군데서 제 1 경후근절로 투사되는 것은 발견할 수 없었다.
- 2) 상경신경절에는 전례에서 투사되었다.
- 3) 두부의 신경지배는 주로 삼차신경과 제 2 경신경으로부터 이루어진다는 알려진 결과와 대체로 일치했다.

본 실험은 일본 사가의대 마취과에서 이루어졌으며 실험지도 및 도움을 주신 日本佐賀醫科大學 痲醉學教室 十時忠秀教授, 森本 正敏 先生과 마취과의국원들께 깊은 감사를 드린다.

참 고 문 헌

- 1) Cotes Straus W. Segregation of an intravenously injected protein by "droplets" of the cells of rat kidneys. *J Biophys Biochem Cytol* 1957; 3: 1037.
- 2) Cotes Kristensson K, Olsson Y. Retrograde axonal transport of protein. *Brain Res* 1971; 29: 363.
- 3) Cotes La Vail JH, La Vail MM. Retrograde axonal transport in the central nervous system. *Science* 1972; 176: 1416.
- 4) Mesulam MM. Tetramethyl Benzidine for Horseradish peroxidase neurohistochemistry. *The journal of histochemistry and cytochemistry* 1978; 26: 106-17.
- 5) 武内忠男, 小川和郎, 新酵素組織化學. 初版, 東京: 朝倉書局: 1980; 485.
- 6) Gonatas NK, Harper C, Mizutami T, Gonatas JO. Superior sensitivity of conjugates of Horseradish peroxidase with wheat germ agglutinin for studies of retrograde axonal transport. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1979; 27: 728-34.
- 7) Griffin G, Watkins LR, Mayer DJ. HRP pellets and slow release gels: two new techniques for greater localization and sensitivity. *Brain Research* 1979; 168: 597-601.
- 8) Bonica JJ. *The management of pain*. 2nd ed, Pennsylvania: Lea and Febiger. 1990: 822.