

환취에서 편측 반회후두신경 재지배 후 neuronal Nitric Oxide Synthase(nNOS)의 발현과 후두기능회복과의 관계

이화여자대학교 의과대학 이비인후과학교실, 울산대학교 의과대학 병리학교실*
정성민 · 김성숙* · 조윤희 · 구태완 · 박수경 · 신유리

= Abstract =

The Expression of neuronal Nitric Oxide Synthase in Reinnervated Recurrent Laryngeal Nerve

Sung Min Chung, M.D., Sung Sook Kim, M.D.,* Yoon Hee Cho, M.D.,
Tae Wan Koo, M.D., Su Kyoung Park, M.D., You Ree Shin, M.D.

Department of Otolaryngology, College of Medicine, Ewha Womans University, Seoul, Korea
Department of Pathology,* College of Medicine, Ulsan University, Seoul, Korea

Background and Objectives : Nitric oxide(NO) is a short-lived molecule with messenger and cytotoxic functions in nervous, cardiovascular, and immune systems. Among the three distinct NOS isoforms, the neuronal isoform is expressed in small, discrete neuronal populations of CNS and PNS. Axonal injury in adult animals results in a dramatic NOS up-regulation in many types of central and peripheral neurons which normally lack the enzyme or express it only at very low levels. In previous study, we confirmed the efficacy of PEMS on the early functional recovery in rats with surgically transected and reanastomosed recurrent laryngeal nerve. Therefore, after we obtained functionally recovered rats using PEMS in this study, we studied to evaluate the expression of nNOS through the analysis of the difference between functional recovery group and non-recovery group in the recurrent laryngeal nerve.

Materials and Method : Using 84 healthy male Sprague-Dawley rats, transections and primary anastomosis were performed on their left recurrent laryngeal nerves. Rats were then randomly assigned to 2 groups. The rats in group A(n=42) received PEMS by placing them in custom cages equipped with Helm-holz coils(3 hr/day, 5 days/wk, for 12 wk). The rats in group B(n=42) were handled the same way as the group A, except that they did not receive PEMS. Laryngo-videoendoscopy was performed before and after surgery and followed up weekly. Laryngeal EMG was obtained in both PCA and TA muscles. Immunohistochemistry staining using monoclonal anti-neuronal nitric oxide synthase(nNOS) antibody was performed to detect nNOS in recurrent laryngeal nerve and nodose ganglion.

논문접수일 : 2001년 5월 2일

심사완료일 : 2001년 6월 11일

책임저자 : 정성민, 158-056 서울 양천구 목동 911-1 이화여자대학교 의과대학 이비인후과학교실

전화 : (02) 650-6163 · 전송 : (02) 2648-5604 E-mail : sungmin@mm.ewha.ac.kr

Results : 20 rats(63%) in group A and 5 rats(17%) in the group B showed recovery of vocal fold motion. The number of NOS-positive cells was increased in functionally-recovered rats. NOS-staining intensity was reduced 12 weeks after nerve injury. The difference between PEMS group and non-stimulated group was not found.

Conclusion : This study shows that nNOS may exert a beneficial effect on nerve regeneration and functional repair.

KEY WORDS : Recurrent laryngeal nerve · Reinnervation · Functional recovery · Nitric oxide (NO) · Nitric oxide synthase(NOS) · S-100 protein.

서 론

Nitric Oxide(NO)는 신경 조직, 심혈관 조직, 면역 조직에서 발견되는 유리 라디칼(free radical)로서 nitric oxide synthase(NOS)에 의하여 생성된다.¹⁾ 최근 세가지 종류의 NOS가 발견되었는데 neuronal isoform(nNOS, NOS-I), endothelial isoform(eNOS, NOS-III), inducible isoform(iNOS, NOS-II)이다. 이들중 nNOS는 중추 및 말초신경계의 여러 신경세포 등에서 발견되고 있다. NOS는 신경계에서는 세포간 전령(messenger)으로서 대뇌 미세순환, 시냅스 형성성(plasticity), 신경 손상, 신경보호(neuroprotective) 과정등과 같은 작용을 한다고 알려져왔다. 여러 저자들이 NADPH-diaphorase(NADPHd) histochemistry, NOS immunohistochemistry, in situ hybridization등의 형태학적인 연구를 통해 말초 신경 손상후에 신경세포(neuron)에서 nNOS의 발현이 증가된다고 보고하고 있다. 후두에서는 개의 편측 반회후두신경의 손상후에 후두의 운동신경세포(motoneuron)에서 NADPHd histochemistry에 의한 방법으로 NADPHd의 활성이 증가한다고 하였다.²⁾

본 교실에서는 골절된 뼈의 치유에 도움을 주고 절단된 말초신경의 재문합 후에 신경재생을 촉진시킨다고 알려져 있는 pulsed electromagnetic stimulation (PEMS)을 흰쥐에서 반회후두신경 재문합 후 적용한 결과, 후두의 기능회복을 조기에 촉진하는 역할을 한다는 것을 확인한 바 있었다.³⁾

따라서 본 연구에서는 PEMS를 이용하여 반회후두신경의 마비후 후두기능이 회복된 쥐의 모델을 만들어 기능이 회복된 경우와 회복되지 않은 경우에 신경 절단 부에서 nNOS의 발현 양상을 면역조직화학적 염색

(immunohistochemistry)을 통하여 비교해 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물로는 체중 250~300g의 정상적인 성대의 움직임 보이는 84마리의 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였다. 두 군으로 나누어 A군(PEMS를 주고 후두기능회복을 유도한 군)과 B군(자연적 기능회복을 유도한 군)으로 구분하였다.

2. 반회후두신경재지배

Ketamine hydrochloride(ketalar, 10mg/100g)을 흰쥐 복강내 주사하여 마취시킨 후 경부 정중부의 털을 전기면도기로 제거하고 양와위로 고정하여 1% povidone iodine으로 소독한 다음 전경부 정중부에 절골부 터 시작하여 윤상연골의 하연에서 2cm정도까지 수직 절개를 하였다. 악하선과 근육을 박리하여 기관을 노출시킨 다음 피대근(strap muscle)을 좌우로 당겨 기관과 식도사이에 주행하고 하인두수축근의 하연부에서 후두로 들어가는 반회후두신경을 확인하였다. 수술용 현미경(OMPI 99, Carl Zeiss, Hamburg, Germany) 하에서 윤상연골 하연으로부터 0.5cm 아랫부분에 위치하는 반회후두신경을 확인하고 현미경가위(microscissors)로 한번에 절단한 후 긴장이 없도록 주의하며 10-0 나일론으로 일차신경봉합을 하였다. 일차봉합한 반회후두신경을 silastic tube(diameter 0.025"× 0.047"× 0.011") 사이에 끼워, 주위 조직과의 유착 및 장애종의 형성을 방지하였다. 또한, 상후두신경의 영향을 배제하기 위해 상후두신경을 절단하였다. 위의 모든 실험조작이 끝난 후 절개부위를 봉합하였다. 수술 후 내시경 검

사를 통해 좌측 성대가 부정중위로 고정되어있는 것을 확인한 후 무작위적으로 42마리씩 A군(PEMS를 주고 후두기능회복을 유도할 군)과 B군(자연적 기능회복을 유도할 군)으로 나누었다.

3. Pulsed electromagnetic stimulation(PEMS)

후두기능이 회복된 쥐의 모델을 얻기 위해 간헐적 전자기장 자극은 정²⁾ 등의 방법에 따라 Helmholtz coil을 장치한 원통을 이용하여 시행하였다. A군은 하루 3시간, 주 5일씩 Helmholtz coil이 내장된 원통에 넣어 PEMS을 시행하였으며, B군에서는 PEMS를 제외한 모든 조건을 동일하게 유지하였다.

4. 비디오후두내시경 관찰

기능회복의 여부를 알기 위해 매주 1회 비디오후두내시경을 실시하였다. 흰쥐를 ketamine chloride(ketalar, 10mg/100g) 복강내 주사로 마취한 다음 2.7mm 경성내시경(Karl Storz, Model 27018A, Germany)을 이용하여 후두내시경검사를 시행하였다. 검사결과 는 카메라(CCD camera, Kay Electronics, Model 9111, USA)와 컴퓨터(Computer, Multimedia system, Kay Elemetrics, Model 9140, USA)에 연결된 후두스트로보스코피(Rhino-laryngeal stroboscope, Kay Elemetrics, Model 9100, USA)를 사용하여 기록하고, 모든 기록은 S-VHS Model 9132를 사용하여 녹화 및 재생하였다. 비디오후두내시경검사 결과는 성대고정, 호흡시 성대의 떨림, 호흡시 성대가 외전되는지의 3가지 형태로 구분하여 성대고정과 떨림은 회복이 되지 않은 것으로, 호흡하는 동안 외전이 정상적으로 일어나는 경우는 회복이 된 것으로 분류하였다. 후두기능회복의 판정은 실험에 참여하지 않은 2명의 이비인후과 의사가 참여하여 결정하였다.

5. 자발 후두 근전도 측정

실험과정이 끝난 12주 후 흰쥐를 희생시키기 전에 근전도를 통해 병변쪽인 좌측의 후운상피열근과 정상쪽인 우측의 후운상피열근의 호흡시 활동전위가 일치하는지를 관찰하여 전기생리학적 기능회복의 정도를 다시 한번 확인하였다. 흰쥐를 ketamine hydrochloride(ketalar, 10mg/100g) 복강내 주사로 마취시킨 후 상기방법으로 기관을 노출시킨 후 왼쪽에 있는 하인두수축근을 절단하여 왼쪽 갑상연골의 날개를 갈고리(hook)

로 짓히고 윤상연골 뒤쪽의 후운상피열근을 확인하였다. 접지전극(ground electrode)은 꼬리에, 기준전극(reference electrode)은 턱에 위치시키고 채널 1은 우측 후운상피열근에, 채널 2는 좌측의 후운상피열근에 갈고리 철사(hooked-wire) 전극을 사용하여 연결한 후에 두 근육의 자발적인 근육의 활동전위를 보았다. 철사(wire) 전극을 통해서 얻은 근복합활동전위는 differential amplifier(cyber amp 380, Axon Instruments, CA)를 통해 증폭, 여과시켰고 다시 디지털화(Digidata, Axon Instrument, CA) 시킨 후 컴퓨터에 저장하였고 파형의 분석은 Axoscope 프로그램(Axon Instrument, CA)을 사용하였다.

6. 검체의 제위

상기 과정에서 PEMS군에서 3주째 기능이 회복되지 않은 1마리의 쥐와 PEMS군과 자극을 주지 않은 군에서 4주와 12주에 각각 기능이 회복된 흰쥐 1마리와 기능이 회복되지 않은 흰쥐 1마리씩 총 9마리를 이용하였다. 앞의 실험과정에서와 같이 마취하고 개흉하여 심장을 노출시키고, 좌심실을 통하여 14 gauge 주사바늘을 상행대동맥에 삽입하여 관류액이 유입되도록하고, 우심방을 절제하여 관류액이 유출되도록 준비하였다. 먼저 heparin(2IU/ml)을 첨가한 생리식염수로 관류하여 혈액을 씻어내고 계속하여 고정액(4% paraformaldehyde in 0.01M sodium phosphate buffer, PH 7.4)으로 관류 고정한 후 좌측 반회후두신경을 신경 문합부위를 포함하여 근위부 4mm와 동측의 Nodose 신경절(ganglion)을 적출하였다. 정상 반회후두신경과 Nodose 신경절의 염색을 위해 반대편 반회후두신경과 Nodose 신경절을 적출하였다.

7. 조직학적 염색

조직학적 검사를 위해서는 미리 포르말린에 고정된 신경조직을 파라핀에 포매하여 조직절편기를 이용하여 5 μ m 두께로 절편을 만든 후 헤마톡실린-에오진 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다.

8. 면역조직화학 염색

면역조직화학 염색으로는 통상의 방법을 사용하였는데 역시 파라핀 포매 조직으로부터 얻은 5 μ m 절편을 대상으로 탈파라핀화와 함수(hydration)를 시행한 후 비특이 단백질을 10% 산양 혈청으로 봉쇄하였다. 그리

고 3% 과산화수소를 처리한 다음 일차 항체를 도포하고 실온에서 2시간 처리하였다. 일차 항체 중 S-100항체는 Dako(Santa Cruz, USA) 회사 제품(anti S-100 mouse monoclonal antibody)을 사용하였고 nNOS 항체는 Transduction(Lexington, KY)에서 제조한 항체(anti nNOS mouse monoclonal antibody)를 사용하였다. S-100 항체와 nNOS 항체 모두 항체 희석액(Dako, USA)으로 1 : 50 비율로 희석하였다. 수세 후 이차항체(biotinylated secondary anti mouse and anti rabbit antibody) 및 스트렙타비딘-과산화효소 결합체(streptavidin-peroxidase complex LSAB), 기질(substrate : DAB) 등은 Dako 회사의 상품 staining kit(Santa Cruz, USA)를 사용하여 염색하였다. 결과는 올림푸스 BXH 광학현미경으로 관찰하였으며 사진은 올림푸스 자동 사진기를 이용하여 얻었다. 염색 정도는 전혀 염색이 되지 않은 경우를 음성(negative), 일부 신경세포의 세포질에 양성을 보여 다갈색으로 염색이 된 경우를 양성(positive, grade 1+), 모든 신경

세포에 양성을 보인 경우를 양성(positive, grade 2+)으로 판정하였다. 모든 조직검사 및 면역 조직화학 염색 결과는 각 실험군을 모르는 상태로 편견없이 진행되었다.

결 과

1. 후두기능회복

12주 동안 A군에서는 살아남은 32마리 중 20마리(63%)가, B군에서는 27마리 중 5마리(17%)에서 성대의 움직임이 회복되어 A군에서 높은 회복율이 관찰되었고 이는 통계학적으로도 유의한 소견을 보였다($p < 0.05$).

2. 조직학적 관찰

헤마톡실린-에오진 염색을 하여 적출된 신경과 신경절을 광학현미경으로 1차 확인하였다. 적출된 신경은 평균적으로 1.5×1 내지 2×1mm의 신경조직으로 축삭(axon)과 schwann 세포로 구성되어 있었다. Nod-

Table 1. Number of functionally recovered rats following laryngeal reinnervation

| Weeks | Group A(N=42) | | | Group B(N=42) | | |
|-------|---------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------|
| | No. of non-recovered rats | No. of recovered rats | No. of expired rats | No. of non-recovered rats | No. of recovered rats | No. of expired rats |
| 12 | 12 | 20 | 10 | 22 | 5 | 15 |

Group A : pulsed electromagnetic stimulation following reinnervation

Group B : no stimulation following reinnervation

*Note : Recovery rates are 63% in group A and 17% in group B, respectively. These values have significant difference statistically($p < 0.05$, chi-square test)

Table 2. Staining intensity in immunocytochemistry of nNOS and S-100 protein

| Weeks after injury | Group | FR/NFR | nNOS | | S-100 protein | |
|--------------------|-------|--------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| | | | Proximal stump | Nodose ganglion | Proximal stump | Nodose ganglion |
| 3 | A | NFR | 2+ | 2+ | 2+ | 2+ |
| 4 | A | FR | + | + | + | + |
| 4 | A | NFR | - | - | + | + |
| 4 | B | FR | + | + | + | + |
| 4 | B | NFR | + | + | + | + |
| 12 | A | FR | + | + | + | + |
| 12 | A | NFR | - | - | + | + |
| 12 | B | FR | - | - | + | + |
| 12 | B | NFR | - | - | + | + |

A : pulsed electromagnetic stimulation following reinnervation

B : no stimulation following reinnervation

FR : Functionally recovered group

NFR : Not functionally recovered group

*Staining Intensity

Grade - : negative immunoreactivity

Grade + : weak immunoreactivity

Grade 2+ : strong immunoreactivity

*Note : The number of NOS-positive cells was increased in functionally-recovered group. But values are not significant ($p > 0.05$, Fishers exact test)

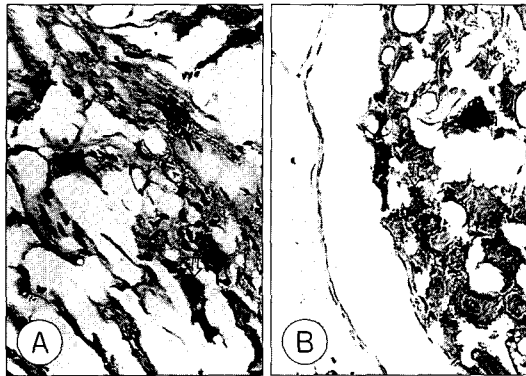


Fig. 1. Immunocytochemistry for nNOS and S-100 protein, 3 weeks after injury. A : immunoreactivity for nNOS in functionally non-recovered rat of PEMS group(grade 2+, Nodose ganglion, $\times 200$). B : immunoreactivity for S-100 protein in functionally non-recovered rat of PEMS group(grade 2+, Nodose ganglion, $\times 200$). Arrows indicate the positive immunoreactivity.

ose 신경절은 다양한 크기의 신경절 세포로 구성되어 있었다. 신경은 근위부와 Nodose 신경절 모두에서 다양한 정도의 손상을 보이고 있었으며 각 실험군에 따라서는 시간이 증가할수록 손상의 정도가 심하게 관찰되었으나 광학현미경상 PEMS 노출에 따른 차이는 관찰할 수 없었다. 손상은 주로 공포화(vacuolation), 변성(degeneration), 섬유화(fibrosis) 등이 관찰되었다.

3. 면역조직화학염색 결과

면역조직화학염색은 S-100 단백질과 nNOS에 대한 두 가지 염색을 시행하였다(Table 2). nNOS는 주로 신경세포의 세포질에서 비교적 균등하게 관찰되었다. 신경근위부와 Nodose 신경절 모두에서 시간이 오래 경과할수록 염색의 정도가 약하였다. 신경근위부와 Nodose 신경절에서의 염색의 정도는 유사하게 나타났다. 3주의 신경에서 nNOS에 대한 염색의 정도가 가장 강하게 나타났다(Fig. 1). 4주의 신경에서는 강하고 또한 미만성의 염색상을 관찰할 수 있었고(Fig. 2), 시간이 오래 경과한 경우, 즉 12주에서의 신경에서는 염색이 희미하여 nNOS가 거의 발현되지 않았다(Fig. 3). 기능이 회복한 군이 기능이 회복되지 않은 군에서보다 nNOS에 대한 염색 정도가 강하고 더 많은 수의 쥐에서 양성으로 관찰되었으나 통계학적으로 유의하지는 않았다($p=0.486$).

S-100 단백질은 신경의 Schwann 세포의 세포질에 주

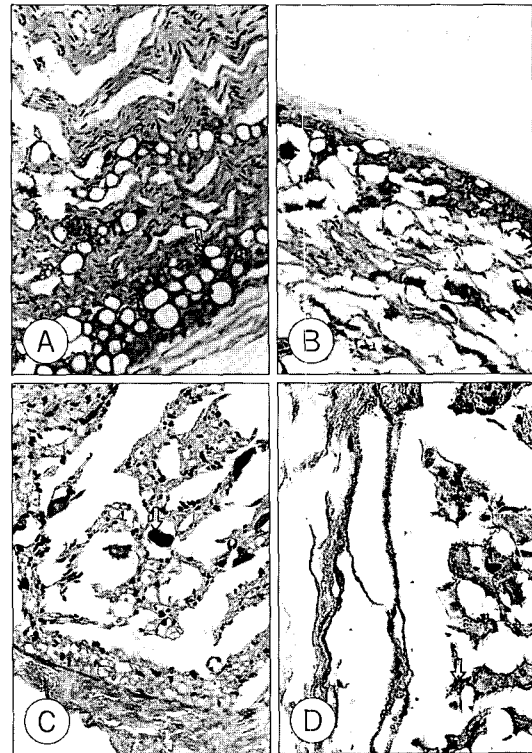


Fig. 2. Nitric oxide synthase, neuronal isoform(nNOS) immunocytochemistry, 4 weeks after injury. A : Nodose ganglion in functionally recovered rat of PEMS group(grade+, $\times 200$). B : Nodose ganglion in functionally non-recovered rat of PEMS group(grade-, $\times 200$). C : Nodose ganglion in functionally recovered rat of control group(grade+, $\times 200$). D : Nodose ganglion in functionally non-recovered rat of control group(grade+, $\times 200$). Arrows indicate the positive immunoreactivity.

로 염색되므로 각 군에서 모두 양성으로 관찰되었다(Fig. 4). 염색의 정도는 각 군간에 별다른 차이가 없었으며 손상후 3주째의 쥐에서 가장 강하게 염색이 되었다(Fig. 1).

고 찰

Nitric Oxide(NO)는 신경 조직, 심혈관 조직, 면역조직에서 발견되는 유리라디칼(free radical)로서 nitric oxide synthase(NOS)에 의하여 생성된다. 최근 세가지 종류의 NOS가 발견되었는데 neuronal isoform(nNOS, NOS-I), endothelial isoform(eNOS, NOS-III), inducible isoform(iNOS, NOS-II)이다. 이들중 nNOS가 중추 및 말초신경계의 여러 신경세포

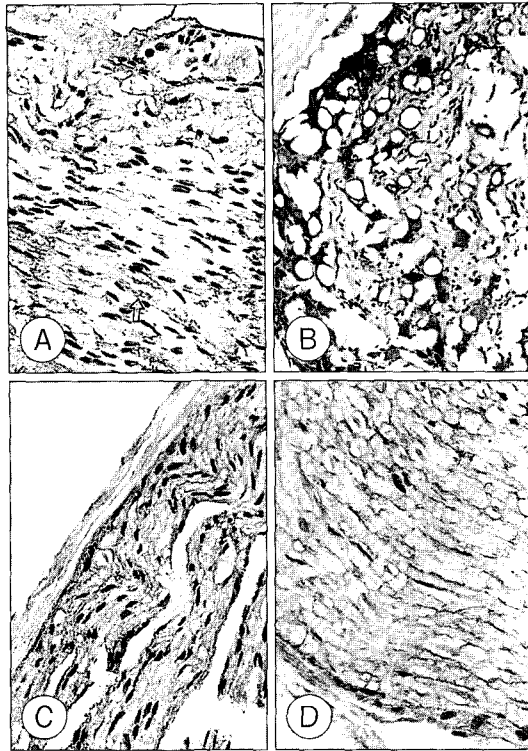


Fig. 3. Nitric oxide synthase, neuronal isoform(nNOS) immunocytochemistry, 12 weeks after injury. A : Proximal stump of recurrent laryngeal nerve in functionally recovered rat of PEMS group(grade+, ×200). B : Proximal stump of recurrent laryngeal nerve in functionally non-recovered rat of PEMS group(grade-, ×200). C : Proximal stump of recurrent laryngeal nerve in functionally recovered rat of control group(grade-, ×200). D : Proximal stump of recurrent laryngeal nerve in functionally non-recovered rat of control group(grade-, ×200) Arrows indicate the positive immunoreactivity.

들에서 발견되고 있다. NOS는 신경계에서는 세포간 전령(messenger)으로서 대뇌 미세순환, 시냅스 형성성(plasticity), 신경 손상, 신경보호(neuroprotective) 과정 등과 같은 작용을 한다고 알려져왔다. NO의 생성 기전은 아직 정확히 밝혀지지는 않았으나 L-arginine, 산소 및 NADPH(nicotinamide-adenine dinucleotide hydrogen phosphate)를 기질로 사용하여 NOS에 의하여 L-citrulline과 함께 NO가 생성된다. 이때 중간생성물로 NADPH 의존성 반응에 의해 N-OH-arginine이 형성되며, 이 중간생성물의 수산화되어 있는 질소가 NO로 되는 과정도 역시 NADPH 의존성 반응이다.¹⁾ 여러 저자들이 NADPH-diaphorase(NAD-

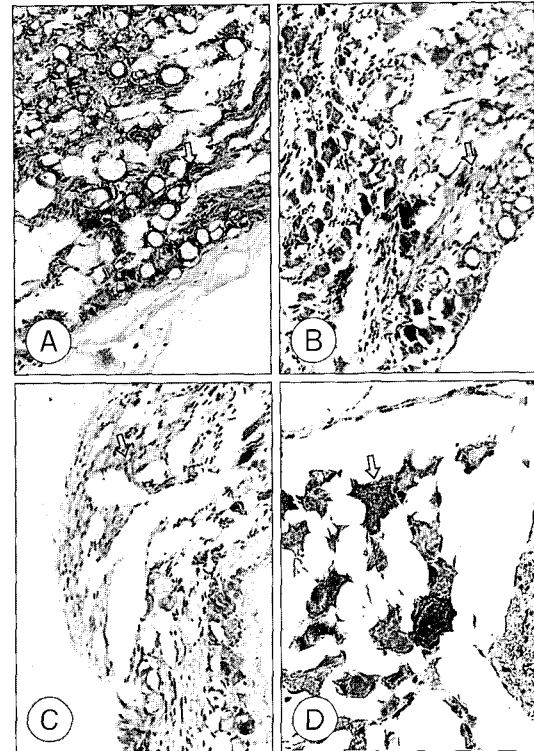


Fig. 4. S-100 protein immunocytochemistry 4 weeks after injury. A : Nodose ganglion in functionally recovered rat of PEMS group(grade+, ×200). B : Nodose ganglion in functionally non-recovered rat of PEMS group(grade+, ×200). C : Nodose ganglion in functionally recovered rat of control group(grade+, ×200). D : Nodose ganglion in functionally non-recovered rat of control group(grade+, ×200). Arrows indicate the positive immunoreactivity.

PHd) histochemistry, NOS immunohistochemistry, in situ hybridization등의 형태학적인 연구를 통해 말초 신경 손상후에 신경세포(neuron)에서 nNOS의 발현이 증가된다고 보고하였다. 후두에서는 개의 편측 반회후두신경의 손상후에 후두의 운동신경세포(motoneuron)에서 NADPHd histochemistry에 의한 방법으로 NADPHd의 활성이 증가함이 보고된 바 있다.⁴⁾ 이것은 nNOS의 증가가 신경 재생과 기능의 회복에 영향을 미침을 시사한다.

본 교실에서는 골절된 뼈의 치유에 도움을 주고 절단된 말초신경의 재문합 후에 신경재생을 촉진시킨다고 알려져 있는 pulsed electromagnetic stimulation (PEMS)을 흰쥐에서 반회후두신경 재문합 후 적용한 결과, 후두의 기능회복을 조기에 촉진하는 역할을 한다

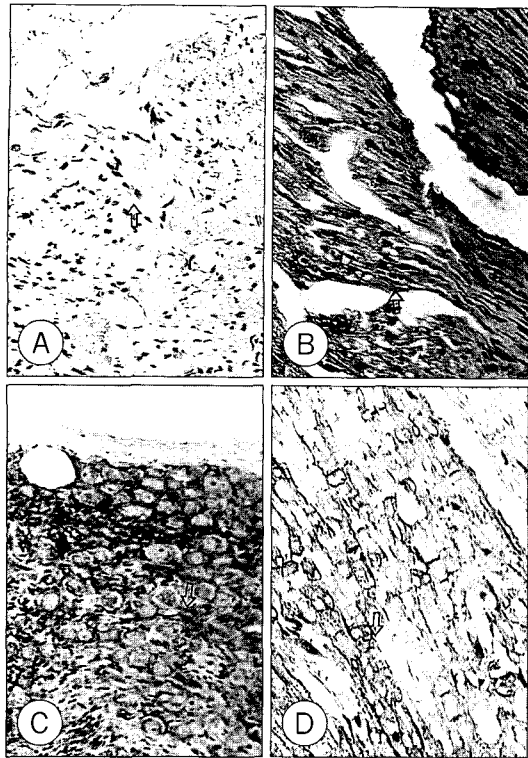


Fig. 5. S-100 protein immunocytochemistry, 12 weeks after injury. A : Nodose ganglion in functionally recovered rat of PEMS group(grade+, ×200). B : Nodose ganglion in functionally non-recovered rat of PEMS group(grade+, ×200). C : Nodose ganglion in functionally recovered rat of control group(grade+, ×200). D : Nodose ganglion in functionally non-recovered rat of control group(grade+, ×200). Arrows indicate the positive immunoreactivity.

는 것을 확인한 바 있었다.³⁾

따라서 본 연구에서는 PEMS를 이용하여 반회후두 신경 마비 후 후두기능이 회복된 쥐의 모델을 만들어 기능이 회복된 경우와 회복되지 않은 경우에 신경 절단 부위에서의 재생 정도를 비교하고 신경 재생에 영향을 미치는 것으로 알려져 있는 nNOS의 발현 양상을 비교하여 PEMS와 nNOS의 발현과의 관계를 분석해 보고자 하였다.

면역조직화학(immunohistochemistry) 염색을 위해서는 PEMS를 준 군에서 3주에 기능이 회복되지 않은 쥐 1마리, 4주와 12주의 기능이 회복된 쥐 1마리와 기능이 회복되지 않은 쥐 1마리씩을, 자극을 주지 않은 군에서도 4주와 12주에 기능이 회복된 쥐와 기능이 회복되지 않은 쥐 각각 1마리씩 총 9마리를 이용하였다.

저자들은 기능의 회복이 관찰되기 시작하는 4주째와 매일 1~2mm 정도씩 반회후두신경이 재생된다⁴⁾고 할 때 재문합후 완전한 재생이 이루어지는 것으로 판단되는 12주째의 쥐를 선택하여 기능이 회복된 군과 회복되지 않은 군을 비교하고자 하였다.

신경의 손상 정도를 광학현미경으로 1차적으로 확인하였다. 본 연구에서 광학현미경상 신경은 다양한 정도의 손상을 보이고 있었으며 손상은 주로 공포화(vacuolation), 변성(degeneration), 섬유화(fibrosis) 등이 관찰되었다. 광학현미경상 뚜렷한 재생의 증거는 관찰할 수 없었다. 각 실험군에 따라서는 시간이 증가할수록 손상의 정도가 심하게 관찰되었으나 광학현미경상 PEMS 노출에 따른 차이는 관찰할 수 없었다. 본 연구에서 기능이 회복된 군과 기능이 회복되지 않은 군간에 광학현미경상 뚜렷한 차이점을 발견할 수 없었는데 이는 광학현미경에 의한 관찰의 한계가 있고 검체의 수가 적었기 때문으로 생각된다.

면역조직화학염색은 S-100 단백질과 nNOS에 대한 두 가지 염색을 시행하였다(Table 1). S-100 단백질은 신경의 Schwann 세포의 세포질에 주로 염색되므로⁵⁾ 각 군에서 모두 양성으로 관찰되었다. 염색의 정도는 각 군간에 별다른 차이가 없었으며 손상후 3주째의 쥐에서 가장 강하게 염색이 되었다(Fig. 5). S-100 단백질은 schwann 세포의 세포질에 존재하며 운동신경세포의 성장을 촉진한다고 알려져 있으나⁵⁾ 본 연구에서 기능이 회복된 군과 기능이 회복되지 않은 군간에 유의한 차이는 없었다.

nNOS는 주로 세포의 세포질에서 비교적 균등하게 관찰되었다. 신경근위부와 Nodose 신경절에서의 염색의 정도는 유사하게 나타났다. 3주의 신경에서 nNOS에 대한 염색의 정도가 가장 강하게 나타났다(Fig. 1). 4주의 신경에서는 강하고 또한 미만성의 염색상을 관찰할 수 있었고(Fig. 2), 시간이 오래 경과한 경우, 즉 12주에서의 신경에서는 염색이 희미하여 nNOS가 거의 발현되지 않았다(Fig. 3). 기능이 회복한 군이 기능이 회복되지 않은 군에서보다 nNOS에 대한 염색 정도가 강하고 더 많은 수의 쥐에서 양성으로 관찰되었으나 통계학적으로 유의하지는 않았다($p=0.486$). 본 연구에서 기능이 회복된 군에서는 4마리중 3마리에서 nNOS에 양성 소견을 보인 반면에 기능이 회복되지 않은 군은 4마리 중의 1마리에서만 nNOS에 양성 소견을 보였다.

Gonzalez 등⁶⁾의 연구에 의하면 NOS는 운동신경세포(motoneuron)에서는 정상적으로는 존재하지 않는다고 한다. 따라서 본 연구에서 NOS 양성 세포의 관찰은 어떠한 기전에 의해서든 NOS의 발현이 반회후두신경의 재생에 영향을 미친다는 것을 시사한다. NOS가 정상적으로는 존재하지 않거나 아주 소량 존재하는 여러 신경조직에서 신경 축삭의 손상이 NOS의 발현을 조절한다는 많은 연구들이 있다.^{6,9)} 대부분의 연구에서 중추신경과 말초신경에서 손상후의 NOS의 발현 양상이 다르게 나타난다고 보고하고 있다. 말초신경에 대한 연구로, Tomas 등¹⁰⁾은 좌골 신경에서 신경 손상후 재생 과정의 축삭(axon)에서 세가지 형태의 NOS가 모두 증가함을 보여준 바 있다. Wan-hue 등¹¹⁾은 미주신경과 설하신경의 손상후에 신경재지배와 신경의 기능회복에 따른 NOS의 발현양상을 손상후 시간에 따라 보고하였다. 이들은 설하신경의 경우 면역조직화학염색에 염색되는 신경세포의 수와 그 염색 강도가 시간에 따라 감소하는 반면 미주신경에서는 신경손상의 종류와 관계없이 시간에 따라 증가한다고 하였다. 또 Hisa 등²⁾은 신경의 손상의 종류에 따라서는 NOS가 다르게 발현한다고 보고하고 있다. 이들은 반회후두신경을 이용한 연구에서 신경의 염좌(avulsion) 후에는 의핵(Nucleus ambiguus)에서 NADPHd 양성 신경세포가 손상을 주지 않은 군과 동일한 염색정도를 보인 반면 절단(transection) 후에는 염색의 강도가 증가되는 소견을 보였다고 하였다.

신경 재생에 있어서 NOS가 신경독성(neurotoxic)이 있는지 신경보호(neuroprotective)의 기능이 있는지에 대해서는 논란이 있다. 이에 대해 Tomas 등¹⁰⁾은 NOS의 농도에 의해 결정된다고 하였다. 저농도의 NOS는 수용성 효소인 guanylyl cyclase를 활성화시켜서 세포간 cyclic GMP를 증가시키고 phosphodiesterase와 protein kinase G를 활성화시켜서 여러가지 유익한 작용을 한다. 반면 고농도의 NO는 cyclic GMP와는 무관하게 조절 단백질(regulatory protein)에 heme과 iron sulfure를 부착시켜 DNA를 손상시키고 peroxynitrite를 생성한다고 한다. 현재까지도 신경축삭손상후의 NOS의 정확한 역할에 대한 기전은 잘 알려져 있지 않지만 신경손상후 NOS가 발현된다는 사실은 여러 저자들의 연구에서처럼 본 연구에서도 확인할 수 있었다.

본 저자들의 연구에 있어서 신경손상후 3주째의 쥐에서 NOS의 염색이 가장 강하게 나타난 것으로 보아 NOS는 신경손상의 급성기에 작용할 것으로 생각된다. 이는 4주째의 쥐에서보다 12주째의 쥐에서 NOS가 더 미량성으로 염색된 것으로 보아서도 NOS는 저자들의 연구에서보다 더 급성기에 활발한 작용을 할 것으로 생각된다. 대개의 연구자들이 손상후 4주에서 6주 이내의 연구결과들을 보고하고 있어 본 저자들의 연구에 있어서도 보다 급성기의 실험이 필요하리라고 본다. 하지만 Wan-hue 등¹¹⁾의 연구에 따르면 미주신경손상후 NADPHd 양성 신경세포의 수가 손상후 70일째까지 시간이 지남에 따라 발현이 증가된다고 보고한 바도 있어 신경손상후 시간에 따른 NOS의 발현에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

PEMS를 준 군과 자극을 주지 않은 군간에 NOS의 발현 양상은 차이가 없었다. 국외에서 PEMS는 골절의 불유합이 있는 환자들에게 이미 F.D.A의 공인을 받아 임상적으로 이용되고 있지만 신경의 재생에 미치는 영향은 아직 연구중에 있다. PEMS가 불유합된 골의 유합에 도움을 주는 기전은 무기질의 침착 및 연골 내골화, 교원질 합성을 증가시키고 혈관신생을 촉진하며 골아세포의 활동성을 증가시키고 또한 파골세포의 활동을 억제하는 효과에 의한 것으로 보고되며^{12,13)} 이러한 세포기능의 조절에는 칼슘통로차단제, 부갑상선호르몬, IGF-II 등이 관여하는 것으로 생각된다.¹⁴⁾ 신경재생을 촉진시키는 효과 또한 성장인자, 호르몬에 대한 영향, 재생되는 신경의 outgrowth 촉진, 세포막 탈분극의 유도, 칼슘유입 증가, 신경전달물질의 증가, Schwann 세포의 분열 증가, 탐식세포 활동의 증가, 축삭의 수송, 세포골격 형성의 촉진에 의한다는 실험적 증거들이¹²⁾ 제시되고 있으나 아직까지 명확하게 규명된 것은 없고, NOS에 대한 실험적 보고 또한 없다. Thompson 등¹⁵⁾은 전류의 흐름을 바꾸어 주는 것이 축삭형질이동에 유리하고 단백질합성을 위한 효소의 활동에 효과적이며 손상부위의 섬유화를 억제하고 Schwann 세포의 탐식작용을 증진시킨다고 하였으며 PEMS가 신경손상 후 변성기 동안 신경세포체의 손상을 줄인다고 하였다.

저자들의 연구는 반회후두신경 재지배후 기능회복이 시작되기 시작하는 시기인 4주와 신경의 재생이 완성되는 것으로 생각되는 12주에 PEMS를 준 군과 주지 않은 군, 기능이 회복된 군과 회복되지 않은 군에서의

nNOS의 발현 양상을 비교하고 자 한 연구로 nNOS가 신경재지배후 기능의 회복에 영향을 준다는 것을 확인하였다. 하지만 신경 손상 초기의 nNOS의 영향에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

원쥐의 반회후두신경 절단 후 신경말단끼리 일차문합하여 만든 동물 모델에서 12주 후에는 A군에서는 20마리(63%)가, B군에서는 5마리(17%)가 성대의 움직임이 회복되어 A군에서 높은 회복율이 관찰되었다. 이는 통계학적으로 의미 있는 결과를 보였다($p < 0.05$). 따라서 이 연구결과는 반회후두신경의 신경재문합 후 기능회복에 있어서 PEMS의 적용이 후두의 기능회복율도 증가시키는 역할을 한다는 정 등³⁾의 연구결과와 일치한다.

기능이 회복된 쥐에서 신경의 근위부와 Nodose 신경절에서 nNOS로 발색된 신경세포의 수는 기능이 회복되지 않은 쥐에서보다 많았다. 반면 PEMS를 준 군과 주지 않은 군간에 nNOS의 발색 정도는 차이가 없었다. 시간별로는 신경 손상후 4주째의 쥐에서 12주째의 쥐보다 발색의 정도가 강하였다. 따라서 본 실험의 결과에서는 NOS가 반회후두신경의 재문합 후 후두의 기능회복에 영향을 미치며 이는 좀더 급성기에 작용하는 것으로 생각된다

중심 단어 : 반회후두신경 · 기능회복 · Pulsed electromagnetic stimulation · nNOS · S-100.

References

- 1) David SB, Solomon HS : *Nitric Oxide, a Novel Neuronal Messenger*. *Neuron*. 1992 ; 8(1) : 3-11
- 2) Hisa Y, Shinobu K, Nobuhisa T, Hitoshi S, Kazuhiro S, Toshiyuki U : *Neurotransmitters and Neuromodulators Involved in Laryngeal Innervation*. *Ann*

Otol Rhinol Laryngol. 1991 ; 108 : 3-14

- 3) Chung SM, Lee YY, Cho SH et al : *Effects of Pulsed Electromagnetic Stimulation on Functional Recovery Following Laryngeal Reinnervation in the Rat*. *Korean J Otolaryngol*. 2001 ; 44 : 80-88
- 4) Rice DH : *Laryngeal reinnervation*. *Laryngoscope*. 1982 ; 92 : 1049-1059
- 5) Anita B, Ronald WO, David P, Blake WM, Robert B, Nancy R : *S100 Is Present in Developing Chicken Neurons and Schwann Cells and Promotes Motor Neuron Survival in vivo*. 1992 ; 23(4) : 451-466
- 6) Gonzalez MF, Sharp FR, Sugar SM : *Axotomy increases NADPH-diaphorase staining in rat vagal motor neurons*. *Brain Res Bull*. 1986 ; 18 : 417-427
- 7) Wu W : *Expression of nitric-oxide synthase(NOS) in injured CNS neurons as shown by NADPH-diaphorase histochemistry*. *Exp Neurol*. 1993 ; 120 : 153-159
- 8) Wu W, Li L : *Inhibition of nitric oxide synthase reduces motoneuron death due to spinal root avulsion*. *Neurosci Lett*. 1993 ; 153 : 121-124
- 9) Yu W-HA : *Nitric oxide synthase in motor neurons after axotomy*. *J Histochem Cytochem*. 1994 ; 42 : 451-457
- 10) Tomas GH, Aldo R : *Expression of Three Forms of Nitric Oxide Synthase in Peripheral Nerve Regeneration*. 1999 ; 55 : 198-207
- 11) Yu W-HA : *Regulation of Nitric Oxide Synthase Expression in Motoneurons following Nerve Injury*. *Dev Neurosci*. 1997 ; 19 : 247-254
- 12) Andrew C, Bassett L : *Beneficial effects of electromagnetic fields*. *J Cell Biochem*. 1993 ; 51 : 387-393
- 13) Goodman R, Bassett CA, Henderson AS : *Pulsing electromagnetic fields induce cellular transcription*. *Science*. 1983 ; 220(4603) : 1238-1235
- 14) Bassett CA : *Fundamental and practical aspects of therapeutic uses of pulsed electromagnetic fields(PEMFs)*. *Crit Rev Biomed Engineering*. 1989 ; 17 : 451-529.
- 15) Thompson GC, Ross CD, Thompson AM, Byers JM : *Changes in brainstem calcitonin gene-related peptide after VIIth and VIIIth cranial nerve lesions in guinea pig*. *Brain Res*. 1995 ; 683 : 140-148