

말초신경 손상 백서모델에서 초음파 치료의 신경 및 근육 재생효과

동신대학교 물리치료학과 신경과학교실

정 미 선

전남대학교병원 물리치료실

김 경 윤*

The Effect of Ultrasound Treatment on Regeneration Nerve and Muscle on Injured Peripheral Nerve of Rats Model

Cheong, Mee-sun, Ph.D., P.T.

Dept. of Physical Therapy, Division of Health & welfare, Dongshin University

Kim, Kyoung-yoon, M.P.T.

Dept. of Physical Therapy, Chonnam National University Hospital

<Abstract>

The purposes of this study is to discuss and analyze the effect on the recovery from cut in sciatic nerve. This study used 9 weeks male rats of Sprague-Dawley family. Rat in groups 4 were treated with pulsed therapeutic ultrasound for 3 minutes. 3 times weekly at 3MHz respectively (intensity; 0.2 W/cm², 0.5 W/cm², 1.0 W/cm²); rat in group 1 received placebo ultrasound. In addition, changes of serum aspartate amino-transferase(AST) and creatine phosphokinase(CPK) levels were also demonstrated with diameter of individual muscle fasciculate and number of muscle fiber in each of three types of muscles located in gastrocnemius, soles. The results of

*교신저자: 전남 화순군 화순읍 일심리 160번지 전남대학교화순병원 물리치료실 e-mail : redbead7@daum.net

comparing the changes in groups are as follows;

1. We found out that hypertrophic epineurium was present in sciatic nerve injured ultrasound treatment of groups. 2. In the gastrocnemius morphological investigation of the group I (control group), severe muscle atrophy were observed at the 7th days of the sciatic nerve injury. however, muscle atrophy of the group IV (1.0 W/cm²) were slightly recovered at the 14th days after treatment ultrasound. At the 28th days, muscular fibers were formed in polygon and were significantly recovered. 3. C-fos immunoreactive of the group II (0.2 W/cm²), III (0.5 W/cm²) were remarkably increased at the 1th day after treatment of ultrasound. Group IV were markedly decreased. 4. Brain-Derived Neurotrophic Factor(BDNF) immunoreactive of the group II, III were increased after 7 days of the sciatic nerve injury. Group IV were markedly increased from 14th days to 28th days after treatment of ultrasound. 5. A significant increase of serum AST levels were demonstrated in control group. However, serum AST levels of massage groups were significantly decreased compared to that of control group in followed order ; (0.2 W/cm² < 0.5 W/cm² < 1.0 W/cm²). 6. A significant increase of serum CK levels were demonstrated in control group. However, serum CK levels of massage groups were significantly decreased compared to that of control group in followed order ; (0.2 W/cm² < 0.5 W/cm² < 1.0 W/cm²). The above results suggest that ultrasound treatment after peripheral nerve injury might reduce noxious stimuli, facilitate nerve recovery and effective in the functional improvement delaying muscle atrophy or degeneration.

Key Words: Ultrasound Therapy, Brain-derived neurotrophic factor(BDNF), c-fos

I. 서 론

신체는 신경계 손상으로 외부자극에 둔감하게 되며 표적장기(target organ)의 위축을 가져오게 되어 일부 회복이 되더라도 그 기능을 되찾기가 힘들다. 이러한 기능 장애를 방지하기 위한 처치로 신경 변성(degeneration)을 막고, 재생(regeneration)을 촉진시켜 표적 장기 기능을 유지하기 위한 많은 연구들이 시도되고 있다(정진우 등, 1992). 말초신경의 절단은 일차적으로 원위부에서 신경섬유 변성을 유발시켜 해당신경의 지배부위에 감각둔화 및 근육의 운동마비를 초래하며 시간 경과에 따라 척수 신경절 및 척수 내의 신경세포에도 다양한 손상을 유발한다. 특히 말초신경 중 좌골신경의 손상은 근육의 수의적 조절 능력 상실, 관절 구축, 말초신경 감각섬유 이상을 초래한다(Roger 등, 1999). 말초신경의 신경세포 손상 시 손상의 형태와 정도, 신경섬유의 종류, 부위 그리고 동반된 주위 조직의 손상 등에 따라 임상증상이 다르게 나타난다. Dumitru(1995)는 원위부 신경 손상 시 인접한 근위부와 신경세포체 변성이 나타나고, 손상된 신경세포 일부는 생존한 세포를 중심으로 재생을 거쳐 회복되나 그 기능이 완전하지 못하고 개체 활동에 장애를

초래한다고 하였다.

말초신경 손상 후 신경 및 근육의 변화로는 골격근의 발달 및 기능에 중요한 역할을 하는 phosphoglycerate mutase 및 creatine phosphokinase isozyme의 변화가 비복근과 발바닥 근육에서 그 활성이 촉진되었다고 보고 하였다(Kawabuchi 등, 2000). 대부분 근육의 변성 또는 이상은 근육의 조직학적 소견의 관찰로 이루어지나(Redenbach 등, 1988) 보다 쉽고 간편한 방법으로 혈중 효소 활성의 변화를 관찰할 수 있다. 이중 가장 보편적인 방법은 혈중 AST(aspartate amionotransferase)와 CPK(creatine phoshokinase) 활성변화를 들 수 있으며 이들 두 효소는 근육의 이상 또는 피사 시 현저한 혈중 증가를 나타내는 것으로 알려져 있다.

신경 성장 인자(nerve growth factor, NGF; Brain-derived neurotrophic factor, BDNF; neurotrophic factor)는 신경의 생성과 성장에 관여하여 선택적인 신경세포 집단 생성을 촉진하며, 척수 후각 안에서 신경자극을 전달하거나 신경세포 기능을 조절한다(Kim 등, 2000). 이 중 BDNF는 다른 인자들보다 분포부위가 넓으며, NGF와 50%의 동족체 아미노산을 갖고 감각신경절(sensory ganglia), 해마(hippocampus), 망막신경절 세포(retinal ganglia)에서 관찰되며 감각신경과 교감신

경뿐만 아니라 운동신경의 생성과 성장을 촉진하는 효과가 있다(Thanos 등, 1998). 또한 Kokaia 등(1996)은 다양한 실험동물모델에서 국소허혈 및 전뇌허혈, 손상 후 대뇌피질과 해마에서 BDNF 유전자 및 단백질 발현이 증가하였으며, 뇌손상에 대한 BDNF 면역반응이 감소되었다고 보고하였다.

본 연구에서 BDNF와 함께 중요하게 다루게 될 c-fos는 척수의 통증전달 신경세포에서 발현되고, 기타 뇌에서 통증과 관련된 부위에서 발현된다(Hathaway 등, 1995; Lanteri-Minet 등, 1994). c-fos의 발현은 formalin, carrageenan 등의 화학물질로 인한 유해 자극, 기계적 자극, 말초신경 손상, 관절염, 방광에 유해 자극 등 지속적인 통증이 유발되었을 때 척수 후각에서 일어난다(이원택 등, 1999; Abbadie와 Besson 1992; Champman 등, 1995; Tokunaga 등, 1999). 그러나 말초신경손상에 의한 통증시 초음파 치료에 따른 생체반응에 관한 연구는 매우 미흡한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 좌골신경 절단 후 다양하게 나타나는 불용성 근 위축에 대한 초음파 치료의 효과를 알아보기 위하여 좌골신경 절단 6주 후 백서의 비복근 및 가자미근의 변화를 관찰하였고, 혈중 aspartate aminotransferase(AST)와 creatine phosphokinase(CPK) 활성의 변화를 관찰하였다. 이들 근육의 중량 변화, 근섬유, 근다발 두께변화 그리고 수적변화를 관찰하고, 말초신경 손상에 따른 초음파 치료 변화양상을 BDNF 및 c-fos를 통한 면역조직화학적 연구를 하고자 한다.

II. 연구방법

1. 실험동물

체중 약 250 ± 50 g의 수컷 Sprague-Dawley계 백서(9주령, $n=160$)를 사용하였다. 사육실 온도는 25 ± 1 °C, 습도 $55 \pm 10\%$ 를 유지하였으며, 명암은 12시간 주기로 하였다. 고형사료와 물은 자유롭게 먹도록 하였다. 초음파 치료는 1, 3, 7, 14, 21, 28, 36, 42일에 5마리씩 할당하여 실시하였다. 실험군 I은 좌골신경 절단 후 치료를 하지 않는 대조군($n=40$), 실험군 II는 좌골신경 절단 후 강도 0.2 W/cm² 치료군($n=40$), 실험군 III은 좌골신경 절단 후 강도 0.5 W/cm² 치료군($n=40$), 실험군 IV는 좌골신경 절단 후 강도 1.0 W/cm² 치료군

($n=40$)으로 나누었다.

2. 좌골신경 절단 모델

전신마취를 위해 럼퐁(Rompun, Bayel, Korea)과 염산 케타민을 1:1로 혼합하여 복강 내 주사(3 ml/kg)한 후, 우측 대퇴부의 피부를 절개하고 대퇴이두근의 근섬유 사이에서 좌골신경 중간 1/2부위의 신경을 절단하였다. 좌골신경 절단 후 피부를 봉합하였고, 마취에서 회복된 실험동물은 정상적으로 사육하였다.

3. 초음파 치료

초음파 치료기기(Sonopluse 992, Enraf-Nonius, Netherlands)를 이용하여 오른쪽 내측대퇴부에 초음파 치료를 시행하였다. 대조군은 초음파 강도 없이 도자로 접촉 자극만 가하고, 실험군은 수술 직후 초음파를 주 2회씩 6주 동안 3 mm의 주파수를 사용하여 0.2 W/cm², 0.5 W/cm², 1.0 W/cm² 강도로 3분 동안 치료하였다. 초음파 치료 부위에는 초음파용 전도겔(Soung Heong Co., Korea)을 이용하여 초음파가 심부조직으로 충분히 전달될 수 있도록 하고, 2 cm²/sec의 속도로 도자를 이동시켜 심부열의 국소 집중을 예방하였다.

4. 근 무게 변화 및 조직학적 변화

시간대별로 전자저울(Mettler instrument AGCH-8606, Zurich, Switzerland)을 이용하여 실험동물의 정상측과 환측의 비복근, 가자미근의 근 무게를 측정하여 변화 양상을 살펴보고, 채취한 근육을 10% 중성포르말린에 고정 후, 파라핀하여 통상적인 H&E 염색을 실시하였다. 초음파 치료 각각의 처치 후 근섬유의 변성정도, 근섬유의 크기변화, 근섬유의 위축정도, 주위결합조직의 변화 상태를 관찰하였다.

5. 혈액학적 검사

심장 채혈한 혈액을 실온에서 30분 방치 후 3,000rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리한 후 혈액생화학분석기(RM 2060-18, ELTEC. Co., Italy)를 이용하였다.

6. 조직절편 제작

실험동물의 척추 부분을 덮고 있는 피부를 가위로 절제하고 천추의 중간부위를 절개하여 척추관을 노출시켰다. 척추관을 통하여 21 gauge 바늘을 삽입하고 냉각 식염수가 들어 있는 주사기를 부착하여 힘주어 식염수를 주입하여 척추의 전부위가 경추의 개구부를 통하여 노출되도록 하여 요부 척추 부위만을 적출하고, 적출된 척추는 3% paraformaldehyde - 3% glutaraldehyde - 0.1% picric acid 고정액에 24시간 고정된 후, 회전식 미세박절기(Rotary microtome 2040, Sakura, Japan)를 사용하여 5 μ m 두께로 박절하였다.(그림 1). 2003년 12월경, 기능적 자기공명영상촬영을 시행할 당시 왼쪽 상지의 근력은 전체적으로 75% 이상을 보였고, 손의 파악력은 10kg(정상범위: 25.5 \pm 7.4kg)이었고, 퍼듀-페그보드 점수는 3점(정상범위: 14.6 \pm 1.9점)이었다. 연구대상자는 발병 후 2개월의 입원과 4개월의 외래 치료를 받았으며, 그 후 대구 소재 장애인 복지관에서 지속적인 물리치료와 작업치료를 받은 것으로 기록되어 있었다.

7. 면역조직화학염색 및 형태학적 관찰

박절한 조직절편은 완충액 phosphate buffered saline(PBS)으로 여러 번 세척한 후 남아 있는 고정액 성분을 제거하기 위하여 1% normal blocking serum sodium borohydride로 1시간 처리하였다. 면역조직화학 염색을 위한 전처리 과정으로 0.3%의 과산화수소(hydrogen peroxide) 용액에 20분간 처리하였다. 다시 PBS로 여러 번 세척한 후 Novostain Super ABC Kit(Novocastra Lab., Benton Lane, UK)를 사용하여 20분간 배양하고 1 : 1000으로 희석한 anti c-fos(Sigma, F7799, USA)와 anti-BDNF(Chemicon, AB1779SP, USA)로 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 처리한 후

PBS로 세척하고 희석된 바이오틴일 이차항체액(diluted biotinylated secondary antibody solution)으로 30분간 배양하였다. 다시 PBS로 세척하고 Novostain Super ABC Reagent로 30분간 배양하였다. 발색을 위해 DAB(Serotec Ltd, BUF021B, UK)에 10분간 적용하고 Mayer's Hematoxylin(Sigma, MHS-32, USA)으로 대조염색(counterstaining)을 실시하였다. 형태학적 관찰로 척추 천층(Rexed I and II)에서 나타나는 반응을 광학현미경(Olympus, Bx 50, Japan)을 이용하였다.

8. 통계방법

통계학적 분석은 SPSS 10.0 version을 사용하였다. 각 실험 결과치는 평균치와 표준편차를 나타냈으며, 시간에 따른 실험군 간의 통계적 유의성 검정을 위하여 one-way ANOVA를 실시하였다. 사후검정은 Tukey방법으로 하여 통계학적 유의수준은 $\alpha=0.05$ 로 하였다.

Ⅲ. 연구결과

1. 초음파 치료 후 하퇴근 무게 변화

좌골신경을 절단한 각 실험군의 하퇴근 무게 변화를 관찰하였다. 먼저 정상측 가자미근의 무게변화는 편차가 심한 경향을 볼 수 있었고, 초음파 치료군 간에도 차이가 심하게 나타났다. 한편 손상측에서는 치료군에서 소량의 무게가 증가한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1, 2).

비복근의 무게변화는 정상측 다리는 증가를, 손상측은 대조군에 비해 초음파 치료군에서 무게가 증가한 것을 볼 수 있었다(Fig. 3, 4).

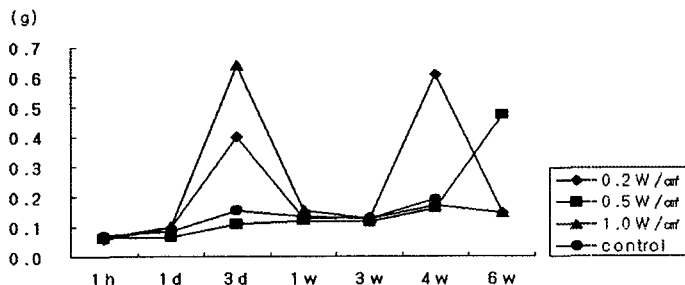


Fig. 1. Change of right soleus weight after treatment of ultrasound in control groups.
h: hour, d: day, w: week

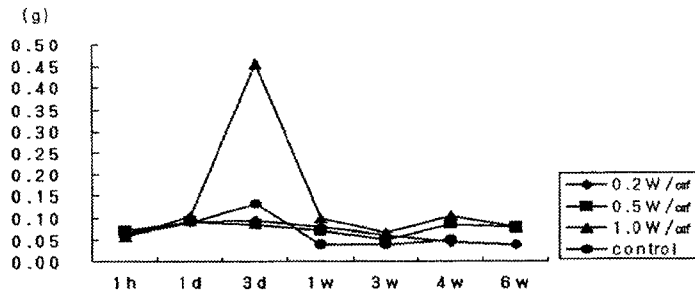


Fig. 2. Change of right soleus weight after treatment of ultrasound in sciatic nerve groups injured rats. h: hour, d: day, w: week

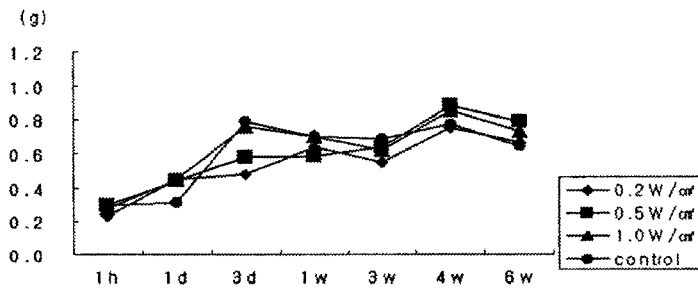


Fig. 3. Change of right gastrocnemius weight after treatment of ultrasound therapy in control groups. h: hour, d: day, w: week

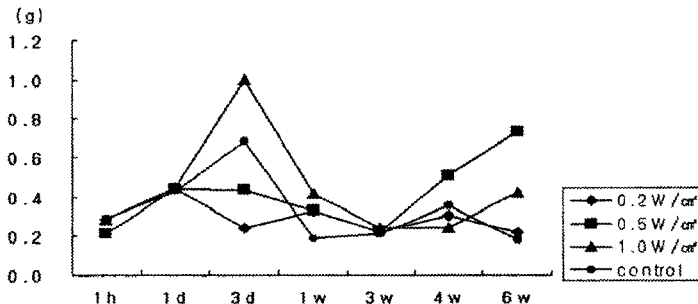


Fig. 4. Change of right gastrocnemius weight after treatment of ultrasound in sciatic nerve injured groups. h: hour, d: day, w: week

2. 초음파 치료 후 근육의 형태학적 변화

근섬유의 변성은 대조군에 비해 치료군에서 변성이 더 다게 진행됨을 확인할 수 있었고, 실험군 II, 실험군 III에 비해 치료군 IV에서 호전됨을 볼 수 있었다(Table 1). 근섬유 크기, 근 섬유 위축에서도 실험군 II, 실험군 III에서 상당히 호전되었으나 실험군 II, 실험군 III에 비해 실험군 IV에서 치유진행이 나타났다. 비복근의 광학현미

경적 소견상 치료 14일에서는 대조군의 경우, 심한 근 섬유의 위축이 관찰되었으며, 근 다발의 윤곽 소실이 인정되었다. 또한 근 섬유의 심한 위축과 이에 따라 근 다발의 단면적 감소가 관찰되었고, 근 섬유의 사이공간과 근 다발 사이공간의 심한 확장이 비복근에서 인정되었다(Fig. 5, A). 치료 28일에는 대조군에 근섬유의 변성과 위축이 아직 그대로 진행되고 있는 반면, 치료 42일군에서는 회복이 정상에 가깝다. 실험군 II, 실험군 III은 치

료가 느리지만 실험군 IV에서는 치유의 진행이 다소 빠르게 나타났다. 근 다발과 근 섬유 사이공간에서 결합조직의 대체가 더욱 현저하게 관찰되었고, 근 다발 내로의 침습 역시 인정되었다.

변성 소견을 나타내는 짙은 오렌지색의 근 섬유들이 현저히 증가된 것으로 관찰되었다. 이러한 위축 및 결합조직의 감소 소견은 비복근에서 인정되었다(Fig. 5, B).

Table 1. Light microscope change of injured sciatic nerve after treatment of ultrasound groups

	I						II						III						IV					
	1	3	7	14	28	42	1	3	7	14	28	42	1	3	7	14	28	42	1	3	7	14	28	42
muscle fiber degeneration	++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	+	+	-
muscle fiber size	+	+	+	++	++	+++	+	+	++	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	-	-
muscle fiber atrophy	+	++	++	+++	+++	+++	+	+	++	+	++	++	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	-
connective tissue	-	-	-	+	+	++	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	++

- : negative, + : mild, ++ : moderate, +++ : severe

I : non treatment group

II : 0.2 W/cm² treatment ultrasound

III : 0.5 W/cm² treatment ultrasound

IV : 1.0 W/cm² treatment ultrasound

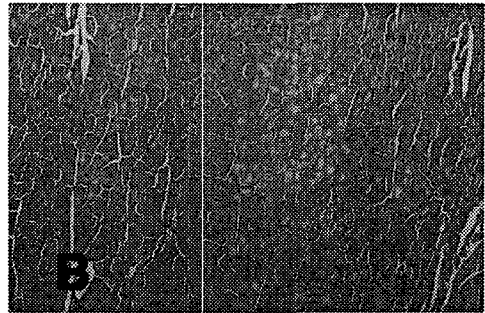
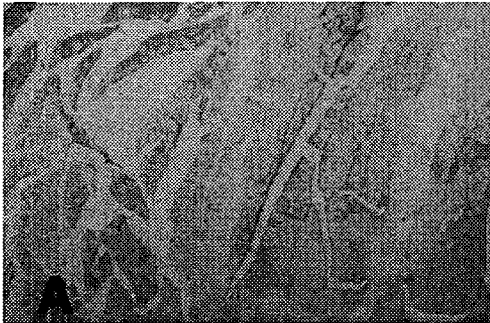


Fig. 5. Histological changes of gastrocnemius at 14 days in sciatic nerve injured group I (A), at 42 days in sciatic nerve injured group IV (B). (H&E stain, × 100)

3. 혈중 AST, CPK 활성의 변화

좌골신경을 절단하지 않은 대조군 혈중 AST 활성은 152.42 ± 8.33로 나타났다. 실험군 II는 162.00 ± 8.05로 유의한 증가를 나타내었고(p<0.01), 실험군 III, IV는 각각 154.40 ± 8.77, 153.27 ± 8.32로 대조군

에 비해 약간 차이가 있었다. 좌골신경을 절단하지 않은 대조군 혈중 CPK 활성은 138.36 ± 10.2로 나타났다. 실험군 IV는 178.53 ± 17.4로 유의한 증가를 나타냈다. 한편 실험군 II, III은 각각 143.28 ± 10.5, 156.35 ± 25.2로 대조군에 비해 다소 증가하였다(Table 2).

Table 2. The changes of AST, CPK in serum of sciatic nerve injured group experimental groups

(IU/L)

Groups	I	II	III	IV
AST	152.42 ± 8.33	162.00 ± 8.05*	154.40 ± 8.77	153.27 ± 8.32
CPK	138.36 ± 10.2	143.28 ± 10.5	156.35 ± 25.2	178.53 ± 17.4*

Statistically significant according to control group. All Value are mean ± SD

I : non treatment group

II : 0.2 W/cm² treatment ultrasound

III : 0.5 W/cm² treatment ultrasound,

IV : 1.0 W/cm² treatment ultrasound

4. 좌골신경 절단군의 척수 내 c-fos 발현

c-fos 면역반응 세포는 주로 척수 후각의 Rexed I, II 층판에서 관찰되었다. 실험군 II에서는 좌골신경 손상 1일 후에서 c-fos 단백질에 양성을 나타내는 세포 수가 최대로 증가되었으며(Fig. 6, A), 7일 이후에는 다소 감소하는 경향을 보였다. 실험군 III은 좌골신경 손상 1일후에서 c-fos 단백질에 양성을 나타내는 세포 수가 최대로

증가하였다. 좌골신경 손상 7일에서는 실험군 III은 실험군 II에 비해 유의하게 c-fos 단백질에 양성을 나타내는 세포 수가 현저히 감소함을 보였다. 실험군 IV는 손상 1일 후에서 다른 군에 비해 비교적 적은 수를 보였고, 전반적으로 낮은 수를 나타냈다. 좌골신경 절단 후 실험군 III, IV군에서 c-fos 단백질 양성 세포 수는 다소 유의한 감소를 보였다(Fig. 6, B)(Table 3).

Table 3. The changes of c-fos immunoreactive neurons in the dorsal horn of spinal cord of sciatic nerve injured rats of after treatment of ultrasound

Group	Time(days)			
	1	7	14	28
I	+++	+++	++	++
II	+++	++	+	+
III	+++	+	+	+
IV	++	+	+	+

+: mild, ++ : moderate, +++ : severe

I : non treatment group

II : 0.2 W/cm² treatment ultrasound

III : 0.5 W/cm² treatment ultrasound

IV : 1.0 W/cm² treatment ultrasound

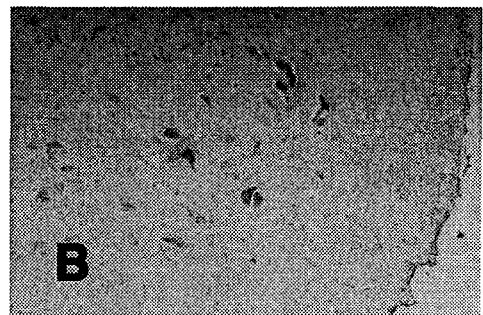
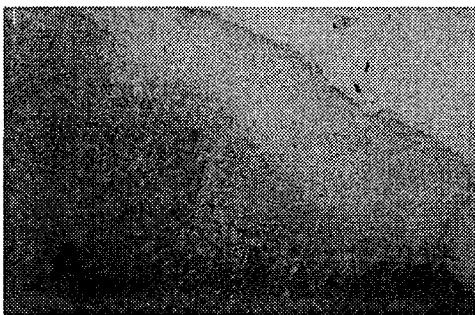


Fig. 6. The changes of c-fos immunoreactive neurons in superficial dorsal horn at 1 day in experimental group II (A), at 7 day in experimental group IV (B). (immuhistochemical stain, × 100)

5. 좌골신경 절단군의 척수 내 BDNF 발현

척수에서 BDNF의 면역조직화학적 방법으로 염색한 표본에서 면역반응 양성구조는 척수 신경원의 핵에 짙은 갈색 과립상으로 나타났다. 대조군은 양성 세포가 드물게 나타났으며(Table 4). 실험군 II는 좌골신경 손상 7일 후 BDNF를 나타내는 세포 수가 약간 증가되었으나

(Fig. 7, A), 치료 14일 이후에는 다소 증가하는 경향을 보였다. 실험군 III은 좌골신경 손상 7일 후에서 초음파를 실시한 결과 실험군 II에 비해 BDNF 양성을 나타내는 세포 수가 현저히 증가함을 보였다. 좌골신경 손상 7일에서 실험군 III은 실험군 II에 비해 BDNF 양성반응이 더 높게 나타났으며(Fig. 7, B), 손상 28일 이후 점차 감소하였다(Table 4).

Table 4. The changes of BDNF immunoreactive neurons in spinal cord of sciatic nerve injured rats of the treatment of ultrasound

Group	Time(days)			
	1	7	14	28
I	+	+	++	+
II	+	+	++	+
III	+	++	+++	++
IV	+	+	++	+

+ : mild, ++ : moderate, +++ : severe

I : non treatment group

II : 0.2 W/cm² treatment ultrasound

III : 0.5 W/cm² treatment ultrasound,

IV : 1.0 W/cm² treatment ultrasound

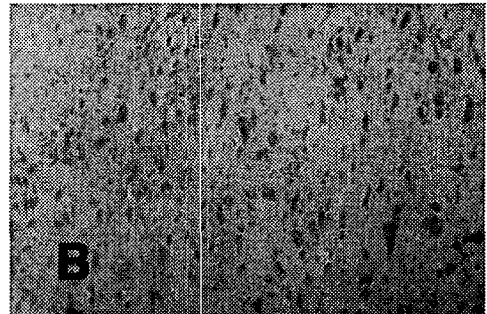
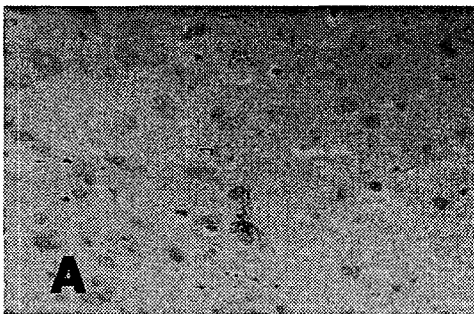


Fig. 7. The changes of BDNF immunoreactivity in neurons at 7 days in experimental group II (A), at 7 days in experimental group III (B). (immunochemical stain, × 400)

IV. 고 찰

본 연구는 실험동물인 백서를 이용하여 기능학적, 혈액학적, 조직학적 및 면역조직학적 실험 등을 통해 좌골신경 손상 시 초음파 치료효과를 알아보려고 하였다. 말초신경 손상 후 신경기능회복에는 손상의 정도가 중요한 요인으로 작용하는데, 이 실험에서는 신경 및 근육 재생

의 연구를 위해 신경손상의 정도를 좌골신경손상 모델로 축삭 및 신경초까지 단절된 상태에서 실험을 실시하였다.

초음파 치료는 조직에 미치는 영향으로 온열 및 비온열효과로 나눌 수 있다. 온열 효과에 의한 조직 내의 변화로는 말초동맥 혈류량의 증가, 조직 내 대사변화와 생체막의 투과성 변화, 신경전도 속도의 증가, 동통역치 증가, 연부조직의 신축성 증가, 세포주기율(cell cycling

rates)의 증가, 모세혈관막과 부종형성과열충격단백질(heat shock protein) 산출을 통한 단백질 누출(leakage)의 증가 등이 있다(Baldes 등, 1958; Lehmann 등, 1970; Barnett 등, 1994). 비온열효과로 가스형성에 따른 공동형성, 혈소판 응집 촉진, 정맥류 폐양의 치료촉진 등이 있는데, 비온열효과라도 온도상승에 의한 효과와 일부 중복되어진다(Coakley, 1978). 본 연구에서도 초음파 조사강도를 달리하여 처치한 결과 강도가 가장 높은 실험군 IV(1.0 W/cm²)에서 신경 및 근육의 재생에 긍정적인 영향을 미쳤음을 알 수 있었다. 그러나 낮은 강도로 치료한 실험군 II(0.2 W/cm²)와 III(0.5 W/cm²)에서는 대조군 보다 신경 및 근육의 재생효과가 관찰되었지만 실험군 IV(1.0 W/cm²)에 비해서는 매우 미흡한 결과를 보였다.

좌골신경절단 후 초래되는 근육과 신경의 재생과정에 대해 많은 연구가 보고 되고 있으며(kawabuchi 등, 2000), Weinreb (1997)등과 Uchii (1998)등은 신경절단 특히 사지의 운동을 지배하는 신경의 상부절단은 그 사지 자체의 두께 또는 중량을 감소시키는 것으로 보고하였다. 본 연구에서도 비복근, 가자미근의 정상측과 손상측 무게변화에서 같은 결과를 보였으며 이는 좌골신경절단 후 근육의 조직학적 변화는 하나의 중요한 근육변성의 판단 기준이 될 것으로 생각 된다.

또한 본 연구에서는 좌골신경절단 손상 후 신경의 재생에 중요하게 관여하는 단백질 유전자 물질인 BDNF와 c-fos의 양상을 면역조직학적 연구를 통해 관찰하였다. 이러한 신경 영양성 인자(neurotrophic factor)들은 신경계의 발달 및 유지에 위한 필수적 조절인자이다. 이들 물질은 특히 신경의 생존, 축삭 성장, 시냅스 가소성 등의 조절자 역할을 담당하는 물질로서 뇌졸중이나 척수손상 동물모델 실험을 통해 이들 물질은 신경의 손상을 방지하고 축삭의 성장을 유도하며 최종적으로 기능적 회복을 돕는 역할을 담당하는 것으로 확인되었다(Skup 등, 2002; Gomez-Pinilla 등, 2002). 최근의 연구 결과 신경 영양성 인자물질들이 운동학습이나 신체활동 등을 통해 활동 의존적으로 중추신경계 내에서 그 발현이 증가되는 것으로 확인되었다. 본 연구에서 좌골신경 손상 7일 후 손상된 신경에서 신경성장 인자의 하나인 BDNF의 발현이 증가하였다. 이러한 결과는 좌골신경 손상 7일에서 14일 이후까지 BDNF는 최고로 증가하여 손상 28일 후에는 감소하는 Meyer 등(1992)의 결과와 일치하였으며, 초음파 치료가 신경계의 BDNF를 포함한 신경성장인자들

을 조절하는데 효과가 있다는 것을 확인하였다. 그러나 초음파 치료 강도별 차이에서는 고강도 치료군인 실험군 IV(1.0 W/cm²)에 비해 오히려 실험군 III(0.5 W/cm²)에서 더욱 강한 양성 반응을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 가장 효과가 좋은 초음파 강도가 선행연구자에 따라 모두 상이한 결과를 보이며, 본 실험에서는 III(0.5 W/cm²)군에서 더욱 높은 BDNF 양상을 보였다. 이러한 결과는 BDNF의 경우 초음파의 열적인 효과가 비신경손상 이후의 신경화학적 변화로는 BDNF, NGF들이 내인성 신경 보호 반응으로 유발되는 것으로 사료된다(McAllister 등, 1999). 이들 신경영양성 인자들은 활동-의존성 가소성(activity-dependent plasticity) 과정에서 신경 연결의 강화에 관여하며, 이들 중에서 BDNF는 세포의 생존을 위한 일차적인 신호로서 작용하고, 손상 후의 재생과정뿐만 아니라 발생과정에 있어서도 중요한 역할을 수행하는 것으로 밝혀졌다(Walton과 Dragunow, 2000).

c-fos는 비교적 자극 직후 발현되며 반감기가 매우 짧으며(Morgan과 Curran, 1992), c-fos의 발현은 임상적으로 많은 점들을 시사한다. 이는 지속적 c-fos 발현은 계속적인 발현신호가 전달된다는 것을 의미한다. 한정욱(1999)은 세포가 자극과 관련하여 조기유전자인 c-fos 등을 유발하는 것은 세포활동의 표식자로서 기능할 뿐만 아니라 생리적으로 세포가 장기적 적응을 필요로 하는 환경의 중요한 변화가 일어났음을 의미한다고 하였다. Bullite(1990)에 의하면 유해한 기계적 자극과 온열 자극을 말초신경에 가할 경우 통증을 전달하는 신경통로에 c-fos가 의미 있게 증가한다고 하였고, Strassman과 Vos(1993)는 유해한 안면신경자극을 가할 경우 c-fos 유사면역반응성이 경추 척수의 후각에서 증가되었음을 보고하였다. 본 연구에서는 말초의 유해한 자극인 좌골신경 손상에 의해 중추신경계에서 c-fos의 발현이 증가됨을 입증할 수 있었다. 이와 관련하여 Abbadie와 Besson(1992)은 c-fos를 이용한 방법은 척수 수준에서 통증기전을 연구하는데 유용하며, 통증을 전달하는 신경로 중 척수 후각의 변화를 관찰하는 것은 중요하다고 하였다. 특히 실험 결과 각 실험군 후각에서의 강한 양성 반응을 확인할 수 있었는데, 이러한 결과는 후각이 내인성 아편 수용체의 밀도가 높아 항유해성(antioiception)을 생성하는 부위로 알려져 있기 때문이라 생각된다. 본 연구결과에서도 여러 연구자들(Bullitt, 1990; Harris, 1998)과 동일하게 좌골신경 손상 후 c-fos가 Rexed I, II와 V, X 층에서 주로 발현됨을 관찰하였다. 초음파

대조군 I은 c-fos 면역반응 양성 세포가 최고로 나타났고, 14일 이후에는 감소하는 경향을 보였다.

AST는 흔히 GOT로 알려져 있는 미토콘드리아 결합 효소로 주로 간과 근육에 존재하며 간 또는 근육의 피사와 같은 이상시 혈중 농도가 증가되는 것으로 알려져 있다(Sodikoff, 1995). 근육 이상 시 혈중 AST 활성의 변화에 대해 Iwanczak 등(2000)은 Duchenne progressive muscular atrophy 환자에서 현저한 혈중 AST 활성의 증가가 관찰되며, 이들 환자의 다른 간 기능 검사에서 음성을 나타내므로 이러한 혈중 AST 활성의 상승은 근 위축에 따른 결과라 보고하였다. 또한 Lin 등(1999)은 간 이외에 골격근에서도 다량의 AST가 존재하며, 근 위축증이 있는 환자에서 이들 혈중 AST의 상승이 초래된다고 보고하였고, Begum 등(2000)은 근 위축뿐만 아니라 잠재성 근육 질환이 있는 환자의 경우 혈중 AST활성의 증가가 초래될 수 있어 근육 질환을 조기에 진단하는 하나의 중요한 지표가 된다고 하였다. 본 연구에서 좌골신경 절단 백서에서 불용성 근위축이 초래되었으며, 이 결과 혈중 AST가 혈중으로 유리된 결과 현저한 혈중 AST의 활성 증가가 관찰되는 것으로 생각된다. 또한 이러한 혈중 AST 활성의 증가는 불용성 근위축뿐만 아니라 광범위한 근육 질환을 진단하는 임상학적인 하나의 지표가 될 것으로 생각된다. 본 연구에서는 초음파 치료 후 AST와 CPK 활성이 치료강도에 따라 활성증가가 있음을 확인할 수 있었다.

말초신경 손상은 흔히 접할 수 있는 임상적인 문제이며, 중추신경과는 달리 손상의 정도에 따라 생체 내에서 어느 정도의 재생이 가능하고, 신경손상 후 호전되는 결과를 얻기 위한 방법을 개발하기 위하여 지속적인 연구가 진행되고 있다(Fawcett와 Keyne, 1990).

정우제 등(1983)은 좌골신경에 손상을 준 후 비복근과 가지미근에서 신경이 재생되는 시기에 따른 근섬유형의 변화를 관찰한 결과, 신경 손상 후 초기에 급성 염증 세포와 대식세포의 침윤이 근육 사이에서 보이고, 핵이 정상에 비해 동그랗게 되는 소견을 관찰된다고 하였다. 본 연구에서 비복근의 근섬유를 관찰한 결과, 실험군에서 대조군에 비해 크기가 현저하게 감소되고, 예각의 불규칙한 형태로 변형되어 있는 근섬유를 쉽게 볼 수 있었으며, 손상 후 초음파를 적용한 실험군 II, III에서도 위축 소견을 나타냈으며, 전반적으로 손상군에 비해 손상 후 초음파 치료군의 근섬유의 위축 정도가 덜한 것으로 관찰되며, 탈신경근에 대한 신경재지배의 초기 신호로 생각되

는 근 섬유형 군집현상도 더 빠르게 나타나는 것으로 판단된다.

이러한 결과들을 종합해보면, 말초신경 손상 후 초음파 치료가 신경의 회복을 촉진시키고, 더불어 근위축이나 변성을 지연시키는 것을 알 수 있었다.

V. 결 론

본 연구는 생후 9주령 SD계 백서 160마리를 각 군당 5마리씩 4군으로 분류하여 초음파치료 6주를 하여 근섬유의 c-fos, BDNF, 근다발의 두께 변화 및 혈중 AST와 CPK 활성변화를 관찰하였다. 또한 체중변화에 대한 근의 변화량, 혈액학적 소견, 조직학적 소견, 광학현미경 검사를 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 비복근, 가지미근, 내측비복근 근 무게 변화에서는 정상측과 환측의 실험군 별로 유의한 차이는 없었다.

2. 조직학적 검사에서는 대조군의 단면에서 선명한 근위축의 변화를 보였고, 치료군에서 근다발 및 주위조직의 경미한 회복양상이 나타났다. 비복근의 형태학적 관찰에서 실험군 II는 7일 경과 후 근섬유들에서 심한 근위축이 관찰되었다. 실험군 III은 손상 14일 경과 후 근섬유에서 근위축이 경미하게 회복되는 소견을 보였으며, 손상 28일 경과 후 근섬유들이 다각형의 형태를 보이며 회복이 상당히 진행되었음을 관찰 할 수 있었다.

3. c-fos 면역반응에서 실험군 II는 손상 1일 후에 현저히 증가되었으나, 손상 7일에서도 증가를 나타냈었으며, 실험군 III은 1일 후에 현저히 증가하였고, 손상 후 7일에 현저히 감소하는 경향을 나타내었다. 손상 14일 이후에서는 유의한 차이를 관찰할 수 없었다.

4. BDNF 면역반응은 대조군과 실험군 III에서 손상 7일 이후에 유의하게 증가되었으며, 실험군 III은 손상 14일에서 현저히 증가하는 경향을 나타내었다. 손상 28일 이후에서는 유의한 차이가 없었다.

5. 혈액학적 검사로 AST, CPK의 활성변화에서 AST 활성은 치료군 별로는 다소 증가된 수치를 나타내었으나 유의하지 않았으며, CPK 활성은 대조군에 비해 치료군에서 유의한 증가를 나타냈다.

이상의 결과로 말초신경 손상 후 초음파 치료가 유해 자극의 전달을 감소시키고 신경의 회복을 촉진시키며, 근

위축이나 변성을 지연시키는 기능적 향상을 가져오는 것으로 생각된다.

〈 참고 문헌 〉

- 이원택, 이주강, 강은정 등 : 흰쥐의 실험적 관절염 모델에서 capsaicin이 척수의 c-fos 단백질 및 척수신경절의 substance P, CGRP에 미치는 영향. 대한해부학회지, 32: 761-773, 1999.
- 정우제, 정인혁, 박경아 등 : 흰쥐의 좌골신경 손상이 근육에 미치는 영향에 대한 조직화학적 연구. 연세의대논문집, 16(2): 358-371, 1983.
- 정진우, 권재영, 김해규 등 : 백서의 좌골신경 손상에 미치는 저출력 레이저의 효과(IR-Laser). 대한통증학회지, 5(1): 44-51, 1992.
- 한정옥 : 백서에서 좌골신경의 절단 및 phenol 국소침윤이 척수의 c-fos 발현에 미치는 영향. 한양대학교원, 박사학위논문, 1999.
- Abbadie C, Besson JM : C-fos expression in rat lumbar spinal cord during the development of adjuvant arthritis. Neuroscienc, 48: 985-993, 1992.
- Baldes EJ, Herrick JF, Stroebel CF : Biological effects of ultrasound. Am J phys. Med., 37: 111-120, 1958.
- Barnett SB, Ter Haar GR, Ziskin MC et al. : Current status of research on biophysical effects of ultrasound. Ultrasound in Med. & Biol., 20: 205-218, 1994.
- Begum T, Oliver MR, Korenberg A J, et al. : Elevated aminotransferase as a presenting finding in a patient with occult muscle disease. J Paediatr. Child Health, 36: 189-190, 2000.
- Bullitt E : Expression of c-fos like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. J Comp. Neuro., 296: 517-530, 1990.
- Chapman V, Buritova J, Honore P et al. : 7-nitroindazole, a selective inhibitor of neuronal nitric oxide synthase reduces formalin evoked c-fos expression in dorsal horn neurons of the rat spinal cord. Brain Res, 697: 258-261, 1995.
- Coakley WTP : Bilphysical effects of ultrasound at therapeutic intensities. Physiotherapy, 64: 166-169, 1978.
- Dumitru D : Nerve conduction study. Electrodiagnostic medicine St. Louis: Mosby: 111-115, 1995.
- Fawcett JW, and Keynes. RJ : Peripheral Nerve regeneration. Annu. Rev. Neurosci, 13: 43-60, 1990.
- Gomez-Pinilla F, Ying Z, Roy R et al. : Voluntary exercise induces a BDNF mediated mechanism that promotes neuroplasticity. Journal of Neurophysiology, 88(5): 2187-2195, 2002.
- Harris JA : Using c-fos as a neural marker of pain. Brain, Res, Bull., 45: 1-8, 1998.
- Hathaway CB, Hu JW, Bereiter DA : Distribution of Fos-like immunoreactivity in the caudal brainstem of the rat following noxious chemical stimulation of the tempomandibular joint. J Comp. Neurol., 356: 444-456, 1995.
- Iwanczak. F, stawarski. A, Potyrala. M. et. al. : Early symptoms of Duchenne muscular atrophy-description of case of an 18-month old and an 8-year old patient. Med. Sci. Monit., 6: 592-595, 2000.
- Kawabuchi, M, He, JW, Ting, LW, Zhou, CJ, et al. : Morphological features of nerve terminal degeneration as part of the remodeling process in the motor endplate in adult muscle. ultrastruct. Pathol., 24: 279-289, 2000
- Kokaia Z, Nawa H, Uchino H et al. : Regional brainderived neurotrophic factor mRNA and protein levels transient forebrain ischemia in the rat. Brain Res. Mol. Brain Res., 38: 139-144, 1996.
- Lanteri-Minet M, Weil-Fugazza J, de Pommery J et al. : Hindbrain structures involved in pain processing as revealed by the expression of c-fos and other immediate early gene proteins. Neuroscience, 58: 287-298, 1994.

- Lehmann JF, Masock AJ, Warren CG et al. : Effect of therapeutic temperature on tendon extensibility. *Arch. Phy. Med. Rehabil.*, 51: 481-487, 1970.
- Lin YC, Lee WT, Huang SF, et al. : Persistent hypertransaminasemia as the presenting finding of muscular dystrophy in childhood. *Acta. Paediatr. taiwan*, 40: 424-429, 1999.
- McAllister, AK, Katz LC, Lo DC : Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 295-318, 1999.
- Meyer M, Matsuoka I, Wetmore C et al. : Enhanced synthesis of brain derived deuterotrophic factor in the lesioned peripheral nerve-different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *Journal of Cell Biology*, 119: 45-54, 1992.
- Morgan JI, Curran T : Stimulus-tarnssription soupling in the nervous system : Involvement of the inducible proto- oncogenes fos and jun. *Annu. Rev. Nerosci*, 14: 421-451, 1991.
- Redenbach DM, Ovalle WK, Bressier BH : Alterations in contractile properties of extensor digitorum longus muscle from C57BL/6J mice following denervation at 1 day of age. *Exp. Neurol.*, 100: 542-555, 1988.
- Roger MN, Karen WH, Dean PC : Clinical electrotherapy. 3rd ed. Appleton & Lange, 411-417, 1999.
- Skup M, Dwornik A, Macias M et al. : Long term locomotor training up regulates TrkB(FL) receptor like proteins, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 4 with different topography of expression in oligodendroglia and neurons in the spinal cord. *Experimental Neurology*, 176(2): 289-307, 2002.
- Sodikoff GH : Laboratory profiles of small animal diseases a guide to laboratory diagnosis. 2nd ed., Mosby-Year Book Inc. 3-20, 1995.
- Strassman AM, Vos BP : Somatotopic and laminar organization of fos-like immunoreactivity in the medullary in the and upper cervical dorsal horn induced by noxious facial stimulation in the rat. *J Comp. Neurol.*, 331: 495-516, 1993.
- Thanos S, Heiduschka P : Implantable bioelectronic interfaces for lost nerve functions, *Progress in Neurobiology*, 55(3): 433-461, 1998.
- Tokunaga A, kondo E, Fukuoka T et al. : Excitability of spinal cord and gracile nucleus neurons in rats with chronically injured sciatic nerve examined by c-fos expression. *Brain Res.*, 847: 321-331, 1999.
- Uchii M, Takashima M, Sugiyama T, Kosaka N: Effect of KW-8232, a novel anti-osteoporotic agent, on bone loss in sciatic neurectomized rats. *Jap. J. Pharmacolos* 78: 241-243, 1998.
- Walton MR, Dragunow M : Is CREB a key to neuronal survival *Neurosic*, 23: 48-53, 2000.
- Weinreb M, Pathel HO, Ben-shemenn S : Short-term healing kinetics of cortical and cancellous bone osteopenia induced by unloading during the reloading period in young rats. *Virchows Arch.*, 431: 449-452, 1997.