

초음파가 흰쥐의 좌골신경 압좌손상 후 척수내 Neural Cell Adhesion Molecules의 발현에 미치는 영향

김현애, 한종만¹

동대구정형외과의원 물리치료실, ¹경상대학교 의과대학 해부학교실

The Effect of Ultrasound Irradiation on the Neural Cell Adhesion Molecules(NCAM) Expression in Rat Spinal Cord after the Sciatic Nerve Crush Injury

Hyun-Ae Kim, PT, MS; Jong-Man Han, PT, PhD¹

Department of Physical Therapy, Dong-Daegu Orthopedic Clinics; ¹Department of Anatomy, School of Medicine, Kyungsang University

Purpose: This study aimed to compare the effect on nerve regeneration of ultrasound irradiation in rats with peripheral nerve injury. **Methods:** To investigate alterations of the NCAM immunoreactivity in non-crushed part and crushed part of the spinal cord, the unilateral sciatic nerve of the rats were crushed. The expression of NCAM was used as the marked of peripheral nerve regeneration, and also plays an important role in developing nerve system. Experimental animals were sacrificed by perfusion fixation at post-injury 1, 3, 7, 14 days after ultrasound irradiation. The pulsed US was applied at a frequency of 1MHz and a spatial average-temporal average Intensity of 0.5W/of(20% pulse ratio) for 1 mins. The Luxol fast blue-cresyl violet stain were also done to observe the morphological changes. **Results:** Alteration of NCAM immunoreactivity in the crushed part and the non-crushed part of lower lumbar spinal cord were observed. NCAM-immunoreactivity cells were some increased in the dorsal horn lamina I, III and cell ventral horn at 1 day after unilateral sciatic nerve injury. However, there was not significant difference in the relationship between crushed part and non-crushed part. NCAM-immunoreactivity was remarkably increased at 3 days after unilateral sciatic nerve injury in the gray matter and white matter. NCAM-immunoreactivity was increased in the ventral horn and post horn of experimental crushed part. Also, NCAM-immunoreactivity in large motor neurons in ventral horns lamina VIII, IX were increased at 7 days after unilateral sciatic nerve injury. At 14 days after sciatic nerve crushed injury, there was no significant difference. All group were decreased for 14 days. In the time course of NCAM expression, all groups showed a significant difference at 3day groups($p < 0.05$). Whereas, CC group was noted a significant difference between 3day and 7 day group respectively. In NCAM expression, there were significantly increased in all group. In the relationship between CNC group and ENC group, significant difference was detected among 3, 7, 14 day group($p < 0.05$). The difference between CC group and ENC group were noted in all groups($p < 0.05$). **Conclusion:** It is consequently suggested that the effects of the ultrasound irradiation may increase the NCAM immunoreactive neurons and glial cell in the spinal cord after unilateral sciatic nerve crushed injury. Therefore, the increased NCAM immunoreactivity in the spinal cord may reflect the neuronal damage and healing process induced by a ultrasound irradiation after peripheral nerve injury in rat. (*J Kor Soc Phys Ther* 2007;19(2):41-55)

Key Words: Ultrasound irradiation, NCAM expression, Sciatic Nerve Crush Injury

1. 서론

외상으로 인한 말초신경손상이나 소아마비, 근육병 등 신경근육질환 환자에게 적용할 수 있는 치료방법은 다른 임상질환과는 다르게 매우 제한되어 있는 것이 현실이다(편성범 등, 1999). 말초신경 손상 시 치료의 가장 중요한 목표는 가소성을 극대화시킬 수 있는 환경의 조성과 치료법의 개발인데, 현재 외부 자극이 가소성에 미치는 영향에 대한 연구는 매우 부족한 실정이다(장성호와 안상호, 1998). 이러한 면에서 신경 및 근육의 회복을 촉진시키기 위한 전기자극치료는 임상적용이 쉽고 기계화하기 쉬워서 신경 가소성에 미치는 영향에 대한 연구에 많이 이용되어지며, 그 효과에 대해서는 오랜 기간 동안 관심의 대상이 되어왔다. 신경손상 후 신경재생 기전과 신경재생을 촉진시키기 위한 전기자극의 효과에 대해서는 세포 수준에서 동물에 이르기까지 다양하게 진행되어 왔으며 주로 설치류의 말초신경을 대상으로 전기자극의 유용성에 대해 실험되어져 매우 긍정적인 효과가 보고되고 있다(김영기 등, 1999). 최근 전기치료의 한 부분인 초음파는 1939년 Pholmann에 의해 처음으로 치료에 도입된 이래, 조직치유를 가속화시키는 효과와 사용법의 간편성 그리고 선택적으로 조직 온도를 상승시킬 수 있다는 장점 때문에 손상 후 증상완화 및 통증완화 그리고 건, 인대, 근육 같은 연부조직 치료에 널리 사용되어온 심부열 치료기로서 상처치유를 위한 영양공급의 촉진작용으로 급·만성 창상에 널리 이용되고 있다(고현윤과 김경수, 1993; 이재형, 1995; Ito 등, 2000)

초음파의 효과는 크게 온열 효과와 기계적 효과로 구분할 수 있는데, 온열효과에 의한 조직내의 변화로는 해당 조직의 온도 증가(Draper 등, 1995), 신경전도 속도의 증가(Hong 등, 1988), 조직 내의 대사 변화와 생체막의 투과성의 향진,

동통 역치의 증가, 교원질이 풍부한 조직에서의 점탄성의 향진(Dyson와 Suckling, 1978), 세포주기율(Cell cycling rates)의 증가, 모세혈관막과 부종형성과 증가(남기원, 2000) 등이 보고되었다. 기계적 효과로는 크게 가스 형성에 따른 공동형성(cavitation formation)과 음파 흐름(acoustic streaming)으로 나눌 수 있는데, 공동형성은 초음파 에너지가 조직에 전달될 때 국소 압력에 의해 미세 공기방울(microbubbles)등이 팽창되어 진동 운동(oscillation movement)을 일으켜 세포활성의 변화를 야기 시킴으로써 발생되며(이재학, 1995), 치료적 의미에서 완전 공동과 불완전 공동으로 나누어진다(Ahmand 등, 1999). 음파흐름은 세포막의 투과성의 변화를 가져와서(Dyson와 Suckling, 1978) 칼슘 이온과 나트륨 이온의 이온변화를 일으키고 조직의 재형성을 증진시키며 건강한 과립 조직을 생산시킴으로 단백질 합성에 관여한다고 보고되어 왔다(Ito 등, 2000). 1952년 미국 물리의학 협회에서 공식적으로 임상 치료로 채택되어진 이래로 초음파의 조직 재생에 관한 연구는 다양하게 진행되어 왔지만(Dyson 등, 1978; Sterveson 등, 1986), 말초신경 재생과 관련된 연구는 드문 것이 현실이며 치료 상에 있어 현재까지 밝혀진 작용기전도 불분명한 상태이다.

말초 신경의 손상은 1차적으로 손상 신경의 원위부에서 신경 섬유의 변성을 가져와서 척수 전각 내 운동 신경 및 척수신경절의 신경세포에 직접적인 손상을 유발하며, 척수 후각에서도 손상이 유발된다. 또한 축삭, 신경종말기관, 지배 근육의 대사 및 구조적인 변화까지 일으켜, 심하면 신경 지배의 차단으로 탈 신경지배로 인한 위축이 나타나기도 한다. 현재까지 척수 손상과 이로 인한 중추신경계의 영향에 대한 연구가 진행되어 왔으며 이는 사지의 절단이나 결찰로 인한 손상과 관련해서 이루어져 왔다. 일반적으로 척수신경 손상의 연구에는 운동신경섬유와 감각신경섬유 모두를 손상시키는 말초신경절단(peripheral neurectomy)과 감각신경만을 선택적으로 손상시키는 후근 절단(dorsal neurectomy), 말초 신경을 다양한 강도로 결찰하여 만성적인 신경 손상을 유

발하는 방법(Hama 등, 1994) 등이 주고 이용되고 있는데, Devor과 Wall(1981)은 신경 세포재생과 관련된 축부지의 형성을 보기 위해 좌골신경 절단을 유도하였으며, Van Meeteren 등(1994)은 신경전달속도와 기능회복훈련으로 지구력의 증가를 보기 위해 좌골신경 압박 손상을 유도하였다. 또한 Woolf 등(1990)과 Schreyer와 Skene(1991)은 척수신경 손상 시 신경섬유 성장에 관여GAP-43 (growth-associated protein-43)이 증가되어 축삭의 성장과 재생 그리고 연결의 형성 같은 신경성기전(neuronal mechanism)을 발생시키며 이러한 단백질의 증가는 신경 섬유의 재생능력을 반영한다고 주장하였다. Kajander와 Xu(1995)는 만성적 신경결찰손상 시, 동측 척수에서 substance P와 CGRP(calcitonine gene related peptide)의 유전자 발현이 감소된다고 했으며, Hu-tasi 등(1996)은 신경손상 시 신경영양성 인자(neurotrophic factor)중 NGF(nerve growth factor)의 발현으로 조직의 염증의 조절 및 통증감각을 조절해 준다고 보고하였다. 이상과 같이 이러한 말초신경 혹은 후근 절단 및 결찰은 신경말단의 손상, 척수신경절 및 척수의 신경세포손상과 함께 신경세포에서 자극의 전달 및 신경섬유의 재생에 관련된 인자와 신경교세포 관련인자들의 발현에 많은 영향을 미친다.

신경세포접착분자(neuronal cell adhesion molecule; NCAM)는 신경세포 등에서 세포와 세포간의 접촉을 촉진하는 homophilic ligand로 작용하여 세포와 세포 간에 그리고 세포와 기질 간에 상호작용을 조절하는 세포표면에 존재하는 당단백(glycoprotein)의 일종이다(Fercakva, 2001; Acheson 등, 1991; Barthels 등, 1992; Rutishauser 등, 1988; Chuong과 Edelman, 1984). NCAM은 척추동물 배아의 원시신경 상피세포, 신경세포, 신경교 세포 및 근세포에 존재하는데, 신경-근 연결 및 신경조직의 성숙에 따른 연결형성 및 신경 돌기 성장의 안정화를 반영해서 중추신경계의 발생에 중요한 역할을 담당한다(Bruses 등, 2002; Bofanti 등, 1996; Bofanti 등, 1992). 척수에서 NCAM은 발생과정에서 신경관(neural crest)에서 발생해서 연결형성 및 전구세포(precursor cell)의 신경섬유의 수

초화(myelination)에 직접적으로 관여하며(Oumesmar 등, 1995), 성체의 척수에서는 후각 및 중심관(central canal) 주변의 소수의 신경 세포에서 발현되는데, 주로 제한된 지역에서만 발현되며(Bofanti 등, 1992) 중추신경계의 물리적 손상 시에 태자형 NCAM(embryonic NCAM)의 재발현을 유발한다고 보고하였다(Woldbye 등, 1990). 이러한 발현은 감각 정보의 처리 및 세포이동, 축삭 성장, 신경통로 형성, 연결형성(synaptogenesis)등 신경가소성(neuronal plasticity)에 관여한다고 추측하고 있다(Fercakova, 2001). 또한, 후근 절단 후 척수의 신경세포 및 신경교세포에서 NCAM의 발현의 증가가 보고되었다(Bofanti 등, 1996).

이상과 같이 현재까지 보고된 초음파의 말초신경의 재생신경과 관련된 성장 인자의 부비를 자극하는 효과를 입증하고자 본 연구에서는 흰쥐의 좌골신경 압박 손상을 유도하여 신경섬유 손상 및 재생 과정에 관한 지표로서 신경 세포간의 접촉을 매개하는 대표적 물질인 신경세포 접착분자(NCAM)의 면역조직 화학적 검사를 통해 척수에서의 면역 반응을 관찰하고자 한다.

II. 연구방법

1. 실험대상

체중 250~300gm의 건강한 Sprague-Dawley계 음성 흰쥐를 대상으로 한다. 실험 기간 중 식수와 사료는 무제한 공급하며, 사육실 온도는 22~24℃, 습도는 63±5% 유지하고, 일정한 조도와 광주기 및 암주기는 12시간으로 조절한다. 실험동물 24마리 흰쥐를 대상으로 초음파를 1일, 3일, 1주, 2주를 치료한 군과 초음파를 조사하지 않은 대조군으로 1일, 3일, 7일, 14일이 경과한 후에 비교 관찰한다(각 군당 3, 총 12마리).

2. 실험 방법

1) 실험 전 처치

김현애 외 1인 : 초음파가 흰쥐의 좌골신경 압박손상 후 척수내 Neural Cell Adhesion Molecules의 발현에 미치는 영향

실험동물의 전신 마취를 유도하기 위하여 럽퐁(Rompun, Xylazine hydrochloride, 바이엘코리아)과 염산 케타민(Ketamine HCl, 유한양행)을 1 : 1로 혼합하여 복강내 주사(3ml/kg)하였다. 통증유발에 대한 회피반응의 유무를 통해 마취 여부를 확인한 후 실험동물을 수술대에 고정하고, 좌골신경의 압박 손상 및 초음파 적용을 위하여 오른쪽 대퇴부의 내측과 외측을 삭모하였다.

대조군과 실험군의 좌골신경 압박 손상을 위하여 오른쪽 대퇴 외측부의 피부 1cm 절개하고 주위조직의 손상을 최소화하며 좌골신경을 노출시킨 후, 지혈겸자(hemostatic forceps)를 이용하여 압박 손상을 유발하였다. 각 실험동물에 대하여 동일한 좌골신경 손상모델을 적용하기 위하여 지혈겸자의 끝에서 5mm 내측에 표식을 하여 동일한 압력이 가해지도록 하였다. 지혈 겸자를 이용한 압박은 30초 동안 연속적으로 적용하였다. 수술부위를 봉합한 후에는 감염을 방지하기 위한 피부 소독을 실시하였고, 초음파 적용까지 표준 케이스(290×430×180mm)에 1마리씩 투입하여 사육실에서 안정시켰다.

2) 초음파의 적용

실험군에 손상후 1일부터 초음파(sonotens 501, DAEYANG MEDICAL CO. LTD)를 대퇴 내측부에 적용하였다. 치료 전 체중을 측정하고 1MHz 단속파장20%, 0.5W/cm²강도로 매일 5분씩 적용하였다. 음파 적용 부위에는 초음파용 전도겔(Soung Heong Co.)을 사용하여 초음파가 심부 조직으로 충분히 전달될 수 있도록 하였고, 2 cm/s의 속도로 도자를 이동시켜 심부열의 국소 집중을 예방하였다. 대조군은 직접적 초음파 조사는 하지 않았다.

3) 조직절편 제작

실험군의 조직은 초음파 조사 후 심장관류(0.9% NaCl)와 전고정(4% paraformaldehyde, pH 7.4)을 실시하여 관류 고정한 후 요수의 하부(L4 - L6)를 적출한다. 동일한 고정액에서 1일간 후고정(4% paraformaldehyde)한 후 탈수(dehydration),

청명(cleaning) 등의 일반적 제작 과정에 따라 실시하고, 조직 절편을 미세절단기(microtome, BRIGHT 5040)를 사용해서 두께 25 μ m로 냉동절단하였다. 냉동 절단된 조직은 슬라이드를 제작해서, 40 $^{\circ}$ C의 건조기(C-SLS, Chang Shin Scientific Co. Korea)에서 하루 동안 건조시킨 후 면역조직화학법(Immunohistochemistry)을 시행한다.

4) 면역조직화학 염색

실험군의 좌골신경 압박 손상시 NCAM의 면역반응을 보기 위해, 파라핀에 포매된 적출된 조직편에서 25 μ m 두께의 절편을 만들어 탈파라핀과 함수과정을 거친 후, 3% 과산화수소수에 10분간 침수시켜 내인성 과산화 효소(endogenous perociases)활성을 억제시키고 증류수와 0.01M PB(phosphate buffer)로 10분씩 각각 수세 후 1차, 2차 항체에 의한 비특이적 결합을 억제하기 위해 protein blocking agent에 20분간 작용시키고 남은 용액제거 후 면역조직화학염색에 사용된 1차 항체는 배자형과 성체형의 NCAM에 모두 반응하는 rabbit anti-NCAM(chemicon co.)을 0.2% triton X-100, 3% bovine serum albumin 및 3% normal goat serum이 포함된 PB에 1:500으로 희석하여 실온에서 24시간 반응시킨 후 0.01M PB에 10분 3회 수세한다. 다시 2차항체(biotinylated anti-rabbit IgG)를 1:200으로 희석하여 실온에서 90분간 반응한 다음 0.01M PB로 10분간 3회에 걸쳐 수세 후 실온에서 60분간 ABC(avidine-biotin peroxidase complex)를 처리한다.

0.01M PB로 다시 10분 3회 수세 후 여과된 DAB(3, 3'-diaminodenzine tetrahydrochlorid, Sigma)에 반응시킨다. DAB 반응 후 발색된 절편을 0.01M PB에 각 10분씩 3회, 증류수에 10분씩 3회 수세이후 Cresyl. biolet Acetate를 이용 3분간 대조염색(counter staining)을 실시하며 흐르는 물에 5분간 수세하고 탈수와 청명과정을 거쳐 커버슬라이드로 봉입하였다.

5) 결과처리

육안적 관찰은 광학 현미경(OLYMPUS BX50)을

사용하여 NCAM 발현이 색소 침착으로 나타나면 양성(+), 염색반응을 보이지 않으면 음성(-)으로 구분하였으며 면역 양성 반응 시 갈색으로 나타난다. 발현된 세포수의 비교는 Image-Pro Plus Win 4.0β프로그램을 사용하여 단위면적(100배율:1.19mm²)당 반응을 나타낸 세포의 수를 측정하였다. 통계 처리는 SPSS Win 10.0을 이용하여 실시하였으면 각 집단내의 1일, 3일, 7일 14일군의 분석은 일원배치분산분석을 실시하였으며 각 그룹간의 차이를 검증하기 위하여 LSD를 이용하여 사후분석을 실시하였다. 집단 간의 차이의 검정은 독립표본 t-test를 사용하였다. 본 연구의 통계학적인 유의수준은 0.05로 하였다.

III. 결 과

1. 광학현미경상 형태학적 관찰

좌골신경 압박 손상 유발 흰쥐에서 초음파 치료를 시행한 후 신경의 재생과정이 발생하는 쥐의 관찰을 위해 크레실-바이올렛 염색을 실시한 후 실험 1일군, 3일군, 7일군, 14일군과 대조군들 간에 일반적인 특징들에 대해 살펴보기 위해 광학현미경상에 육안적 관찰을 실시하였다.

1) 좌골신경 압박 손상 1일 경과 후의 각 군 별 NCAM 발현 양상의 비교

(1) 정상측(no-crushed part)

좌골신경 압박 손상 1일 후 초음파를 시행한 실험군과 직접적인 초음파조사를 하지 않은 대조군의 척수의 정상측에서는 육안상으로 유의할 만한 차이를 보이지 않았으며 백질에 일부에서 거의 미약한 양성반응(±)혹은 음성반응(-)을 보였으나 후각의 lamina I, III와 전각의 일부분에 NCAM의 약한 양성반응(+)을 보였다(Table 1).

(2) 손상측(crushed part)

정상측과 유의할 만한 차이는 없었으며 백질의 lat. funiculus에 약한 양성반응(+)을 보였으며 신

경 세포돌기에서 발현을 보였다. 후각의 lamina I, III에 약한 양성반응을 보였고 척수 전각부에서는 작은 운동 신경세포에서 그리고 성상교 세포로 추정되는 세포의 돌기에서 약한 양성반응을 보였다(Table 1).

2) 좌골신경 압박 손상 3일 경과 후의 각 군 별 NCAM의 발현양상의 비교

(1) 정상측(no-crushed part)

실험 3일군에서는 정상측 요수의 NCAM의 면역 반응은 백질과 회백질 모두에서 강하게 발현되었는데, 정상측 백질(white matter)의 배외측(dorsolateral funiculus)에서 강한 면역반응(+++)을 보였고 복내측(ventromedial funiculus)과 복외측(ventrolateral funiculus)에서는 양등도의 양성반응(++)을 보였으며 백질 전체에 작고 둥근 갈색의 NCAM의 발현을 볼 수 있었다.

회백질(gray matter)에서는 후각의 배측 말단과 Rexed lamina I의 내측, 외측의 성상교 세포와 그 주변에서 산재되어 강하게(+++) 발현되었다. III, IV에서는 약하게 발현되었다(+). 또한 lamina VII의 중간 외측핵 부분에 다발적으로 강하게(+++) 발현되었고, lamina VIII, IX의 GSE 신경세포에서 전체적으로 강하게(+++) 발현되었다.

3일 대조군의 정상측 요수에서는 3일 대조군의 손상측과 유사한 발현을 보였는데, 전체 백질에서 더 많은 발현을 보였고 lat. funiculus에서 중등도의 양성반응(++)을 보였다. 회백질에서는 전체적으로 약하고(+) 산재된 면역반응을 보였다(Table 1).

(2) 손상측(crushed part)

실험 3일군의 손상측 척수의 NCAM의 면역 반응은 회백질, 백질 모두에서 매우 강하게(++++) 발현 되었으며 백질에서는 배외측(dorsolateral funiculus), 복내측(ventromedial funiculus), 복외측(ventrolateral funiculus)에서 매우 강한 면역 반응(++++)을 보였으며 중간 정도의 크기의 둥근 갈색 형태의 NCAM의 발현을 전체 백질에서 볼 수 있었다.

김현애 외 1인 : 초음파가 흰쥐의 좌골신경 압박손상 후 척수내 Neural Cell Adhesion Molecules의 발현에 미치는 영향

또한 배내측(dorsomedial funiculus)의 gracilis 부분에서 중등도의 면역반응(++)을 볼 수 있었다. 특히 회백질에서는 후각 lamina I, II, III 전체 구역에서 그리고 전각의 lamina VII과 전체 전각의 세포체와 성상교 세포 그리고 성상교 세포 주변에서 크고 뚜렷한 둥근 갈색 형태의 매우 강한(++++) 발현 양상을 보였으며 소수의 성상교 세포를 관찰할 수 있었다.

전체적으로 후각보다는 전각 부분에서 뚜렷이 증가된 현상을 육안상으로 구별할 수 있었다. 3일 대조군의 손상측 척수의 NCAM의 면역 반응은 실험 3일군과 유사한 발현 정도를 보였는데, 회백질과 백질 전체에 발현되었고 백질의 배외측(dorsolateral funiculus)에서는 중등도의 발현(++)을, 복외측(ventrolateral funiculus)에서는 집중적인 강한 발현(+++)을 볼 수 있었다.

회백질에서는 실험군과 비교하였을 때 후각에 lamina I과 나머지 부분에서 산발적인 중등도(++)의 발현을 보였고 후각부분보다는 전각부분의 lamina IX의 전체지역 그리고 lamina VII 부분에서 중등도(++)의 발현양상을 보였고, 백질 부분에 더 많은 발현을 보여준다(Table 1).

3) 좌골신경 압박 손상 7일 경과 후의 각 군별 NCAM의 발현양상의 비교

(1) 정상측(no-crushed part)

실험 7일군의 정상측 척수의 NCAM의 발현 양상은 백질에서 약한 면역 반응(+)을 보였으며 회백질에서는 후각 lamina I의 내측 및 II의 외측 부위의 신경세포와 성상교 세포의 돌기로 추정되는 소수의 세포돌기와 전각에 중심관 주변의 X area와 lamina VII, IX에 산재되어 약한 면역 반응(+)을 보였는데 굵은 신경섬유와 중심관 주변에서 발현 양상을 보인다는 것이 특징적이다.

(2) 손상측(crushed part)

실험 7일군에서 손상측 척수의 NCAM의 발현 양상은 백질에서는 정상측과 유사한 중등도의 면역반응(++)을 보였으며 회백질에서는 lamina I, II, III, IV, V의 전체 후각부위에서 산재된 면역

반응을 보였다.

대부분 성상교 세포에서 반응했고 후각의 내측의 신경세포들에서 중등도(++)의 면역 반응을 보였으며 정상측에 비해서는 현저히 증가된 양상을 보였다. 특히 lamina VIII과 IX의 큰신경세포들과 성상교 세포의 돌기에서 관찰되었다.

7일 대조군에서는 정상측과 유사한 반응을 보였으며 lamina I, III에 약하게(+) 반응하였고 전각부분에서도 전체 영역에서 약하게(+) 나타났으며 백질의 발현에 감소를 보였다(Table 1).

4) 좌골신경 압박 손상 14일 경과 후의 각 군별 NCAM의 발현양상의 비교

(1) 정상측(no-crushed part)

14일 실험군과 14일 경과군의 NCAM 발현 양상을 관찰하였을 때, 두군 모두에서 거의 미약한 반응(±)을 보이거나 음성반응(-)을 보였으며, 후각의 lamina III의 내측과 전각의 큰신경 세포에서 그리고 성상교 세포의 소수돌기에서 발현되었다(Table 1).

(2) 손상측(crushed part)

정상측과 동일한 양상을 보이지만 뚜렷하게 성상교 세포를 관찰할 수 있었고, 후각보다 전각에서 더 많이 발현되었고, 백질에 미약하거나(±) 약한 양성 반응(+)을 더 볼 수 있었다(Table 1).

Table 1. The expression of NCAM after ultrasound irradiation in rat crushed injury sciatic nerve

	Experimental Group		Control Group	
	NCP	CP	NCP	CP
1 day	+, ±	+	±, -	±, +
3 day	+++	++++	++ , +	+++
7 day	+	++	+	+
14 day	±, -	+, ±	±	±, -

Control : sham sonication group

Experimental Group : ultrasound irradiation group

NCP : No-Crushed Part

CP : Crushed Part

2. 각 군의 기간에 따른 NCAM의 발현 변화

초음파 조사 후 1일, 3일, 7일, 14일이 경과한 시점에서 각 그룹별 NCAM의 면역 양성반응을 보이는 세포의 수를 세어 Figure 1에 기록하였다.

각 집단내의 실험 기간별 발현된 세포수의 유의성을 검정해본 결과를 요약하면 EC군에서는 3일군과 1, 7, 14일군 간에는 모두 유의한 변화를 보였고($p < 0.05$)(Figure 2), ENC 군 역시 3일군에서 모든 군 간에 유의한 변화를 보였다($p < 0.05$)(Figure 3). CC군에서는 1일군과 14일군 간에 유의성을 발견할 수 없었고 나머지는 모두 유의하게 나타났다($p < 0.05$)(Figure 4). CNC군에서도 3일군에서 모든 군 간에 유의성이 있게 나타났다($p < 0.05$)(Figure 5).

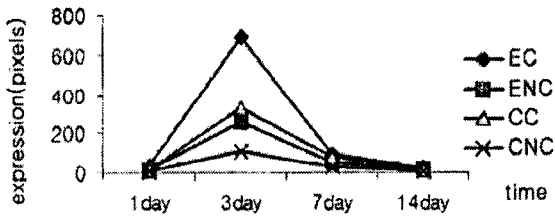


Figure 1. The time course of NCAM expression.

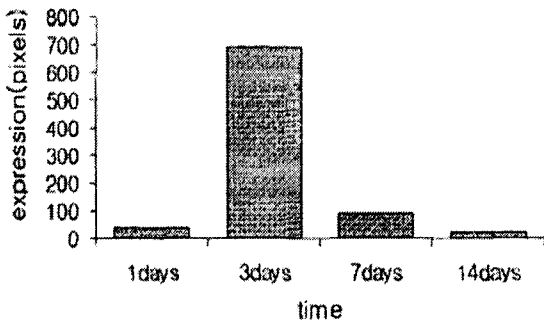


Figure 2. One-way ANOVA of NCAM immunoreactivity of spinal cord at EC part.

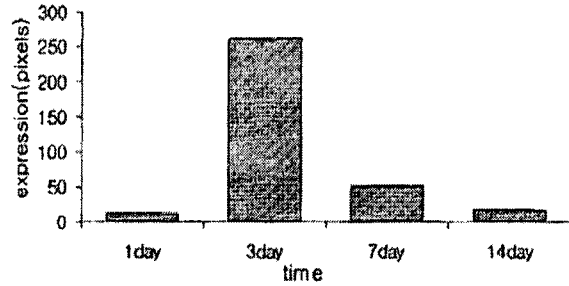


Figure 3. One-way ANOVA of NCAM immunoreactivity of spinal cord at ENC part.

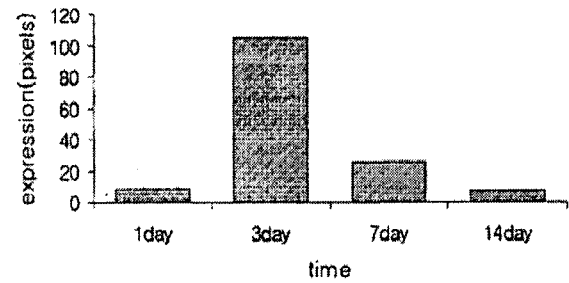


Figure 4. One-way ANOVA of NCAM immunoreactivity of spinal cord at CC part.

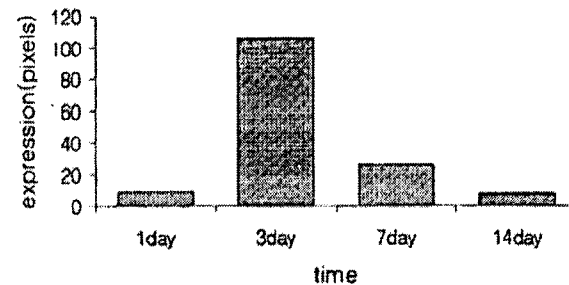


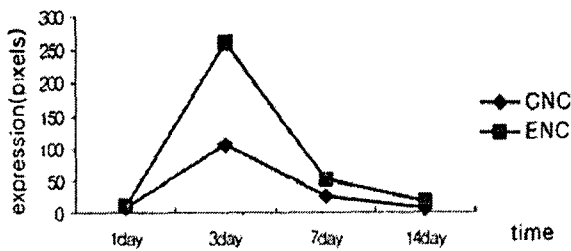
Figure 5. One-way ANOVA of NCAM immunoreactivity of spinal cord at CNC part.

김현애 외 1인 : 초음파가 흰쥐의 좌골신경 압좌손상 후 척수내 Neural Cell Adhesion Molecules의 발현에 미치는 영향

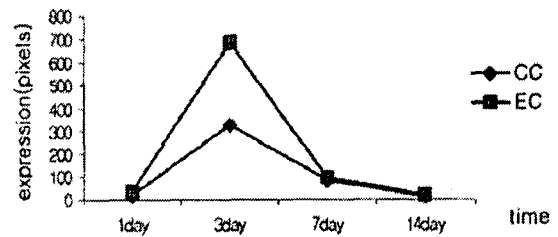
3. 손상 유무에 따른 두 그룹간의 비교

손상 유무에 따라 나눈 부위에 있어 시간별 NCAM의 발현양상을 알아보기 위해 독립표본 t-test를 실시하였다. 먼저 CNC와 ENC 그룹간의 유의성을 검증해 보면, 1일군을 제외한 모든 군에서 유의한 차이를 보였는데, CNC 1일군과 ENC 1일군 사이에는 통계학적으로 유의한 차이가 없었으며($p>0.05$), CNC 3일군과 ENC 3일군 사이에는 ENC 3에서 통계적으로 유의한 증가를 보였다($p<0.05$). 또한 CNC 7일군과 ENC 7일군 사이에도 통계학적으로 유의한 차이를 보였으며($p<0.05$), CNC 14일군과 ENC 14일군 사이에도 유의성을 보였다($p<0.05$)(Figure 6-1).

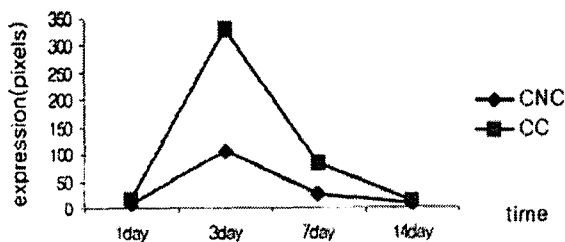
CC군과 EC군간의 유의성을 검증해본 결과, 3일군에만 유의한 차이를 보였는데, CC1일군과 EC 1일군 사이에는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았고($p>0.05$) CC 3일군과 EC3일군 사이에는 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($p<0.05$)(Figure 6-2). CC 7일군과 EC 7일군 그리고 CC 14일군과 EC 14일군 사이에는 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($p>0.05$). 또한 실험군, 대조군 간에 손상 부위별 NCAM의 발현양상을 비교해본 결과 CNC와 CC의 모든 시간에서 유의한 차이가 나타났다($p<0.05$)(Figure 6-3). 그리고 ENC와 EC에서는 3일군과 7일군에서만 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($p<0.05$)(Figure 6-4).



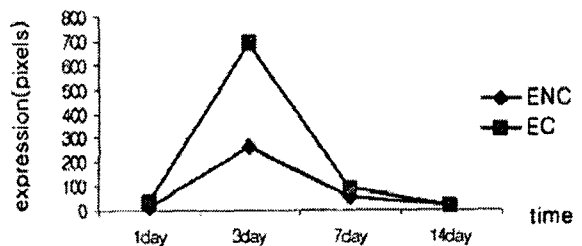
1) CNC and ENC groups



2) CC and EC groups



3) CNC and CC groups



4) ENC and EC groups

Figure 6. The comparison with NCAM expression between groups. (*: $p<0.05$)

IV. 고찰

손상 후 신경재생을 평가하기 위한 기능적, 전

기 생리학적, 병리학적 실험에서 가장 널리 사용되는 방법은 좌골신경 압좌인데(Yuko 등, 2001), 신경의 압좌 손상은 지혈 결자를 이용하였을 때 일관성이 높은 것으로 알려져 있으며(Koning 등,

1986) 이 때 신경손상의 정도는 신경 내막관(endoneurial tube)의 연속성은 유지되고 내부의 축삭이 손상되는 축삭절단이 발생하여 신경손상 부위로부터 왈러 변성이 원위부로 진행된다. 이러한 변성과정은 초기에 신경교세포의 수초 형성부의 일부분에 파괴를 가져오며 축삭의 원위부의 괴사를 유발시켜서 손상된 신경섬유의 경로에 따라 상부신경 세포의 손상을 발생시키는데 손상 후 3~4일 정도 경과 시에는 신경 흥분성은 소실되고 약 2주일이 지나면 신경재생과정을 통해 근육의 신경재 지배가 나타나 호전되는 양상을 보인다. 이러한 손상은 척수신경절의 중추 및 말초돌기와 척수의 후각을 포함하는 감각신경계에 대한 영향과 운동신경세포의 축삭절단에 의한 전각의 운동신경세포에 미치는 운동신경계의 영향으로 대별될 수 있다.

말초신경이 손상되면 척수의 후각신경세포에서는 척수 신경절을 경유하는 경연접손상이 초래되며 척수의 전각신경세포에서는 α -운동신경세포의 직접적인 손상으로 세포 소실을 야기시킨다. 좌골신경의 절찰 시 흰쥐 척수 후각에서 2주후부터 lamina I~III의 신경세포의 변성을 보고하였다(Hama 등, 1994). Arvidson 등(1986)은 좌골신경절단을 유도시킨 흰쥐의 절단측에서 척수 신경절의 15~30%의 세포소실을 보고하였는데 특히, 절단측 요수 2~6번 내측 및 lamina I~IV의 강한 면역화학변화를 관찰 하였다.

이처럼 많은 연구에서는 말초신경손상 이후 단기간 내에 척수의 후각의 심한 변화가 발생되며 전각의 경우는 지연된 손상이나 경미한 변화가 일어난다고 보고하였다(전복관, 1997) 이러한 손상은 감각의 전도 및 운동 신호의 전도를 담당하는 물질의 변화를 유발하여 발현의 증가나 감소를 가져오는데 Kajender와 Xu(1995)는 좌골신경절단 혹은 만성 절찰 손상 시 동측 척수의 CGRP(calcitonin gene related peptide) 및 substance P의 양의 감소를 보고하였다. Hama 등(1994)은 척수 신경손상 시 NMDA의 흥분성독성 및 비정상적 감각 발생으로 척수내 장기적 손상이 야기될 것이라고 주장하였으며 NMDA 수용체 발현의

차단을 위해 부신수질의 이식을 주장하였다.

또한 말초 신경 손상 시에는 신경의 접촉에 관여하는 분자나 신경 영양성 인자들의 발현을 유발시키는데, 신경접착인자로는 NCAM(neuronal cell adhesion molecules)나 N-cardherin 등이 대표적인 물질이고 신경영양성인자(neurotrophin)로는 BDNF(brain-derived neurotrophin factor), NGF(nerve growth factor), NT-3(neurotrophin-3), NT4/5(neurotrophin 4/5) 등이 있다.

신경조직의 재생과 성장에 관여하는 neurotrophin은 tryosine kinase(trk) 수용체에 특징적으로 결합하는데(Barbacid 등, 1991), trk A는 NGF와 특이성을 가지고, trk B는 BDNF 및 neurotrophin 4/5과 특이적으로 결합하며, trk C는 neurotrophin 3과 결합한다고 알려져 있다. 이와 같이 말초신경 손상 시 신경세포의 손상이외에도 발초에서는 슈만세포의 증가가 척수 내에서는 미교 세포와 성상교세포의 현저한 증식이 발생하게 되는, 신경교세포의 일종으로 희돌기 아교세포(oligodendrocyte)와 함께 거대교세포에 속하는 성상교 세포는 과거에는 단순한 신경계의 지지기능만이 강조되었는데, 최근에는 glutamin등의 신경전달 및 대사과정과 관련된 교유기능들이 다양하게 연구되면서 신경계에 있어 역할의 중요성이 부가되고 있다.

성상교 세포는 중추신경계통의 지지역할, 신경전달물질의 대사, 신경세포의 영양인자 제공, 발생과정에서 신경세포의 이동 경로를 제공하고 신경 돌기의 손상 복구 및 재생에 관여한다(Malhort 등, 1990). 성상교 세포의 대표적인 표지 모델은 GABA 및 glutamate의 조절에 직접적으로 관여하는 glutamate synthetase와 성상교 세포돌기의 구성성분이 GFAP(glial fibrillary acidic protein)이다.

신경세포의 괴사를 초래하는 손상에서는 성상교세포의 증식 및 비대가 일어나며 세포내 중간섬유가 증가하는 반응성 성상교세포증(reactive astrocytosis)이 유발되는데 성상교세포의 기원에 대해서, 성상교세포는 일부 분열하는 기능을 가지고 있는 I형 성상교세포로서 손상 시 세포분열과정을 통해 반응성 성상교세포가 되며, Takamiya 등(1988)과 O'Callaghan(1991)은 신경

김현애 외 1인 : 초음파가 흰쥐의 좌골신경 압박손상 후 척수내 Neural Cell Adhesion Molecules의 발현에 미치는 영향

교중에서 정상 교세포의 분열은 없고 정상 시 GFAP에 면역활성을 나타내지 않는 세포의 수가 증가되면서 세포의 비대화로 발생된다고 보고 하였다. Fedoroff 등(1984)은 반응성 정상교세포증에서 나타나는 정상교 세포들은 정상 아교세포에서 분화 된다고 하였다.

그리고 Goldberg와 Bernstein(1987)등은 주변의 정상조직내의 신경교 세포가 이주해 나가는 과정이지 새로운 발현을 의미하는 것은 아니라고 주장하였다.

또한 Cova등(1988)은 상완신경총 절단 시 척수에서 미교세포의 증식이 유발되는데, 초기에는 후각에서 후기에는 전각에서 더 심하고 지속적인 증가가 나타난다고 보고 하였다. 이처럼 이러한 반응성 정상교 세포증은 신호의 전도 및 세포-세포간의 상호성, 그리고 세포의 이동 및 접착 등의 신경가소성에 관여하는 대표적인 물질인 신경세포 접착분자 (NCAM)의 재발현을 촉진시키는데, 위의 다양한 과정들은 신경계의 발달 과정을 촉진시키며, 손상 후 신경 재생 및 기능회복에 필요한 구조적이고 기능적인 신경통신망을 형성 시킨다.

세포와 세포간의 선택적인 접착은 신경조직을 비롯한 다세포 구조의 형성에 있어 가장 필수적인 과정이며, 원형질막의 화학적 성상은 이러한 세포간의 적절한 응집 및 접착에 있어 가장 중요한 요인으로 작용한다. 접착에 관여하는 분자는 4개의 glycoprotein family를 소유하는데 세포 표면 단백질의 35%를 차지하고 서로 다른 항원 인식을 증가시켜 접착을 강화시키는 immunoglobulin superfamily, 칼슘 의존적 세포막 단백질로서 세포간의 강한 물리적 bond를 형성하고 세포의 이동을 조절하는 cadherin family, 세포간 그리고 세포와 cillagen 같은 세포외기질 단백질간의 부착을 수행하고 세포에 활동성을 조절하는 integrin family, 마지막으로 lymphocyte와 endothelialiumdml 이동을 조절하는 selectin family로 나누어진다.

신경조직에서 세포간의 접착을 매개하는 세포 접착 분자(cell adhesion molecular, CAM)는 신경계 발생과정 중 많은 지역에서 모든 시기에 발현

되는 general CAM과 한정적인 시기에 제한적 지역에서 발현되는 restricted CAM으로 구분된다. General CAM은 Ca⁺⁺의존적으로 세포접착을 매개하는 N-cadherin과 calcium에 비의존적인 NCAM이 있으며, 대표적인 restricted CAM에는 축삭의 섬유 속 형성에 기여하는 Ax-CAM(Axon-associated structure)를 인식하는 과정을 필요로 하는 Sac-CAM(sacchride-CAM)이 알려져 있다. (Rutishauser와 Jessel, 1988).

NCAM의 존재와 기능은 1976년에 처음으로 소개되었으며, 그 이래로 화학적 성상이 점차 규명되면서 homophilic ligand이며, Ig superfamily에 속하는 대표적인 분자로 정의 되었다(Van Vactor, 1998; Rutishauser et al., 1976). NCAM의 세포외적 부분은 5개의 Ig modules와 2개의 fibronectine type III homology region으로 구성 구성되어 있다. (Edelman, 1986). Integral membrane glycoprotein의 일종인 NCAM은 26 exons로 구성된 구성 단백질 및 탄수화물 구조에 많은 다양성을 지닌 단일 도리 펩타이드(single chain polypeptide)로 이루어져 있으며 화학적 구성에 있어 가장 특이한 점은 내부에 다량의 sialic acid로 구성되어 성체의 신경계에 존재하며 대부분의 NCAM을 차지하는 L-type으로 나누어진다.

한편, NCAM은 구성하고 있는 분자의 무게에 따라서 대조적으로 180kD, 140kD, 120kD로 나누어지며, NCAM-180은 세포체의 수상돌기의 연결소극(synaptic spine)에 위치하는 세포골격 단백질이다. 신경계의 발생과정에서 NCAM은 신경판에서 최초로 발현되며(Balak et al., 1987) 신경세포와 신경교세포에서는 지속적으로 발현되고 근세포의 발생과정에서도 발현되어서 근육의 지배 및 synaptogenesis에 관여한다고 알려져 있다(Covault와 Sanes, 1986; Charlton 등, 2000).

NCAM은 발생과정에서는 접착력이 약한 H-type과 접착력이 강한 L-type 두 가지 모두가 발현되나 성숙 이후에 성체에서는 L-type이 발현되며 이러한 발현의 변화

+가 신경조직의 성숙에 따른 연결형성 및 신경돌기 성장의 안정 상태를 반영한다고 할 수 있

다.

발생과정에서 NCAM은 radial glia의 등 plate와 관련해서 축삭을 인도하고 성장시키며, 운동신경 세포의 축삭 형성에 관여하여 축삭의 근속에서 접착 및 신호화에 관여한다(Van Vactor, 1998). 또한 골격근의 지배과정에 관여하고 발생초기의 junctional communication을 형성하며 NCAM의 type의 조절을 통해 세포간의 저장 및 세포이동에 관여한다.

대부분의 동물의 경우 출생 후에는 신경세포의 분열이 일어나지 않지만 흰쥐, mouse, 토끼, 고양이는 생후에도 치상회에서 과립분열이 일어나는데, 특히 흰쥐의 치상회의 경우에는 11개월까지 지속적인 세포분열이 일어난다고 하였다. 슈반세포의 종양이나 축삭의 만성적인 신경병증일 경우 NCAM의 발현이 증가되는데, Bonfanti 등(1992)은 성체에서 시상하부, 시상의 일부 핵 및 측뇌실에서, 척수의 백질의 신경세포에서 발현되고 척수의 후각의 표층, 치상회의 복측부, 외측슬상체, 고배핵, 중뇌 중심의 흑색질, 후구의 세포사이에서 접상의 면역반응이 나타난다고 하였으며 이상피질, 치상회의 배측부위, 척수의 lamina X에서는 신경세포의 세포체 및 세포돌기에서 면역반응을 보이며 척수의 백질에서는 신경교 세포에서 면역반응이 나타난다고 하였다. Woldbye 등(1996)은 강한 흥분성독성을 지녔으며 glutamate의 신경전달과정에 작용하여 신경세포의 지속적인 탈분극을 유도해서 수상돌기와 세포체의 변성 및 에너지 고갈을 유발시키는 kainic acid에 의한 편도핵 및 후구의 kindling등의 중추신경계통 손상에 의해 NCAM의 재발현이 촉진된다고 하였다. 또한 Jucker 등 (1995)은 일시적인 허혈 손상 후 신경세포의 손상이 유발되는 CA1의 영역에서 NCAM의 면역 반응이 2~4일간 증가하였으며 NCAM 180-specific probe는 해마의 신경세포에서, NCAM 120/140-specific probe는 성상교세포에서 발현이 증가된다고 하였다.

좌골 신경손상과 관련한 NCAM의 면역 반응에 대해서는 Daniloff등(1993)은 좌골신경절단에 의해 신경지배가 소실된 근세포의 세포막과 세포질에

서 일시적으로 NCAM의 양이 증가하였으며 절단된 신경섬유에서 그리고 슈반세포와 신경다발막에서 NCAM의 발현 증가를 보고하였고, Tacke와 Martini(1990)는 말초신경이 절단된 신경섬유에서 슈반세포의 증가와 병행하여 NCAM은 신경교 세포에 의해 재발현되며, 중추신경계에서는 특히 반응성 성상교증에 의해서, 말초신경에서는 슈반세포의 이동과정에서 촉진된다고 보고하였고 중추신경계에서 성상교 세포의 감소를 가져온다고 보고 하였다. 또한 Bonfanti 등(1996)은 후근 절단 후 24시간 경과 시 척수 lamina III과 IV에 위치한 신경세포에서 증가하여 4일경에 최고로 증가하며 8일경에는 사라진다고 보고하였으며 성상교 세포의 경우는 12일 경에 최대한 증가되고 그 이후는 감소한다고 보고하였다.

실험의 손상초기에서는 척수 후각 lamina I, II, III, IV의 내·외측부위와 세포체에서 NCAM의 발현 변화가 증가되었으며 척수 전각에서는 거의 전 영역에서 다양하게 발현 되었는데, 특히 3일 실험군의 경우에는 하지의 섬유들이 올라가는 gracilis 쪽의 백질에서 발현을 보였고 전체 funiculus 영역에서 크고 강한 갈색 점상의 발현을 보였다. 또한, 시간의 경과에 따라 척수의 전각에 큰 신경 섬유들의 신경세포에서 그리고 성상교 세포의 돌기에 강한 면역반응을 보였다. 본 실험 결과 초음파를 조사한 실험군과 대조군 사이에서는 유의한 발현 차이를 보였으며 3일경 최대로 증가하였다가 감소하면서 7일경부터 크게 감소하는 형태를 보인다. 모든 실험군 간의 비교에서 실험군과 대조군은 크게 유의한 차이를 보였는데, 실험군과 대조군의 동일 군에서의 정상 측과 손상 측에 대한 NCAM의 발현양상은 손상 측에서 유의한 증가를 보였으며, 특히 3일군에서 큰 발현의 증가가 있었다.

이는 실험군 뿐 아니라 대조군에서도 동일하게 나타났는데, 말초 신경 손상에 따른 축삭의 재생과정에서도 NCAM의 발현이 유도된 것이라 생각하며 초음파 치료군의 손상측과 대조군의 손상측의 비교 시 치료군에서 큰 발현의 증가를 보여 주며 정상 측 역시 대조군의 정상측보다 유의한

김현애 외 1인 : 초음파가 흰쥐의 좌골신경 압박손상 후 척수내 Neural Cell Adhesion Molecules의 발현에 미치는 영향

차이를 보이는데 이는 말초신경 손상 후 초음파의 조사가 신경섬유의 재생의 초기 단계에 신경세포간의 접착을 강하게 유도하며 특히 전각세포의 직경이 큰 운동신경섬유의 수초화에 활발한 자극을 준다고 생각되어진다. 본 실험에서는 좌골신경 압박 손상을 유도한 뒤 치료적 저강도 초음파(0.5W/cm²의 강도, 1MHz 단속 초음파, 1분간 적용)를 사용하여 1일, 3일, 7일, 14일 동안 초음파를 조사하였다.

사실상 신경손상과 관련해서 신경의 가소성에 관여할 수 있는 자극들은 오감을 통한 자극, 약물, 전기자극, 운동 등의 환경적 요소와 내부에서 발생하는 모든 자극들이 포함되는데, 대개 임상에서 신경손상 후 사용 할 수 있는 치료방법은 신경손상이 심하거나 절단된 환자의 경우에는 수술을 통해 연속성을 유지시켜 주고(Dumitru, 1996), 신경손상이 심하지 않은 축삭절단의 경우처럼 신경관의 연소성이 유지되어 있는 경우에는 자연적인 시간 경과에 따른 호전을 기대하거나, 전기자극 치료, 관절운동범위를 유지하기 위한 운동들이 치료에 이용되고 있으나 현재까지 신경 및 근육의 회복을 촉진시키기 위한 실제적인 방법은 없는 상태이다(편성범 등, 1999). 전기자극이 신경계에 미치는 기전에 대해서 정확하게 밝혀진 바는 없지만, 다양한 전기 생리학적 연구를 통해 다음과 같이 추정하고 있다. 첫째, 신경종 형성 부위의 반흔형성이 감소되어짐으로서(Ito 등, 1983), 둘째, 전기자극으로 인한 통증 감소로 조기이동이 가능해짐으로서, 셋째, 축삭의 세포체나 슈반세포의 직접적 자극으로 축삭의 연장 및 슈반세포의 재수초화 과정을 야기 시킴으로서, 넷째, 신경전달물질의 분비 증가 및 발현으로 수용체의 변화를 가져옴으로서 다섯째, 효소의 변화를 야기 시킴으로서, 여섯째, 이온통로의 전도도의 변화로 인해서 그 외에도 시냅스에서 소포의 증가, 신경 시냅스 면적의 증가, 신경 시냅스 면적의 증가, 신경 활성화도 증가 등 다양한 기전이 제시되고 있다.

Evsemeka(1989)는 아킬레스 건 손상시 초음파가 치유과정 초기에 조사되면 건조직의 수복과정에

서 치유를 촉진시킬 수 있다고 보고하였다. Mortimer와 Dyson(1988)은 20%의 단속 파장 초음파를 0.5~0.75 W/cm²의 강도로 치료하였을 때 급속한 조직 치유의 가속화를 야기 시킨다고 제시하였다. 신경조직에 있어 초음파의 효과에 대한 Szumski 등(1960)의 연구에서는 초음파가 말초신경을 선택적으로 따뜻하게 하고, 흥분(impulse)전도의 변화를 주거나 차단시키고, 막투과성 및 조직대사를 증가시킨다고 하였으며 이를 통해 통증의 완화를 가져온다고 보고하였다. 또한 말초신경 손상 후 초음파의 재생 효과와 관련해서 Crisci(2002)는 저강도의 맥동초음파가 신경절단 이후에 신경의 빠른 회복을 촉진한다고 보고하였는데, 이는 초음파가 슈반 세포를 자극하여 수초의 회복을 촉진시키기 때문이며 특히 직경이 큰 신경섬유(type A)의 회복에 있어서 현저한 효과를 나타냈다고 하였다.

이는 본 논문의 결과와 잘 부합되며 초음파가 신경 손상에 따른 신경의 재생과정에 있어 초음파의 유용성에 대한 긍정적인 결과를 보여준다 하지만 사실상 초음파의 효과와 관련된 각 실험들 간에는 방법 및 시간, 평가 방법에 있어 다양성이 존재하므로 객관적 비교가 어렵고 효과적인 강도 및 시간 관계와 임상적 적용 유무에 대한 논란이 계속되고 있다. 또한 흰쥐에서 신경 손상 후 신경재생의 속도와 회복정도는 인간과 다를 수 있기 때문에 추후에 임상적인 적용에 있어 실제적인 인체 내 다른 조직기관과 신경조직에 미치는 영향에 대한 기전의 연구가 필요할 것이다.

V. 결론

본 실험에서는 실험동물로 흰쥐를 이용하여 일측의 좌골신경의 압박 손상을 유발시킨 후 0.5 W/cm² 강도의 1MHz의 단속파장 초음파를 1분간 1일, 3일, 7일, 14일군으로 나누어 적용한 실험군과 직접적인 초음파 조사를 하지 않은 대조군으로 나누어 구분하고 신경재생과정에서 신경세포의 접착에 관여하는 대표적인 물질인 NCAM을 관찰

하기 위해 면역조직화학법으로 염색한 후 실험군과 대조군을 다시 손상측과 정상측으로 구분하여 관찰함으로써 초음파의 치유 효과 및 신경조직의 재생에 미치는 영향에 대해 척수 조직에서 형태학적으로 분석하여 초음파의 말초신경 재생에 미치는 영향을 관찰해 보았으며 다음과 같은 결과를 얻었다

1. 형태학적 관찰에서 손상 1일 경과후의 실험군과 대조군에서는 후각의 lamina I, III와 전각의 소수 신경 세포에서 약한 면역반응이 관찰되었고, 후각에서 발현이 더 우세하였으며 손상측과 정상측간의 뚜렷한 차이는 발견할 수 없었다.
2. 손상 3일 경과 후 실험군과 대조군에서는 정상측과 손상측의 희백질과 백질 모두에서 매우 강한 면역 반응의 증가를 볼 수 있었으며 대조군과 비교 하였을 때 실험군 손상측에서는 백질의 전 영역과 희백질 후각의 lamina I, II, III 전체 구역에서 그리고 전각의 lamina VII의 중간신경세포와 전체 전각의 신경세포와 성상교 들기에서 강한 갈색의 점상의 면역 반응을 볼 수 있었고 전체적으로 전각에서 더 강한 면역 반응을 볼 수 있었다.
3. 손상 7일 경과군에서는 실험군의 손상측에서 후각과 전각의 전체에 걸친 성상교 세포의 산재된 면역반응이 나타났으며 정상측에 비해 현저히 증가된 양상을 보였다 또한 전각의 lamina VIII과 IX의 큰 운동신경세포에서 면역반응이 관찰되었다.
4. 손상 14일 경과 후에는 두 군에서 뚜렷한 차이는 없었으며 NCAM의 뚜렷한 감소를 볼 수 있었다.
5. 각 군의 치료 기간에 따른 발현 양상을 보면 실험군의 집단에서 EC군, ENC군, CNC군 모두는 3일 경과군에서 1, 7, 14일군과의 유의한 변화를 보였으며($p < 0.05$), CC군에서는 3, 7일군에서 유의성 있게 나타났다($p < 0.05$).
6. 손상 유무에 따른 두 그룹간의 비교에서는 CNC군과 ENC군에서는 3, 7, 14일군에서 통계학적으로 유의한 차이를 보였고($p < 0.05$), CC

군과 EC군의 비교에서는 3일군에서만 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$). 같은 군내에서 CNC군과 CC군에서는 모든 군에서 유의한 차이를 보였고($p < 0.05$), ENC와EC군에서는 3일군에서 유의한 증가를 보였다($p < 0.05$). 이상의 결과를 통해 말초신경 손상 후 저장도 초음파를 조사하여 초음파를 직접적으로 조사하지 않은 대조군과 비교하였을 때 신경 접촉을 유도하는 물질인자의 재발현을 더 촉진시키며 따라서 초음파 조사는 손상초기에 신경 재생 관련인자의 발현에 더 효과적인 영향을 준다고 사료된다.

참고문헌

- 고현운, 김경수. 초음파 적용방법에 따른 조직온도 변화연구. 대한재활의학회. 1993;17:76-80.
- 김영기, 안상호, 장성호 등. 흰쥐의 말초신경 손상 후 전기자극이 신경 재생에 미치는 효과. 대한재활의학학회지. 1999;23(5):893-8.
- 남기원. 초음파가 흰쥐 관절 연골내 열충격단백질70의 발현에 미치는 영향. 대구대학교 재활과학대학원, 석사학위 논문, 2001.
- 이재형. 전기치료학. 대학서림, 1999.
- 전복관. 일측좌골신경의 절단 및 재연결이 흰쥐 척수에서 신경 세포접착분자(NCAM)의 면역반응에 미치는 영향. 한양대학교 대학원, 석사학위논문, 1997.
- 장성호, 안상호. 흰쥐의 대뇌피질 운동영역 활성화를 위한 말초 전기자극의 적정 조건. 대한재활의학학회지. 1998;4(2):191-6.
- 편성범, 권희규, 엄창섭. 백서에서 좌골신경손상 후 운동이 가자미근에 미치는 영향, 대한재활의학회지. 1999;23(6):1063-75.
- Acheson A, Sunshine JL, Rutishauser U. NCAM polysialic acid can regulate both cell-cell and cell-substrate interactions. J Cell Biol. 1991; 11(4):143-53.
- Arvidson J, Ygge J, Granl G. Cell loss in lumbar dorsal root ganglia and transganglionic

김현애 외 1인 : 초음파가 흰쥐의 좌골신경 압박손상 후 척수내 Neural Cell Adhesion Molecules의 발현에 미치는 영향

- degeneration after sciatic nerve resection in the rat. *Brain Res.* 1986;14(373):15-21.
- Barbacid, M, Lamballe F, Pulido D et al. The trk family of tyrosine protein kinase receptors. *Biochim Biophys Acta.* 1991;10(72):115-27.
- Barthels D, Vopper G, Boned A et al. High Degree of NCAM Diversity Generated by Alternative RNA Splicing in Brain and Muscle. *Eur J Neuosoci.* 1992;4(4):327-37.
- Bonfanti L, Merighi A, Theodosis DT. Dorsal rhizotomy induces transient expression of the highly sialylated isoform of the neural cell adhesion molecule in neurons and astrocytes of the adult rat spinal cord. *Neurosciense.* 1996;7(4):619-23.
- Bonfanti L, Olive Poulain DA, Theodosis DT. Mapping of the distribution of polysialylated neural cell adhesion molecule throughout the central nervous system of the adult rat: an immunohistochemical study. *Neurosciense.* 1992;4(9):419-36.
- Charlton CA, Mohler WA, Blau HM. Neural cell adhesion molecule (NCAM) and myoblast fusion. *Developmental Biology.* 2000;2(21):112-9.
- Chuong CM, Edelman GM. Alterations in neural cell adhesion molecules during development of different regions of the nervous system. *Neurosciense.* 1984;3(4):2354-68.
- Cova JL, Aldskoginu H, Arvidsson J. Changes in microglial cell numbers in the spinal cord dorsal horn following brachial plexus transection in the adult rat. *Exp Brain Res.* 1988;7(3):1-68.
- Covault J, Sanes JR. Distribution of N-CAM in synaptic and extrasynaptic portions of developing and adult skeletal muscle. *J Cell Biol.* 1986;102(3):716-30.
- Crisci AR, Ferreira AL. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates the regeneration of the sciatic nerve after neurotomy in rats. *Ultrasound Med Biol.* 2002;28(10):1335-41.
- Daniloff JK, Levi G, Grumet M. Altered expression of neuronal cell adhesion molecules induced by nerve injury and repair. *J Cell Biol.* 1993; 10(3):929-45.
- Draper DO, Castel JC, Castel D. Rate of temperature increase in human muscle during 1 MHz and 3 MHz continuous ultrasound. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1995;22(4):142-50.
- Dumitru D. Single muscle fiber discharges (insertional activity, end-plate potentials, positive sharp waves, and fibrillation potentials): a unifying proposal. *Muscle Nerve.* 1996;19(2):221-6.
- Dyson M, Suckling J. Stimulation of tissue repair by ultrasound: a survey of the mechanisms involved. *Physiotherapy.* 1978;6(4):105-8.
- Evsemeka CS. The effects of therapeutic ultrasound on tendon healing. A biomechanical study. *Am J Phys Med Rehabil.* 1989;6(5):183-7.
- Fedoroff S, McAuley WA, Houle JD et al. Astrocyte cell lineage. V. Similarity of astrocytes that form in the presence of dBcAMP in cultures to reactive astrocytes in vivo. *J Neurosci Res.* 1984;12(1):15-27.
- Fercakova A. Cell adhesion molecules in the neural development and plasticity. *Bratisl Lek Listy.* 2001;102(12):552-5.
- Goldberg WJ, Bernstein JJ. Transplant-derived astrocytes migrate into host lumbar and cervical spinal cord after implantation of E14 fetal cerebral cortex into adult thoracic spinal cord. *J Neurosci Res.* 1987;17:391-403.
- Hama AT, sagen J, pappas GD. Morphological characterization of dorsal horn spinal neurons in rats with unilateral constriction nerve injury: a preliminary study. *Neurol Res.* 1994;16(4): 297-304.
- Hong CZ, Liu HH, Yu J. Ultrasound thermotherapy effect on the recovery of nerve conduction in experimental compression neuropathy. *Arch Phy Med Rehabil.* 1988;69(4):410-4.
- Hu-Tsai M, Woolf C, Winter J. Influence of inflammation or disconnection from peripheral target tissue on the capsaicin sensitivity of rat

- dorsal root ganglion sensory neurones. *Neurosci Lett.* 1996;203(2):119-22.
- Ito M, Azuma Y, Ohta T et al. Effects of ultrasound and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on growth factor secretion in co-cultures of osteoblasts and endothelial cells. *Ultrasound in Med.* 2000; 26(1):161-6.
- Jucker M, Mondadori C, Mohajeri H et al. Transient upregulation of NCAM mRNA in astrocytes in response to entorhinal cortex lesions and ischemia. *Brain Res.* 1995;28(1):149-56.
- Kajander KC, Xu J. Quantitative evaluation of calcitonin gene-related peptide and substance P levels in rat spinal cord following peripheral nerve injury. *Neurosci Lett.* 1995;18(6):184-8.
- Koning DP, Brakkee JH, Gispen WH. Methods for producing a reproducible crush in the sciatic and tibial nerve of the rat and rapid and precise testing of return of sensory function. Beneficial effects of melanocortins. *J Neurol Sci.* 1986;7(4):237-46.
- Malhotra SK, Shnitka TK, Elbrink J. Reactive astrocytes-a review. *Cytobios.* 1990;6(1):133-6.
- Nakamura Y, Shimizu H, Nishijima C et al. Delayed functional recovery by vincristine after sciatic nerve crush injury: a mouse model of vincristine neurotoxicity. *Neurosci Lett.* 2001; 304(1-2):5-8.
- Montimer AJ, Dyson M. The effect of therapeutic ultrasound on calcium uptake in fibroblasts. *Ultrasound Med Biol.* 1988;14(6):499-506.
- O'Callaghan JP. Assessment of neurotoxicity: use of glial fibrillary acidic protein as a biomarker. *Biomed Environ Sci.* 1991;4(1-2):197-206.
- Oumesmar BN, Vignais L, Duhamel CE et al. Expression of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule during postnatal myelination and following chemically induced demyelination of the adult mouse spinal cord. *Eur J Neurosci.* 1995;7(3):480-91.
- Rutishauser U, Acheson A, Hall AK. The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions. *Science.* 1988;2(40):53-7.
- Rutishauser U, Jessel TM. Cell adhesion molecules in vertebrate neural development. *Physiol Rev.* 1988;6(8):891-57.
- Schreyer DJ, Skene JH. Fate of GAP-43 in ascending spinal axons of DRG neurons after peripheral nerve injury: delayed accumulation and correlation with regenerative potential. *J Neurosci.* 1991;11(12):3738-51.
- Stevenson JH, Pang CY, Lindsay WK et al. Functional, mechanical, and biochemical assessment of ultrasound therapy on tendon healing in the chicken toe. *Plast Reconstr Surg.* 1986;7(7):965-70.
- Szumski AJ. Mechanisms of pain relief as a result of therapeutic application of ultrasound. *Phys Ther Rev.* 1960;40:116-9.
- Tacke R, Martini R. Changes in expression of mRNA specific for cell adhesion molecules (L1 and NCAM) in the transected peripheral nerve of the adult rat. *Neurosci Lett.* 1990;120(2):227-30.
- Van Vactor D. Adhesion and signaling in axonal fasciculation. *Neuroscience.* 1998;3:80-6.
- Woldbye DP, Bolwig TG, Kragh J et al. Synaptic degeneration and remodelling after fast kindling of the olfactory bulb. *Neurochem Res.* 1996; 2(1):585-93.
- Woolf CJ, Reynolds ML, Molander CB et al. The growth-associated protein GAP-43 appears in dorsal root ganglion cells and in the dorsal horn of the rat spinal cord following peripheral nerve injury. *Neuroscience.* 1990;3(4):465-78.