

하악골 신장술 후 하치조신경의 조직학적 변화와 신경성장인자의 발현에 대한 연구

박봉욱¹ · 김종렬² · 변준호¹

¹경상대학교 의과대학 치과학교실 구강악안면외과, ²부산대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract

HISTOLOGICAL CHANGES AND EXPRESSION OF NERVE GROWTH FACTOR IN THE INFERIOR ALVEOLAR NERVE AFTER DISTRACTION OSTEOGENESIS

Bong-Wook Park¹, Jong-Ryoul Kim², June-Ho Byun¹

¹Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Medicine, Gyeongsang National University

²Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Pusan National University

Distraction osteogenesis (DO) is frequently used technique in reconstruction of bony defects resulted from tumor resection, congenital deformity, and trauma in the maxillofacial region. Although the histologic and ultrastructural changes associated with distraction osteogenesis have been extensively described, the exact changing of the surrounding tissues, such as nerve tissues, were still unclear. This study observed the histological changes and the expression of nerve growth factor (NGF) in the inferior alveolar nerve (IAN) after distraction osteogenesis. Unilateral mandibular distraction (0.5 mm twice per day for 10 days) was performed in eight mongrel dogs. Two animals were sacrificed at 7, 14, 28 and 56 days after completion of distraction, respectively. The distracted IAN and contralateral control nerve were harvested and processed for histological and immunohistochemical examinations. The signs of acute nerve injuries, such as demyelination and partial discontinuation of nerver fiber, were observed in the distracted IAN on 7 and 14 days after distraction. The initial remyelination and regeneration of distracted IAN were showed at 14 days after completion of distraction. At 56 days later, the histologic features of distracted IAN was similar to those of the normal control IAN. The expression of NGF was significantly increased in most distracted nerve tissues on 7, 14 and 28 days after distraction. On 56 days after distraction, the expression of NGF returned to the normal level. This study suggested that the acute IAN injury caused by mandibular distraction were mostly recovered during consolidation period. The NGF was seemed to be induced from Schwann cell and damaged nerve tissues, and it may have important roles in the initial healing of damaged nerves.

Key words : Mandibular distraction osteogenesis, Inferior alveolar nerve, Nerve growth factor

1. 서 론

최근 들어 악안면부 종양, 기형 및 외상 등으로 인한 악골의 결손시 골이식술 대응으로 골신장술의 사용이 일반화 되었다. 현대적 의미의 골신장술이 임상적으로 체계화된 것은 1950년대 러시아 의사인 Ilizarov^{1,2)}에 의해 하지에 적용된 골신장술의 연구 성과가 알려지기 시작하면서 부터이다. 그는 성견의 경골에 대한 골신장술에서 1 mm/day의 속도로

한번에 0.25 mm씩 4번에 걸쳐서 골을 신장하는 것이 가장 효과적이라 하였다²⁾. 악골에 골신장술의 개념이 도입된 것은 Snyder 등³⁾이 실험동물의 하악골에 골신장술을 처음으로 적용하면서 부터이고, 그 후 Karp 등⁴⁾이 5개월 된 10두의 미성숙 견의 하악골에 골신장술을 1 mm/day로 20일간 실시하여 장골에서와 같이 막내골화의 신생골 재생이 이루어 진다고 하였다.

임상적으로 악골에 골신장술을 이용한 것은 McCarthy

등⁵⁾이 4명의 소아 환자에게 평균 75개월 동안 18-24 mm의 하악골을 신장한 것을 발표한 것이 처음이며, 그 후 골신장술에 대한 활발한 실험적, 임상적 연구는 지금까지 이어지고 있다. 골신장술에 대한 이러한 연구는 지금까지 신장되는 골 자체의 변화에 대한 연구와 효과적인 골 생성을 위한 방법 등에 치중 되었으며, 최근들어 골신장술에 따른 골 주변조직의 변화에 대해 관심이 높아졌다. 특히 주변조직 중 신경조직에 대한 연구는 아직도 명확히 결론짓지 못하였다. 실제로 사지의 골신장술시에는 0%-30% 정도의 환자에서 지각이상이 동반된다고 보고되고 있는데 반해^{6,7)}, 하악골의 골신장술시에는 약 27%-52% 정도의 높은 비율로 감각장애가 나타난다고 하였다⁸⁾. 이는 하치조신경이 하악관 안에 갇혀 있기 때문에 골 신장술시 손상 받을 확률이 상대적으로 많으며, 또한 하악골의 골절단시 하치조신경이 직접 손상에 받는 경우가 높기 때문이라고 하였다⁹⁾.

하악골 신장술 후 하치조신경과 이신경에 대한 연구는 크게 조직학적 검사, 신경전도 검사, 그리고 면역조직화학 검사 등을 통하여 이루어진다. 현재까지의 동물실험에서의 결과는 약 1 mm/day의 속도로 하악골을 신장하면 하치조신경은 중등도의 왈리안 변성(Wallerian degeneration)이 나타나며, 이러한 변성과 동시에 재수초화나 신경섬유의 재생이 나타나서 신경기능이 회복된다고 하였다^{2,10,11)}. 일반적으로 이러한 신경 손상 후의 재생에는 슈반세포(Schwann cell)가 중요한 역할을 하면서⁹⁾, 동시에 많은 신경영양성인자(neurotrophic factors)들이 관여함이 밝혀졌다¹²⁾. 신경영양성인자는 크게 neurotrophins군, neurokines군, 그리고 전환성장인자(transforming growth factor, TGF-β)군으로 나눌 수 있다¹²⁾. 이 중에서 neurotrophin군에 속하는 신경성장인자(NGF)는 가장 대표적인 신경유도인자(nerve-derived factor)로서 신경조직내외에서 신경재생에 중요하고 다양한 역할을 한다고 알려져 있다.

이에 본 연구는 하악골 신장술에 따른 하치조신경의 변화와 그 재생과정에 대한 지견을 얻고자, 성견의 하악골을 신장한 후 하치조신경의 조직학적인 변화를 살펴보고, NGF에 대한 면역조직화학적 검사를 시행하여 손상 받은 신경의 재생시 이의 역할을 추적하고자 하였다.

II. 연구대상 및 방법

1. 실험재료

실험을 위하여 체중 10 kg 내외의 1-2년 잡종성견 8 마리를 암수 구별 없이 사용하였다. 실험동물은 안정상태를 유지하기 위하여 수술 1주간의 적응기간을 주고, 이 시기 동물용 고형사료와 물을 이용하여 사육하였다. 실험동물은 수술 전 8시간 동안 금식을 유지한 다음 골 신연기구를 부

착하는 수술을 실시하였다. 골 신연기구는 구강내 골 신장기(Intraoral distractor, Model No. 62-00702, Leibinger, Germany)를 사용하였다.

2. 수술 및 골신장 방법

실험동물의 마취를 위하여 케타민(Ketalar[®], 유한양행, 한국) 10 mg/kg과 2% Xylazine(Rompun[®], 바이엘 코리아, 한국) 2.0 mg/kg을 혼합하여 정맥주사하여 전신마취를 시행하였다. 실험동물의 양쪽 하악골과 구강내에 베타딘으로 소독 후 1:100,000 에피네프린을 함유한 2% 리도카인(광명제약, 한국)을 우측 하악 하연에 피하주사 하였다.

우측 하악골 하연에 평행한 피부절개를 가하고 단계적으로 골막하 부위까지 박리하여 우측 하악골의 협측 및 설측 피질골을 노출시켰다. 이때 하악 제3소구치와 제4소구치 사이 또는 제4소구치와 제1대구치 사이에 협설측 피질골절단술을 계획하였으며, 설측 골막은 최소한으로 조심스럽게 fissure bur가 들어갈 정도만 견인하였다. 그 후 fissure bur를 이용하여 양쪽 치아사이에서 교합면에 수직으로 협설측 피질골만 절단하였고, 하치조신경이 손상 받지 않게 조심스럽게 하악골을 선상 골절시킨 후 협측 피질골에 골신장기(Leibinger, Germany)를 부착하였다(Fig. 1). 골신장기를 하악골에 부착시 하치조신경에 손상을 주지 않기 위하여, 피질골 나사는 최대한 치조골쪽에 가깝게 부착하였다. 하악 후연 피부를 천공시킨 후 골신장기 봉(distractor rod)을 하악 후방 부위에 노출시켰다. 이후 협측 골막과 근육을 최대한 견인하여 봉합한 후 하악 하연의 피부를 봉합하였다. 술 후 5일간 1세대 Cephalosporin(Cefazolin sodium[®], 유한양행, 한국)을 20 mg/kg 용량으로 하루 2회 근주하였다.

골절단과 골신장기 장착 후 5일 동안 휴지기를 두어 손상된 골막의 재생과 염증의 소실 및 일차성 가골이 형성되도록 하



Fig. 1. Mandibular distractor placed through a sub-mandibular approach.

였다. 수술 6일째부터 하악 후방으로 노출된 골신장기 봉을 이용하여 골신장기를 한 번에 0.5 mm씩, 1일 2회 활성화시켜, 하루에 1.0 mm의 속도로 10일간 골신장을 하였다.

3. 표본의 제작

골신장 후 7일, 14일, 28일 그리고 56일째 각각 2 마리의 실험동물을 희생하였다. 희생은 전신마취상태에서 염산칼륨(KCl)용액을 혈관내로 다량 투여하여 이루어졌다. 실험동물의 희생 직후 골신장을 실시한 우측 하악골체 부위(실험군)를 블록절제(block resection) 하여 신장된 하치조신경을 조심스럽게 분리하였다. 반대측 하악골체 부위(대조군)도 같은 방법으로 블록절제 후 정상적인 하치조신경을 분리하였다.

분리한 신경조직은 10% 중성 포르말린 고정액(10% neutral buffered formalin)에 24 시간동안 고정하였으며, 이 후 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 파라핀 블록을 만들었다. 이 블록은 다시 4 μm 두께로 절편을 만들었고, 일반적인 조직소견을 관찰하기 위하여 Hematoxyline-eosin (HE) 염색을 실시하였고, 수초(myelin)의 손상을 보기 위하여 Luxol Fast Blue(LFB) 염색을 시행하였다.

신경성장인자 항체에 대한 면역염색을 위하여 자동면역염색기인 Automated Immunostainer(Ventana, Biotek system, Tucson, Ariz, USA)를 사용하였다. 먼저 4 μm 두께로 절편을 만든 후 염색과정에 조직이 탈락하는 과정을 최소화하기 위하여 silane을 코팅된 슬라이드글라스를 사용하였으며, 절편은 실온에서 12시간 보관한 후 탈파라핀과 함수 과정을 거친 뒤 자동면역염색기를 사용하여 면역염색하였다. 신경성장인자의 발현에는 1:100으로 희석한 일차 항체인 rabbit polyclonal antihuman NGF(sc-548, Santa cruz, CA, USA)을 사용하였으며, 반응시킬 슬라이드글라스는 특별한 전처리 없이 사용하였다. NGF의 일차 항체는 과산화수소로 내인성-페록시다제(endogenous

peroxidase)를 차단한 뒤 37도에서 32분간 반응시켰다. 그 후 슬라이드글라스를 Biotin을 부착한 이차항체인 biotinylated polyvalent secondary antibody 용액으로 처리하였다. 조직은 이후 다시 horseradish peroxidase-conjugated avidin-biotin complex로 반응시킨 후 3,3-diaminobenzidine과 과산화수소를 사용하여 발색하였으며, hematoxyline으로 핵을 대조 염색하였다.

HE와 LFB 염색한 조직은 각각 200배 확대 하에서 신경의 신장방향인 장축방향으로 조직절편을 만들어 관찰하였고, NGF의 면역조직화학적 발현은 100배 확대 소견에서 관찰하였다.

4. 면역조직화학 발현 값의 정량분석

NGF의 발현은 양성(positive)과 음성(negative)을 구분하고, 각각의 발현강도는 Computer system을 이용한 Image analyzer(Quantity One®, 1-D Analysis Software, BIO-RAD, CA, USA)로 정량분석 하여 대조군과 비교하였다. 각각의 군에서 5개의 조직 영상을 만들어 정량분석 후 평균값과 표준편차를 구하였으며, 각각의 실험군은 대조군과 비교하기 위하여 Wilcoxon's rank sum test를 시행하여 5% 유의수준에서 변화된 값의 통계학적 유의성 여부를 구하였다.

Ⅲ. 연구결과

1. 골신장술의 평가

모든 실험동물에서 골신장술은 순조롭게 시행되었으며, 창상감염과 골신장술 실패 등의 특별한 문제는 발생하지 않았다. 골신장술 완료 28일과 56일째에는 골신장 부위 신생골의 형성을 일반 방사선 사진으로도 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

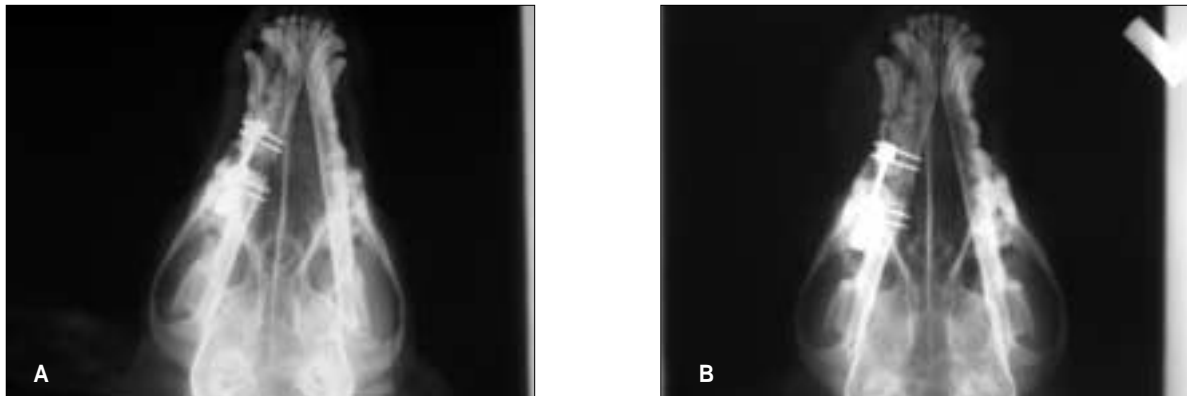


Fig. 2. Radiographs demonstrating the distraction and healing of the mandible. (A) Immediately after completion of distraction showing a distraction gap. (B) 28 days after completion of distraction; note the bone consolidation within the gap.

2. Hematoxyline-eosin(HE) 및 Luxol Fast Blue (LFB) 염색 소견

대조군의 하치조신경 절편에서는 HE 염색상 균일한 슈반세포 핵의 분포, 일정한 수초의 두께, Ranvier node의 규칙적인 배열이 관찰되며, 각각의 신경섬유도 균일하고 일정한 두께를 가지며 배열되어 있었다. 신경내막(endoneurium) 안쪽에 축삭의 주행을 관찰할 수 있었다. LFB 염색에서 일정한 배열의 신경섬유와 균일하고 조밀한 수초(myelin)의 배열을 관찰하였고, 신경섬유 안쪽에 지질(lipid) 성분이 탈회되어 나타나는 벌집모양(honey-comb) 소견이 관찰되었다(Fig. 3-A & 4-A).

골신장 완료 후 7일째 HE 염색 소견은 수초의 파괴와 흡수로 인한 사강(dead space)이 신경섬유들 사이에 관찰되었고, 지질의 탈회로 나타나는 벌집모양의 소견은 관찰되지 않았다. 슈반세포 핵의 모양이 대조군에 비해 길쭉해 졌으며, 관찰되는 핵의 수와 크기도 대조군에 비해 증가된 소견을 보였다. 또한 규칙적인 Ranvier node의 배열도 관찰되지 않았다. LFB 염색 소견상 수초의 파괴와 단절이 확실히 관찰되고, 파괴된 수초 잔사(myelin sheath debris)가 부

분적으로 관찰되었다(Fig. 3-B & 4-B).

골신장 완료 후 14일째 HE 염색상은 신장 후 7일째의 소견과 크게 차이가 없으면서 슈반세포 핵은 여전히 길어지고, 관찰되는 수와 크기가 증가되어 보였다. 하지만, LFB 소견상 7일 후와 비교하여 수초의 부분적인 재생을 관찰할 수 있었고, 수초의 배열도 좀더 조밀해 졌다. 작은 수초 잔사들은 신경섬유내에서 흡수되고 있는 소견을 보였다(Fig. 3-C & 4-C).

골신장 완료 후 28일째에는 HE와 LFB 염색상 슈반세포 핵의 크기와 관찰되는 수가 신장술 후 14일째와 비교하여 현저히 감소되었고, 모양도 장방형에서 다시 원형 또는 타원형이 많으며, 신경섬유에 평행하게 배열되어 있었다. 또한 수초와 신경섬유의 연속성이 회복되었고, 배열도 상당히 균일해졌다. 대조군에서 관찰되던 신경섬유내의 벌집모양 소견이 다시 관찰되기 시작하였다(Fig. 3-D & 4-D).

신장술 후 56일째의 조직소견은 HE와 LFB 염색 소견 모두에서 수초와 신경섬유의 연속성이 회복되어 대부분 대조군과 유사한 소견이었다. 하지만, 신경섬유 사이의 사강(dead space)은 부분적으로 관찰되었다(Fig. 3-E & 4-E).

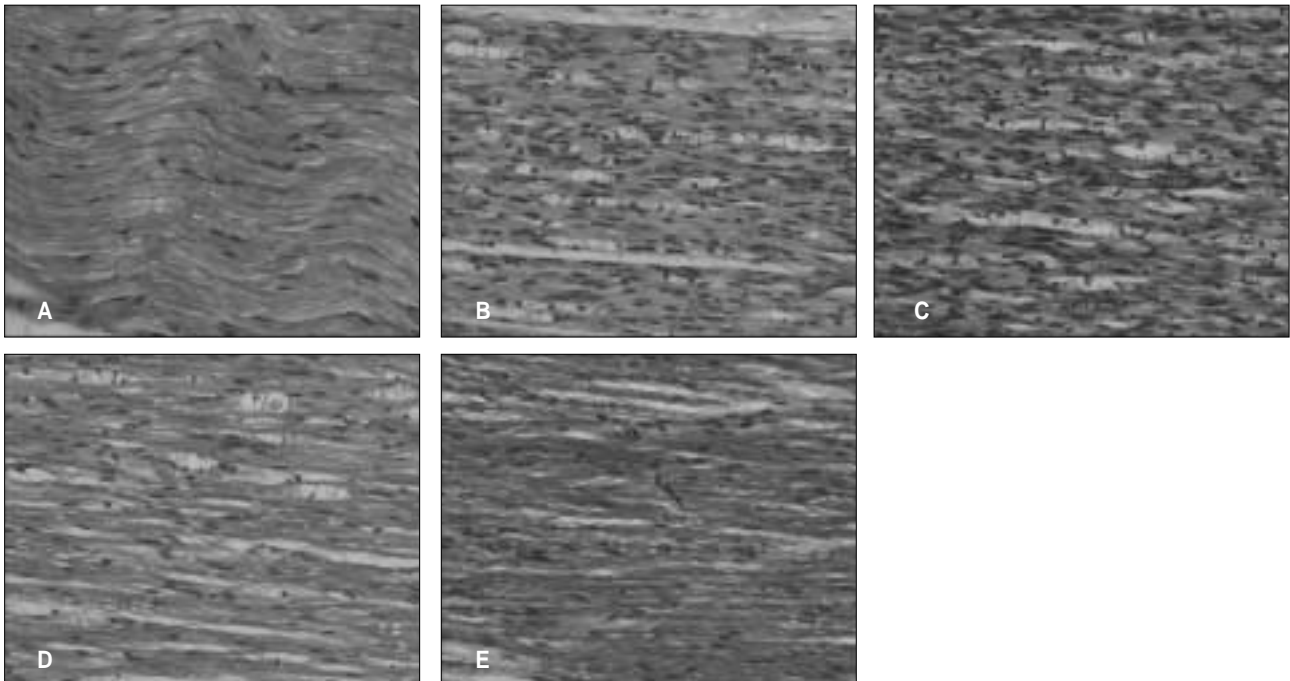


Fig. 3. Microscopic view of inferior alveolar nerve after Hematoxyline-eosin staining (Control (A), 7 days (B), 14 days (C), 28 days (D) and 56 days (E) after completion of distraction, original magnification, $\times 200$).

(A) The endoneurium, Schwann cell nuclei, and node of Ranvier were regularly arranged in control nerve. (B) At 7 days after completion of distraction, it showing the discontinuation of myelin sheath, increased dead space between the endoneurium, and elongation of the Schwann cell. (C) There are no specific difference between 7 days and 14 days later of distraction, it showing the disrupted nerve fiber and degenerative changes. (D) At 28 days later, the number and size of the Schwann cell nuclei showed to decrease. (E) At 56 days later, the continuation of nerve fiber and the size of nucleus are returned to normal features.

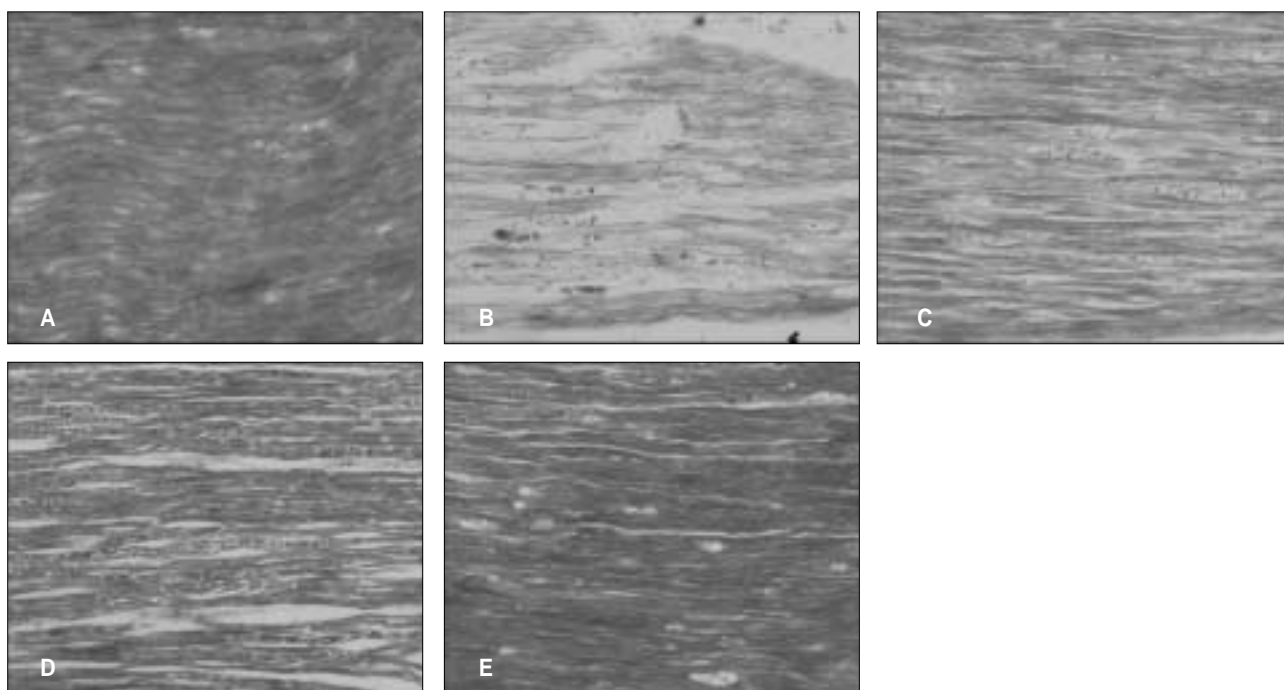


Fig. 4. Microscopic view of inferior alveolar nerve after Luxol Fast Blue staining (Control (A), 7 days (B), 14 days (C), 28 days (D) and 56 days (E) after completion of distraction, original magnification, $\times 200$).

(A) It showing intact myelin sheath and axon in control nerve. (B) There are severe myelin sheath destruction and discontinuation of nerve fiber at 7 days after completion of distraction. (C) At 14 days later of distraction, we can see the some regeneration of myelin sheath compared with 7 days later, but the disrupted and thinned myelin sheaths are observed at this time. (D) At 28 days after completion of distraction, the continuation and thickness of myelin sheath are increased, and it showing return to normal at 56 days later of distraction (E).

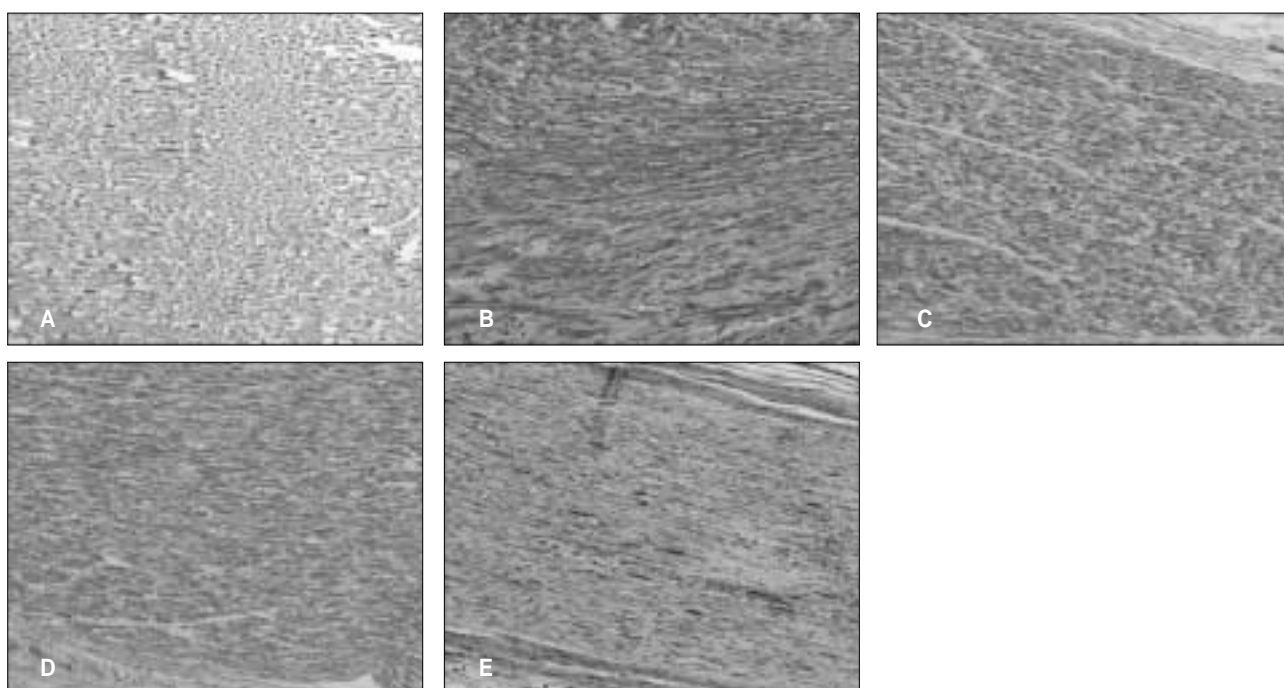


Fig. 5. Expression of nerve growth factor in the inferior alveolar nerve (Control (A), 7 days (B), 14 days (C), 28 days (D) and 56 days (E) after completion of distraction, original magnification, $\times 100$).

(A) Nerve growth factor (NGF) is evenly and weakly distributed along the normal axons. (B) At 7 days after distraction, NGF showing very strong staining in all distracted nerve fibers, and this strong expression of NGF is prolonged to 14 and 28 days later of distraction (C and D). (E) At 56 days later of distraction, the expression of NGF is similar to control specimen.

Table 1. Mean Values of the Image Intensity after Computerized Image Analysis (Staining Intensity/mm²)

	Control	7 days later	14 days later	28 days later	56 days later
NGF	918.29 (100%) [†]	1591.47* (173%) [†]	1530.18* (167%) [†]	1415.26* (154%) [†]	960.80 (105%) [†]

* : There are significant changes compared with the control value after statistical analysis (Wilcoxon's rank sum test, $p < 0.05$).

† : relatively changed ratio of distracted nerve compared with control nerve (regarded as 100%) in NGF expression.

3. 면역조직화학적 발현

(1) 신경성장인자(nerve growth factor, NGF)의 발현
대조군의 하치조 신경에서는 신경축삭 절단면에서 NGF가 약하게 발현 되었다. 골신장 완료 후 7일째에 NGF의 발현이 가장 증가되어 나타났다. 신장술 후 14일째에도 NGF의 발현은 7일째와 유사하게 강한 발현을 보였다. 골신장 후 28일째에는 7일과 14일째 보다 발현이 다소 약화되었지만 대조군과 비교하여 여전히 강한 발현을 보였다. 하지만 골신장 후 56일째에서 NGF의 발현이 급격히 감소하여 대조군과 유사하게 약한 발현을 보였다(Fig. 5).

골신장 후 NGF는 슈반세포, 신경수초, 그리고 축삭 등의 거의 모든 신경조직에서 발현이 관찰되었으며, 특히 신장된 신경조직내의 미세혈관(neurovasorum) 내피세포에서도 NGF의 발현이 관찰되었다.

(2) NGF 발현의 정량분석

컴퓨터상분석법(computerized image analysis system)을 이용한 분석 값은 아래(Table 1)에 나타내었다. 대조군의 값을 100%로 볼 때 각각 실험군의 값이 변화된 정도를 백분율로 환산하여 비교해보면, 골신장 완료 후 7일, 14일 그리고 28일째의 값이 대조군 값보다 각각 1.73배, 1.67배 그리고 1.54배 높았다($p < 0.05$).

IV. 총괄 및 고찰

골신장술이 선천기형의 회복과 외상 및 종양 수술 후의 재건 등에 이용되면서 골신장술에 따른 골 주변조직의 변화가 관심거리였다. 특히 신경조직은 쉽게 손상 받고 재생 또한 느리므로 골신장술에 따른 주변 신경조직의 손상을 최소화 하는 것이 무엇보다 중요하게 다루어져야 한다.

따라서 여러 선학들이 사지의 골신장술에 따른 주변 신경조직의 손상과 재생에 대해서 연구하였는데, Ilizarov는 성견의 하지를 1 mm/day 속도로 하루 한 번 또는 2 mm/day 속도로(한번에 0.5 mm씩 하루 네 번) 골신장 하는 것 모두에서 신경조직의 심각한 손상이 관찰된다 하였

고, 1 mm/day 속도로 한번에 0.25 mm씩 하루에 네 번 골신장하는 것이 골과 주변조직에 손상이 가장 적다고 하였다²⁾. Fink 등¹³⁾은 동물실험에서 개의 하지를 1 mm/day 속도로, 한번에 0.5 mm씩 하루 두 번, 총 25일간 신장술 후 비골신경(peroneal nerve)과 경골신경(tibial nerve) 모두에서 탈수초화 같은 신경의 형태학적 변화를 관찰하였는데, 이러한 변화는 경화기를 거치지 않아도 손상 직후부터 재수초화 등의 신경재생이 시작된다고 하였다. Skoulis 등¹⁴⁾은 쥐의 대퇴골을 25 mm 신장하여 관찰한 결과 좌골신경(sciatic nerve)의 신장율은 11%였으며, 0.5 mm/day와 1 mm/day의 속도로 신장한 군은 신장된 신경의 말단에서만 형태학적 변화가 관찰되지만, 1.5 mm/day로 신장한 군에서는 신장된 신경 뿐 아니라 전체 신경섬유에 걸쳐 조직학적인 변화가 관찰된다고 하였다. 이는 신경조직의 견인시 탄성력이 견딜 수 있을 정도의 힘일 경우는 신경초(perineurium)를 따라 신경조직의 신장이 일어나지만¹⁵⁾, 견딜 수 있는 탄성력을 넘어선 견인력일 때에는 전 신경조직을 따라 신경섬유의 신장이 일어난다는 연구와 유사하였다¹⁶⁾.

하치조신경은 하악골 내부의 하악관 안에 갇혀 있기에 하악골 신장에 따라 쉽게 손상 받을 수 있기에 다른 부위의 신장술 보다 하악골 신장술 후 감각장애 등의 합병증이 더 많이 발생한다^{8,9)}. 하지만, Block 등¹⁰⁾은 실험동물의 하악골을 1 mm/day (0.5 mm twice per day) 속도로 7 mm 신장하고, 4주간의 경화기를 거친 후 전기자극검사(jaw-jerk reflex test)를 실시한 결과 정상군과 차이가 없었으며, 따라서 하루에 1 mm의 속도로 하악골을 신장하는 것은 하치조신경에 아무런 영향을 미치지 않는다고 하였다. 또한 Hu 등¹¹⁾은 동물실험에서 하악골 신장술 후 하치조신경에서 탈수초화와 축삭부종(axonal swelling) 등의 신경조직의 변성이 관찰되지만, 조직학적 소견상 신경손상과 동시에 재수초화와 같은 신경 재생의 증거가 동시에 관찰된다고 하였다. 이는 Wang 등¹⁷⁾이 동물실험에서 골신장 후 약 4주에서 6주 사이에 탈수초화된 신경조직의 재수초화가 시작되었다는 것과는 재수초화의 시기에서 약간의 차이가 나지만 전체적으로 손상 받은 신경조직이 초기에 회복한다는 되는 일치하는 연구결과였다.

신장력에 따라 신경섬유의 반응이 각기 다르게 관찰되는데, Fink 등¹³⁾은 실험동물의 하지를 신장술한 후 말초신경의 변화에 대한 연구에서 유수신경섬유보다 무수신경섬유가 손상을 더 많이 입는데, 이는 신경수초가 견인력에 대해 보호 작용을 하기 때문이라 하였다. 하지만, Hu 등¹¹⁾과 Wang 등¹⁷⁾은 하악골 견인 후 하치조신경의 변화에 대한 연구에서 큰 직경의 유수신경섬유가 견인력에 가장 취약하며, 무수신경섬유와 작은 직경의 유수신경섬유는 2 mm/day 속도의 견인력에도 손상 받지 않는다고 하였다.

본 연구에서는 현미경 소견상 골신장 완료 후 7일째, 유수신경 섬유에 탈수초화와 수초의 단절과 파괴가 집중적으로 진행된 것을 관찰할 수 있었다. 또한 이 시기에 대조군에서 관찰되던 Ranvier node가 관찰되지 않고, 신경섬유의 주행도 불규칙적으로 보이는 등, 신경섬유의 급성 손상이 동반되었다. 신장술 완료 후 14일째에도 여전히 신경섬유의 변성이 관찰되었지만, 이 시기에는 조직소견상 신장술 완료 후 7일째 보다 신경수초가 약간 재생되었음을 알 수 있었다. 이는 골신장 약 2주 후부터 신경조직의 재생이 시작된다는 연구와도 유사한 소견이었다¹¹⁾. 골신장 완료 후 28일째에는 슈반세포 핵의 수와 크기가 14일째와 비교하여 현저히 감소하여 대조군과 유사하였고, 신경섬유의 배열도 조밀해 지면서 재수초화가 상당히 많이 진행되어 수초의 두께가 두꺼워진 것을 관찰할 수 있었다. 신장술 완료 후 56일째에는 대조군과 비교하여 거의 비슷한 소견으로 신경조직의 연속성이 회복되고 수초의 두께도 거의 정상수준으로 돌아온 것을 볼 수 있었다. 이러한 본 연구의 결과를 종합할 때 신장술 직후에 신경조직의 급격한 손상이 관찰되지만, 신장술 약 2주 내에 손상된 신경조직의 재생이 시작되면서 골신장술 완료 약 8주 후에는 거의 정상수준의 신경형태학적인 소견을 보인다고 할 수 있다.

골신장술 후 신경조직의 손상과 재생의 과정에는 여러 가지 복합적인 요소가 작용한다. 그중 슈반세포의 역할이 무엇보다 중요한데, 점진적인 골신장에 따라 신경섬유에 알려진 변성(Wallerian degeneration)이 발생하며, 이는 슈반세포의 증식과 활성을 자극한다. 활성화된 슈반세포는 여러가지 신경영양성인자(neurotrophic factors)와 S-100과 같은 증식과 분화에 관계된 단백질의 합성도 증가시킨다⁹⁾. 이러한 작용은 축삭과 수초의 재생에 영향을 미치고, 골신장술이 진행됨에 따라 신경조직이 적응할 수 있게 한다. 따라서 슈반세포의 역할로 인해 골 신장 후에도 신경의 손상이 초기에 회복된다고 할 수 있다⁹⁾. 이러한 신경조직의 분화, 재생 및 유지에 관여하는 전통적인 신경영양성인자는 크게 세 가지 군으로 나눌 수 있으며, 첫째는 신경성장인자(nerve growth factor, NGF), 뇌유도-신경영양성인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF), neurotrophin-3, 그리고 neurotrophin-4/5 (NT-4/5) 등을

포함하는 neurotrophins군이며, 둘째는 섬모신경영양성인자(ciliary neurotrophic factor, CNTF)와 백혈병억제인자(leukemia inhibitory factor, LIF)를 포함하는 neurokines군이다. 그리고 세 번째는 전환성장인자(transforming growth factors, TGFs)- β 군으로 TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, 그리고 신경아교세포유도-신경영양성인자(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) 등이 여기에 포함된다¹²⁾. 이러한 신경영양성인자중 NGF는 26-kDa을 가지는 비당화 동중이합체 폴리펩티드(nonglycosylated homodimeric polypeptide)이며, 75-kDa의 low-affinity receptor (p75NGFR)와 140-kDa의 low/high-affinity receptor의 두 가지 대표적인 수용체를 가진다. 이중 p75NGFR가 신경손상시 활성화되는 주된 수용체로서, 정상적인 신경조직에서는 발견되지 않지만 신경손상 직후 급격히 상승하여 약 3개월간 지속된 후 감소하는 것이 관찰되었다¹²⁾. 또한 NGF는 말초신경 손상 직후에 급격히 상승하는데, 여기에는 활성화된 대식세포의 이주와 대식세포에서 분비되는 interleukin-1이 중요한 작용을 하리라 보인다^{12,18,19)}.

Farhadieh 등²⁰⁾은 동물실험으로 하악골 신장술 후 하치조신경에서는 슈반세포, 신경수초, 그리고 신경축삭 등 거의 모든 신경조직에서 NGF와 BDNF가 강하게 발현된다고 하였고, 이러한 neurotrophin의 강한 발현은 골신장술에 따른 신경손상으로 인해 만들어진 수초 잔사(myelin sheath debris)가 슈반세포를 자극하여 NGF와 BDNF의 분비를 촉진시키기 때문이라 하였다. 일반적으로 말초신경이 손상을 받으면, 24시간안에 NGF의 농도가 약 10-15배까지 상승하고, 이러한 현상이 약 2주까지 지속 되는데¹⁸⁾, 이는 손상 받은 신경의 원심절편(distal segment)에 있는 슈반세포에서의 NGF 분비가 상승하기 때문이며, 또한 원심절편에 대식세포(macrophage)가 침윤하여 interleukin-1을 분비하는데, 이것이 NGF의 높은 농도를 유지하는 역할을 하기 때문이라고 알려져 있다^{19,20)}. 즉 신경 손상시 슈반세포의 증식과 NGF 농도의 증가는 파괴된 수초 잔사 신호(myelin sheath debris signals)로 기시되며, 이는 침윤된 대식세포에서 유리되는 cytokines에 의해 NGF의 농도가 유도 및 유지 되는 것으로 보고되고 있다¹⁹⁾.

본 연구에서는 하치조신경에서 NGF의 발현을 하악골 신장술 후 경화기 동안 관찰한 결과 골신장술 후 7일째에 가장 강하게 발현되었고, 14일째에도 강한 발현이 유지되었다. 이러한 발현은 슈반세포, 신경수초, 축삭 등 거의 모든 신경조직에서 관찰되었으며, 특히 신경조직내의 미세혈관(neurovasorum)에도 강하게 발현되었다. 신장술 후 28일째에는 NGF의 발현이 약간 감소해 보였지만, 정량분석 소견으로는 아직도 대조군에 비해 강한 발현이 관찰되었다. 하지만 신장술 후 58일째에는 NGF의 발현이 현저히 감소

하여 대조군과 유사하였다. 이러한 결과는 골신장술 완료 직후에는 신장술에 따른 신경손상 때문에 슈반세포 및 대식세포에서 NGF의 생성과 분비가 현저히 증가 되어, 신장술 후 4주까지 높은 농도를 계속 유지하다가 신장술 완료 약 4주에서 8주 사이에 정상수준으로 환원한다는 의미로, 이 시기까지 활발히 신경조직의 재생이 일어난다고 추측 할 수도 있을 것이다. 하지만 일반적으로 NGF는 신경손상 직후부터 약 2주정도 까지 고농도를 유지하다가 이후 점점 감소한다고 알려져 있는데¹⁷⁾, 이는 본 연구의 골신장술 후 약 4주 까지 NGF가 고농도를 유지한다는 결과와는 차이가 있는 것이었다. 이러한 차이는 신장술에 의한 신경손상과 단순 신경손상 간의 손상방법의 차이에 의해 기인하였으리라 추측된다. 즉, 단발성 단순 신경손상인 경우는 2주 정도까지만 신경의 활발한 재생이 이루어지지만, 점진적인 하악골 신장술에 의한 하치조신경의 손상은 좀 더 장기간인 신장술 완료 4주 이상까지 신경의 재생이 이루어지기에, 이 시기까지 손상받은 신경조직의 슈반세포와 대식세포에서 NGF를 계속 생성, 분비한다고 볼 수 있을 것이다.

II. 결 론

저자는 하악골의 골신장술 후 하치조신경의 변화를 연구하기 위하여 1-2세 성견 8두의 우측 하악골에 구강내 골신장기를 장착하여 하루에 1 mm 속도(0.5 mm씩 두 번)로 10일간 골신장술을 실시하였다. 골신장술 완료 후 7일, 14일, 28일 그리고 56일째에 각각 2두의 실험동물을 희생하여 하치조신경을 분리한 후 hematoxyline-eosin과 Luxol Fast Blue 염색을 통하여 조직학적 변화를 관찰하였고, 신경성장인자(NGF) 발현을 연구하기 위한 면역조직화학적 검사를 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 신장술을 시행하지 않은 대조군의 하치조신경에서는 균일한 축삭과 신경내막 및 규칙적인 Ranvier node의 배열을 관찰 할 수 있었다. 신경조직의 횡단면상은 굵은 유수신경의 다발이 규칙적으로 관찰되면서 부분적으로 얇은 유수신경과 무수신경도 관찰 되었다. NGF는 대조군 IAN의 축삭과 수초 및 혈관조직에서 약하게 관찰되었다.
2. 골신장 완료 7일째에는 신경수초의 파괴, 신경섬유의 절단 및 퇴행성 변화 등 신경조직의 급성손상 소견을 관찰 할 수 있었다. 특히 굵은 유수신경을 중심으로 탈수초화가 상당히 진행되었다. NGF와 VEGF 모두 대조군과 비교하여 강한 발현을 보였다. NGF는 손상된 신경의 슈반세포, 수초, 신경내혈관 등 거의 모든 신경조직에서 발현되었다.
3. 골신장 완료 후 14일째에는 조직학적으로 여전히 슈반세포 핵의 증가와 수초의 손상 및 단절이 관찰되지만 부분

적으로 재수초화 소견도 관찰되었다. NGF와 신장술 후 7일째와 비교하여 별 차이 없이 강한 발현을 보였다.

4. 골신장 완료 후 28일째에는 슈반세포의 핵의 모양과 수는 정상적으로 보이고, 탈수초화 된 신경섬유에서 재수초화가 많이 진행되어 수초의 두께가 증가되어 보였다. 하지만 아직 부분적으로는 재생된 수초의 두께가 일정하지 못하였다. NGF의 발현은 신장술 후 14일째에 비해 약간 감소하였지만, 대조군과 비교시 여전히 강한 발현을 보였다.
5. 골신장 완료 후 56일째에는 조직학적 소견으로는 부분적인 수초의 느슨함(loosening)이 관찰되지만 손상된 신경섬유에서 재수초화가 상당히 진행되었고, 신경섬유의 연속성도 거의 회복되어 대조군과 유사할 정도로 정상적인 소견을 보인다. NGF의 발현은 신장술 후 28일째에 비해 현저히 감소하여 대조군과 유사할 정도로 약한 발현을 보였다.

이상의 결과를 요약할 때 점진적인 하악골 신장술에 따라 하치조신경에는 초기 급성 신경손상이 발생하지만, 이는 약 56일의 경화기를 거치는 동안 대부분 조직학적으로 정상수준으로 회복되었다. 손상받은 신경에서 재수초화 등의 증거가 관찰되는 것은 골 신장술 완료 후 14일 이내로 추측되었다. NGF는 신경손상에 따라 슈반세포 및 손상된 신경조직 내에서 분비되어 신장술 완료 약 4주 후까지 신경조직의 재생에 중요한 역할을 수행하는 것으로 추측된다.

참고문헌

1. Ilizarov GA : The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part I. The influence of stability of fixation and soft tissue preservation. Clin Orthop 238 : 249, 1989.
2. Ilizarov GA : The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part II. The influence of the rate and frequency of distraction. Clin Orthop 239 : 263, 1989.
3. Snyder CC, Levine GA, Swanson HM, Browne EZ : Mandibular lengthening in the craniofacial skeleton. Plast Reconstr Surg 51 : 506, 1973.
4. Karp NS, Thorne CHM, McCarthy JG, Sisson HA : Bone lengthening in the craniofacial skeleton. Ann Plast Surg 24 : 231, 1990.
5. McCarthy JG, Schreiber J, Karp NS, Thorne CH, Grayson BH : Lengthening the human mandible by gradual distraction. Plast Reconstr Surg 89 : 1, 1992.
6. Aquerreta JD, Forriol F, Canadell J : Complications of bone lengthening. Int Orthop 18 : 299, 1994.
7. Galardi G, Comi G, Lozza L, Marchettini P, Novarina M, Facchini R, Paronzini A : Peripheral nerve damage during limb lengthening. J Bone Joint Surg 72B : 121, 1990.
8. Gropp H, Wangrin K : Intraoral distraction osteogenesis for lengthening of the mandibular ascending ramus. In: The Abstract Book of International Congress on Cranial and Facial Bone Distraction Process. Paris, France 37, 1997.
9. Hu J, Zou S, Tang Z, Wang D, Li J, Gao Z : Response of

- Schwann cells in the inferior alveolar nerve to distraction osteogenesis: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 32 : 318, 2003.
10. Block MS, Daire J, Stover J, Matthews M : Changes in the inferior alveolar nerve following mandibular lengthening in the dog using distraction osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg* 51 : 652, 1993.
 11. Hu J, Tang Z, Wang D, Buckley MJ : Changes in the inferior alveolar nerve after mandibular lengthening with different rates of distraction. *J Oral Maxillofac Surg* 59 : 1041, 2001.
 12. Frostick SP, Yin Q, Kemp GJ. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurg* 18 : 397, 1998.
 13. Fink B, Neuen-Jacob E, Lehmann J, Francke A, Ruther W : Changes in canine peripheral nerves during experimental callus distraction. *Clin Orthop Relat Res* 376 : 252, 2000.
 14. Skoulis TG, Vekris MD, Terzis JK : Effect of distraction osteogenesis on the peripheral nerve: Experimental study in the rat. *J Reconstr Microsurg* 14 : 565, 1998.
 15. Bora FW Jr, Richardson S, Black J : The biomechanical responses to tension in a peripheral nerve. *J Hand Surg (Am)* 5 : 21, 1980.
 16. Haftek J. Stretch injury of peripheral nerve: Acute effects of stretching on rabbit nerve. *J Bone Joint Surg Br* 52 : 354, 1970.
 17. Wang XX, Wang X, Li ZL : Effects of mandibular distraction osteogenesis on the inferior alveolar nerve: an experimental study in monkeys. *Plast Reconstr Surg* 109 : 2373, 2002.
 18. Levi-Montalcini R : The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237 : 1154, 1987.
 19. Lindholm D, Heumann R, Meyer M, Thoenen H : Interleukin-I regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature* 330 : 658, 1987.
 20. Farhadieh RD, Nicklin S, Yu Y, Gianoutsos MP, Walsh WR : The role of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in inferior alveolar nerve regeneration in distraction osteogenesis. *J Craniofac Surg* 14 : 859, 2003.

저자 연락처

우편번호 660-702
경남 진주시 칠암동 90
경상대학교 의과대학 치과학교실 구강악안면외과
박 봉 욱

원고 접수일 2005년 1월 30일
게재 확정일 2005년 6월 12일

Reprint Requests

Bong-Wook Park

Dept. of OMFS, College of Medicine, Gyeongsang National University
Chilam-dong 90, Jinju-city, Gyeongnam, 660-702, Republic of Korea
Tel: +82-55-750-8264 Fax: +82-55-761-7024
E-mail: parkbw@nongae.gsnu.ac.kr

Paper received 30 January 2005
Paper accepted 12 June 2005