

삼차원 배양된 슈반세포 도관을 이용한 말초 신경 재생

김성민^{1,2} · 이종호¹서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실¹, 강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실²**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2004;30:1-16)

PERIPHERAL NERVE REGENERATION USING A THREE-DIMENSIONALLY CULTURED SCHWANN CELL CONDUIT

Soung-Min Kim^{1,2}, Jong-Ho Lee¹*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Seoul National University¹
Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Kangnung National University²*

The use of artificial nerve conduit containing viable Schwann cells is one of the most promising strategies to repair the peripheral nerve injury. To fabricate an effective nerve conduit whose microstructure and internal environment are more favorable in the nerve regeneration than existing ones, a new three-dimensional Schwann cell culture technique using Matrigel[®] and dorsal root ganglion (DRG) was developed.

Nerve conduit of three-dimensionally arranged Schwann cells was fabricated using direct seeding of freshly harvested DRG into a Matrigel[®] filled silicone tube (I.D. 1.98 mm, 14 mm length) and in vitro rafting culture for 2 weeks. The nerve regeneration efficacy of three-dimensionally cultured Schwann cell conduit (3D conduit group, n=6) was assessed using SD rat sciatic nerve defect of 10 mm, and compared with that of silicone conduit filled with Matrigel[®] and Schwann cells prepared from the conventional plain culture method (2D conduit group, n=6). After 12 weeks, sciatic function was evaluated with sciatic function index (SFI) and gait analysis, and histomorphology of nerve conduit and the innervated tissues of sciatic nerve were examined using image analyzer and electromicroscopic methods.

The SFI and ankle stance angle (ASA) in the functional evaluation were -60.1 ± 13.9 , $37.9^\circ \pm 5.4^\circ$ in 3D conduit group (n=5) and -87.0 ± 12.9 , $32.2^\circ \pm 4.8^\circ$ in 2D conduit group (n=4), respectively. And the myelinated axon was $44.91\% \pm 0.13\%$ in 3D conduit group and $13.05\% \pm 1.95\%$ in 2D conduit group to the sham group. In the TEM study, 3D conduit group showed more abundant myelinated nerve fibers with well organized and thickened extracellular collagen than 2D conduit group, and gastrocnemius muscle and biceps femoris tendon in 3D conduit group were less atrophied and showed decreased fibrosis with less fatty infiltration than 2D conduit group.

In conclusion, new three-dimensional Schwann cell culture technique was established, and nerve conduit fabricated using this technique showed much improved nerve regeneration capacity than the silicone tube filled with Matrigel[®] and Schwann cells prepared from the conventional plain culture method.

Key words : Three-dimensional culture, Schwann cell, Peripheral nerve regeneration, Dorsal root ganglion, Nerve conduit

I. 서 론

이종호

110-768, 서울특별시 종로구 연건동 28

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Jong-Ho Lee

Department of OMFS, College of Dentistry, Seoul National University

#28, Yeongun-dong, Jongro-gu, Seoul, 110-768, South Korea

Tel : 82-2-760-2630 Fax : 82-2-766-4948

E-mail : leejongh@plaza.snu.ac.kr

말초신경 손상은 임상치의학이나 구강악안면 영역의 수술에서 흔히 접하게 되는데 대개는 외과적인 처치 없이 지켜보게 되나, 손상받은 근원심 신경부가 자연 재생될 수 없을 만큼 넓은 경우 자가신경 이식을 이용한 외과적인 처치를 필요로 하게 된다^{1,4)}.

비복신경(sural nerve)이나 대이개신경(greater auricular nerve)과 같은 공여부 신경 손상을 피하기 위해서 여러 인공 신경 도관을

※ 본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (과제고유번호 예시 : 02-PJ1-PG1-CH07-0001).

개발하려는 노력이 있어 왔는데, 그 중 체외 배양된 슈반세포를 이용한 신경 도관을 개발하여 자가 신경 이식과 비교한 연구가 많이 진행되어 왔다^{5,6}. 이 중 슈반 세포의 밀도를 높이거나 신경 세포의 스캐폴드 구조를 증진시켜서 이러한 신경 도관의 효율을 높이려는 노력이 있어 왔는데, 3차원적인 미세 신경 구조를 형성하기 위해 슈반세포를 입힌 층을 여러 겹으로 겹치게 하거나 비세포성 근섬유(acellular muscle fiber)를 이용한 슈반 세포 도관을 만들기 위한 노력들이 대표적이라 할 수 있다^{7,9}. 그러나 대부분 이런 연구의 결과는 효과적이지 못했는데, 이는 통상적인 세포 배양법으로는 슈반 세포의 증식이나 분화가 어려우며, 신경 도관 내에 이식한 슈반 세포의 생존 여부도 불확실할 뿐 아니라 슈반세포가 균일하게 도관 내면에 퍼지지 못하고 대부분 도관 단면의 가운데나 주변부에 남아 있기 때문이었다^{2,10}.

따라서 만약 매트리지엘® (Matrigel®)과 같은 세포외기질 (extracellular matrix)에서 슈반세포를 자라게 해서 정상 신경도관의 미세 신경 다발과 비슷한 단면 형태가 만들 수 있다면 신경 축삭 재생을 위해 유리할 것으로 기대할 수 있을 것이다¹¹. 본 연구는 슈반 세포의 삼차원배양법을 통하여 신경 재생에 유리한 말초신경 도관을 개발하고자 하였으며, 백서 좌골신경 결손 모델을 이용하여 신경 재생능을 평가하는데 목적을 두었다.

II. 재료 및 방법

1. 3차원 배양된 슈반 세포 도관의 개발 (Development of three-dimensionally cultured Schwann cell conduit)

1-1. 신생 백서의 척수후근절로부터 일차 세포 배양 (Primary cell culture from dorsal root ganglia [DRG] of new born rat)

해부현미경 (Fig. 1, Olympus SZ-40)을 이용하여 신생 Sprague Dawley (Sam:TacN [SD] BR) 백서의 척수후근절을 일차배양하였는데, 주 배양액 (main culture medium [M-10])은 MEM (Eagle's Minimum Essential Medium) 93ml, 마혈청 (horse serum) 5ml, 50% 포도당과 2mg/ml 겐타마이신 1ml 등으로 만들었다. 배양된 척수후근절은 해부 현미경 하에 잘게 잘라서 phosphate-buffered solution (PBS, pH 7.4, Gibco, USA)에서 0.25% 콜라제나아제 (Worthington collagenase type I, USA) 1ml와 0.2% DNase (Gibco, USA) 0.1ml 를 이용하여 효소 처리하여 70분간 37°C에서 배양하였다. 800 rpm에서 5분간 원심 분리후, 0.125% trypsin-EDTA (Gibco, USA) 2ml 를 추가하여 10분간 37°C에서 배양한 후, 주 배양액 5ml를 사용하여 부드럽게 피펫팅하여 넓게 퍼뜨렸다. 넓게 퍼진 세포들은 다시 5분간 1000 rpm에서 원심 분리한 후 주배양액으로 3회 씻어낸 후, 배양 용기 (polyethyleneimine coated dish, Sigma & Corning, USA)에서 배양시켰다. 섬유모세포를 제거하고 순수한 슈반세포들을 모으기 위해 분열억제제 (antimitotic agent, Cytosine β -D-Arabinofuranoside, Sigma, USA)를 사용하였으며, 그

밖에 자세한 배양 기법은 이미 발표된 문헌 (Lee's culture technique)을 참조하였다^{12,14}.

배양 용기 내의 세포 수는 역광현미경 (inverted microscope, Leica Cambridge Ltd., UK)과 혈구계산관 (hemocytometer)을 이용하였으며, 세포체와 세포핵의 형태를 기준하여 여섯개의 임의 시야 (배울 $\times 100$, 1mm²) 내의 전체 세포 수와 슈반세포 수를 계산하였는데, 오차를 줄이기 위해 고르지 못한 세포나 덩어리로 되어 있는 세포는 제외시켰다. 경계선상의 세포는 한번씩만 계산하였고 동일한 연구자가 3회 산정하여 평균치를 산정하였으며, 계산된 세포수에 10,000배를 해서 1 ml 안의 세포수를 구하였다.

1-2. 3차원 슈반 세포 배양 (Three-dimensional Schwann cell culture)

13 mm 직경의 소독된 커버글라스에 20-30 μ l의 세포외기질 겔 (GFR Matrigel®, BD Biosciences, USA)을 얇게 깔아준 후, 미리 얼려 둔 피펫 (precooled pipett)을 이용하여 얇은 막을 형성하도록 한 후, 척수후근절로부터 채취된 조직을 바로 조심스럽게 배양 (plated)하였다. 배양 용기내의 커버글라스 (coverslip in 35-mm Petri dishes)를 37°C, 95% air / 5% CO₂ 배양기에서 15분간 두어 매트리지엘®이 고체화되도록 한 후, 주배양액 2ml를 이용하여 부유 배양 (cultured in rafting fashion) 하고, 이후 2주간 상기의 일차 세포 배양과 같은 방법으로 배양하였다^{12,15}.

이와 같이 위의 1-1 방법과 같은 평면 배양과 3차원 배양법을 나누어 진행하였는데, 특히 3차원 배양한 매트리지엘®로 3 μ m 크기의 조직 절편을 만들어서 1, 2, 3 주간 각각 H&E 염색과 S100 항체 (rabbit, 1:100, Dako, Denmark) 및 GFAP (glial fibril acidic protein) 항체 (rabbit, 1:100, Pharmingen, USA)를 이용한 면역세포화학 염색을 통하여 배양 기간에 따른 슈반세포 순도와 밀도를 평가하였다. 면역세포화학 염색은 PAP 간접법을 시행했는데, 간략히 살펴보면, pH 7.4의 PBS에서 재수화 시킨 후, 30분간 0.6% 과산화수소로 배양하여 내산화 성분을 비활성화 시킨 후, 1:50의 정상 돼지 혈청으로 비특이 환경을 없애준 다음 각각 1시간 동안 rabbit polyclonal S-100 항체와 rabbit polyclonal GFAP 항체와 같은 일차 항체를 반응시켰다. 이차 항체 (horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody)를 1시간 동안 반응시키고, 마지막으로 염화벤질 염화수소 발색제 (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride chromogen, DAB, Dako, Denmark)로 10분간 배양시키고 10배 희석된 헤마톡시린으로 8분간 역염색하였다¹⁵.

컴퓨터 분석영상 장치 (ImageTool® computer analysis image system)를 이용해 면역 반응에서 양성을 보인 세포들을 세었는데, 각 실험군에서 최소 3회 이상 세어서 평균값을 산정하였다. 3차원 배양한 실험군에서는 배양 2주째 S-100 염색된 세포가 72% (86 \pm 7.9 $\times 10^6$ /ml)로 1주의 13%, 3주의 70%보다 많이 척수후근절과 같이 매트리지엘®을 채운 실리콘 도관을 바로 체외 배양 한 본 연구의 기본 배양 기간을 2주로 정하였다.

1-3. 3차원 배양된 슈반 세포 도관의 제작 (Fabrication of three-dimensionally cultured Schwann cell conduit)

a. 실리콘 도관의 변형 제작

신경 연결 도관으로 어느 정도 유연한 성질을 지닌 실리콘 도관 (I.D. 1.98 mm, 14 mm length, SF Medical, USA)을 선택하였다¹⁶⁻¹⁹. 단면 (cross-sectional view)으로 1/4 상부 부위를 수평으로 잘라서 아래 3/4 크기만 남도록 제작하였다 (Fig. 2). 이렇게 자른 부분을 통해서 매트리지젤®을 도관 내에 넣을 수 있고 그 위에 바로 척수 후근절을 배양할 수 있었으며, 무엇보다도 생체 조직 내에서 영양 공급이 가능할 수 있을 것으로 예측할 수 있었다. 이렇게 제작된 도관을 30분간 75% 에탄올에서 소독한 후 pH 7.4의 PBS로 3회 세척하고 산화 에틸렌 (ethylene oxide)으로 가스 소독하였다.

b. 매트리지젤® 층 형성 및 척수 후근절 배양 (Matrigel® loading and DRG plating)

영하 20°C 냉동고에서 준비된 매트리지젤® (laminin [61%], collagen IV [30%], entactin [7%], EHS mouse tumor, BD Biosciences, USA)을 사용 하루 전에 4°C에서 얼음 위에서 액화시킨 후, 매트리지젤® 0.2 - 0.3 ml를 미리 차갑게 한 피펫을 이용하여 균일하게 실리콘 도관 위에 미리 잘라 놓은 상단부까지 차도록 채웠으나, 추후 동물 이식 수술시 봉합되는 부위인 도관의 양쪽 끝 2 mm씩은 남겨 두었다. 대략 백서 두 마리에서 얻을 수 있는 40 내지 50개의 척수 후근절을 한 도관 내의 매트리지젤® 위에 바로 배양하였는데, 배양이 끝난 후 바로 37°C 배양기에 1시간 동안 두어서 고체화되도록 하였다.

c. 신경 도관의 3차원 배양 (Three-dimensional culture of nerve conduit)

매트리지젤 도관 내에 놓여진 척수 후근절을 조직 배양 용기 내의 다공성 막 (the porous filter membrane [Nunc 25 mm Tissue culture inserts, 3.0µm, Polycarbonate membrane, USA]) 위에서 부유 배양하였는데, 주배양액인 M-10용액 1ml를 배양 용기 중심부에 도관 단면의 3/4 부분이 넘지 않도록 넣어 주었으며, 배양 용기가 건조해 지지 않도록 바깥쪽 부위에도 넣어 주었다 (Fig. 3). 배양 용기는 이미 기술한 바와 같이 37°C, 95% air / 5% CO₂ 배양기에서 2주간 배양하였다¹²⁻¹⁵.

2. 실험 동물 준비 및 신경 도관 이식 수술

250-300g 정도의 수컷 백서 (Sprague-Dawley rats)들을 최소 실험 7일 전부터 12시간 주기로 자유롭게 물과 먹을 것들을 주면서 서울대학교 치과대학 및 강릉대학교의 동물 실험 가이드라인에 따라 사육과 실험을 진행하였다. 전체 18마리의 백서를 대조군, 실험군 그리고 정상비교군 (sham group)으로 각각 6마리씩 나누었는데, 실험군은 2주간 매트리지젤®을 채운 실리콘 도관에서 키운 척수 후근절을 백서 좌골신경에 이식한 군으로 3차원 이식군 (3D conduit group)으로 했다. 한 마리의 신생 백서에서 얻을 수

있는 척수 후근절은 20-25 개 정도여서, 두 마리에서 얻을 수 있는 40-45 개의 척수 후근절을 기본적으로 하나의 도관에 이식하는 것으로 정량화했다. 그리고 대조군에서는 10마리의 신생 백서에서 2주간 배양해서 얻을 수 있는 슈반 세포를 ($9.66 \pm 9.6 \times 10^6$ /ml 개¹²⁻¹³) 5등분하여 하나의 도관당 $1.93 \pm 1.8 \times 10^6$ /ml 개의 슈반 세포가 매트리지젤®과 섞이도록 혼합하여 실리콘 도관에 이식하여 2차원 도관군 (2D conduit group)으로 하였다. 썸군은 단지 좌골 신경을 노출시킨 후 어떤 처치도 하지 않은 상태로 그대로 봉합해 주었다 (Fig. 4).

케타민 (60mg/kg, ketamine hydrochloride, Yuhan Co., Korea) 과 럽폰 (3mg/kg, xylazine hydrochloride, Bayer Korea Ltd., Korea)을 4:1의 비율로 섞어 복강내 주사하여 동물을 마취한 다음 좌측 등 및 뒷 부위를 제모하고 베타딘으로 소독한 후 둔부 근육 절개 (gluteal muscle splitting incision)를 통해 좌골 신경의 분지부를 노출시키고^{20,21}, 5 mm의 좌골 신경을 절제하였다. 이때 필요하면 추후 이식 신경 도관이 최소한으로 움직이도록 좌골 신경의 근심부를 둔부 근육에 5-0 나일론을 이용해서 고정시켰다. 좌골신경은 미세현미경 하에서 좌골 절흔 (sciatic notch)으로부터 5 mm 원심부까지 미세하게 박리하여 9/0 나일론 (Ailee Co., Korea)으로 두 군데 신경외피 봉합 (two epineurial sutures)을 통해 신경 도관을 이식하였다. 절제된 좌골 신경의 근원심부 2.0 mm 부분이 직접 신경 도관의 매트리지젤®과 접하도록 하여 중간에 빈 공간이 생기지 않도록 하였으며, 피브린 접착제 (fibrin glue, Greenplast, 녹십자, Noksybja PBM Co., Korea)를 이용해서 도관 주변부가 고정되도록 하였다. 둔부 근육들은 5-0 바이크릴 (Johnson & Johnson Co., USA)을 이용하여 봉합하였고 이때 이식한 신경 도관이 움직이지 않는 것을 확인하였으며, 백서 피부는 4-0 나일론 (Ailee Co., Korea)을 이용하여 봉합하였다. 실험 후, 동물들은 마취제에서 회복될 때까지 각각 케이지 안에서 따뜻하게 유지시켰으며, 깨어난 후에는 충분한 수분과 먹을 것들을 주었다. 술후 동통 감소를 위해 타라신 (Tarasyn, 2mg/kg, ketorolac tromethamine, Yuhan Co., Korea)과 감염 방지를 위해 이세파신 (Icepacin 1.5mg/kg, icupamicin sulfate, Yuhan Co., Korea)를 각각 3일간 피하 주사하였으며, Cyclosporin A (CsA, 100mg/ml, Novartis, USA)를 1주일간 경구 투여하여 (20mg CsA mixed with olive oil) 이식에 대한 면역 거부 반응을 억제하였다.

3. 평가 (Assessment)

3-1. 좌골 신경 기능 지수와 발목 관절 보행각을 이용한 기능 평가 (Functional assessment using SFI and angle stance angle [ASA])

수술 12주째, 모든 실험 동물에서 주행로 분석 (walking track analysis)을 시행하였는데, 백서의 뒷 족부 (hind feet)에 잉크를 묻히고 80 × 10 cm 길이의 어두운 주행로를 걸게 해서 다음과 같이 4가지 길이를 확인하였다. TS (Toe Spread): the distance between first and fifth toes, IT (Intermediate Toe spread): the dis-

tance between the second and fourth toes, PL (Print length): the distance between the third toe and the hind pad, TOF, the orthogonal distance from the third toe of one paw to the hind pad of the contra lateral paw^{22,25}. 이 중 TOF 측정은 3-4 차례 반복하여 평균값을 구하였으며, 모든 측정값은 수술하지 않은 오른쪽 [NTS, NIT and NPL]과 수술한 부위인 왼쪽 (operated foot [ETS, EIT and EPL])에 대해서 구하였고, 이렇게 구한 측정값은 좌골신경 기능 지수를 구하기 위해 아래와 같은 식에 대입하였다:

$$SFI = (-38.3 \times PLF) + (109.5 \times TSF) + (13.3 \times ITF) - 8.8$$

$$PLF = (EPL-NPL)/NPL, TSF = (ETS-NTS)/NTS, ITF = (EIT-NIT)/NIT$$

이때 정상인 백서에서 구한 기능 지수 (interpolating identical values) 값은 0 에 가깝게 나오게 된다.

고해상도의 비디오 분석기를 개인컴퓨터에 연결하여 역동적인 보행 모습을 관찰하였는데, 컴퓨터에 연결된 비디오에서는 Scion Image[®] (Scion Corp., USA) 프로그램을 이용해서 화면을 순간적으로 포착하여 디지털 이미지를 얻도록 하였다. 여러 보행 지수 중에서 예민도와 재현성이 우수한 발목관절 보행각 (ankle stance angle [ASA]) 값을 측정하였는데^{23,24}, 발목관절 보행각은 보행중간 단계 (mid-stance phase of the step cycle)에서, 하지 선 (shank line) 및 4번째 족부 골 (head of the fourth metatarsal)과 발목 (lateral malleolus)이 이루는 선이 이루는 각도로 측정할 수 있으며 (Fig. 6), 바닥에서 처음 띄기 시작한 보행 (first began to walk) 및 중간에 멈춰선 (stopped walking) 경우는 제외하였고 매 개체마다 세 번의 측정값의 평균치를 구하였다. 이처럼 보행 및 주행 검사 값은 모두 3회 이상씩 측정하여 엑셀 프로그램[®] (Microsoft(R) Excel 2000, USA)을 이용하여 각각의 평균값 및 표준 편차 값을 구하였다.

3-2. 광학 및 전자 현미경 평가

a. 면역조직화학 염색 평가 (Immunohistochemical study)

상기의 기능검사가 종료되면 동물을 희생시키고 이식부를 채취하여 도관 단면을 잘라 3 μ m 두께의 절편을 만들어서 도관의 가운데 부분(mid-portion of conduit)을 상기 1-2 방법과 같이 면역조직화학 염색을 시행하였다.

b. 수초화 정도 및 축삭 돌기 수 평가

수초화된 신경 섬유와 축삭 돌기 (myelinated axons) 정도를 알아보기 위해 Luxol Fast Blue (LFB, Acros Organics, USA) 염색을 시행했다. 부유 냉동 절편기 (Freely floating cryostat)를 이용해서 20 μ m 절편으로 자른후 PBS 에서 씻고 70%, 80%, 그리고 96% 에탄올에서 차례대로 옮긴 후 0.1% LFB 및 0.05% 아세톤 처리를 한다. 56 $^{\circ}$ C에서 하루 저녁 염색한 후, 증류수에 씻어서 PBS를 거친 후 0.05% aqueous lithium carbonate (Showa Chemicals Inc, Japan)처리를 하고 70% 에탄올 처리한 후 일반적인 마운팅하기 전 식염수로 씻고 탈수하였다. 반대 염색을 위해서 증류수에서 두 번 닦아낸 후 아세테이트 완충액 내의 cresyl violet (Acros Organics, USA)용액에서 30분간 둔 후, 역시 두 번 증류수에 세척하고 에탄올에서 차

례대로 탈수한 후 Entellan처리를 하였다^{26,27}. 수초층은 파랑색으로 염색되며 신경 세포들은 분홍이나 보라색으로 염색되게 된다.

수초화된 축삭 돌기를 평가한 후 신경 도관 조직을 2.5% glutaraldehyde 용액에 고정하여 2% osmium tetra-oxide (Polysciences, USA)처리를 하고, epon resin으로 포매하여 1 μ m 두께로 초미세절편기 (ultramicrotome)로 자른 후 toluidine blue 염색하였다²⁸. 영상 분석기(ImageTool[®], Version 2.0 Alpha 3 [patch level 1], USA)를 통해 컴퓨터 (Safer ASUS L3[®], ASUS Co., Korea)상에서 Toluidine blue 염색을 통해 수초화되거나 수초화되지 않은 조직들과 전체 슈반 세포들을 분석하였다.

c. 주사전자현미경 평가

초미세조직 절편 (ultrathin sections)들을 300-mesh copper/rhodium grids 위에서 5% uranyl acetate 용액으로 염색한 후, 5분간 70% 메탄올 처리 후, 건조시켜서, 5분간 lead citrate로 반대 염색한 후 다시 건조시켜서 주사전자현미경 (Zeiss EM 10CR, Germany)으로 재생된 신경의 미세구조를 관찰하였다^{11,29}.

d. 좌골 신경 지배 조직들에 대한 조직형태학적 평가 (Histomorphologic observation of sciatic nerve innervation tissue)

보행 검사후, 비복근 (gastrocnemius muscle) 및 대퇴이두건 (biceps femoris tendon)을 채취하여 H&E 염색을 통해 세포 형태 및 섬유화 (fibrosis) 정도, 지방화 변성 (fatty degeneration) 정도를 평가하였으며, 동시에 하지 및 족부의 피부 (leg and plantar skins)와 비골 (fibular bone)도 조직 검사하여 각 군간의 조직형태학적 비교를 시행하였다.

4. 통계 분석

평면 배양 및 3차원 배양에서 얻어진 모든 정량적인 결과는 통계 프로그램 (SPSS R10.0.7, SPSS Inc.)의 Student's t-test를 이용하여 유의성을 검증하였으며, 각 군간의 비교정량적 차이 (semiquantitative differences)를 비교하기 위해 Mann-Whitney U-test를 이용했다. 유의 수준은 5%로 p-value는 0.05보다 작은 것만을 유의성 있는 것으로 택하였다.

III. 결 과

체외 배양한 슈반 세포의 순도 및 밀도 확인

2주간 평면 배양후에 세포들의 분화 및 증식 상은 두 가지 형태로 관찰되었는데 (Fig. 7-a, b), 슈반세포는 긴 양극성 (long bipolar) 또는 삼극성 (tripolar)의 돌기를 지니고 타원형의 핵 (oval nucleus)을 지닌 방추형 (spindle-shaped)의 세포 모양을 가졌으며, 상대적으로 섬유모세포는 크고 둥근 모양의 핵과 뭉툭한 세포돌기를 지닌 편평한 다원형 (flattened polygonal shape)의 모양을 가진 것으로 형태적으로 나누었다. 이처럼 세포 형태로 구분한 결과 슈반 세포의 순도는 2주배양에서 9.66 \pm 9.6 \times 10⁶/ml 개로 산정되었다.

세포외기질에서 배양한 3차원 배양에서는, 슈반 세포가 충분한 분화를 보이며 젤 내의 표층에서 심부쪽으로 깊게 위치하며 증식한 모양을 볼 수 있었는데, 2주 뒤 연속 절편을 만들어서 3회 이상 세포 수를 셈하여 평균값으로 산정한 결과 400배의 컴퓨터 영상에서 H&E 염색에서 343.62 ± 12.5 개, S-100 면역 염색에서 193.21 ± 9.4 개 (전체 세포수에 대해 56.22%), GFAP 면역 염색에서 228.4 ± 14.7 개 (전체 세포수에 대해 66.46%)의 세포수를 보였다(Fig. 8-a, b, c). 따라서 슈반세포의 평균 수는 3차원 배양에서 $86 \pm 7.9 \times 10^5/\text{ml}$ 개로 산정되었으며 평면 배양에서와 같이 전체적인 난원형 (oval shaped)의 세포 모양과 양극성의 세포 돌기 (bipolar extensions)를 가지는 모양이었다. 결과적으로, 3차원 배양에서는 세포들이 다층 (multiplayer)으로 분포되었는데, 다른 일련의 실험 과정에서 척수후근절을 잘게 썰지 않고 통째로 직접 배양 (directly plated DRG)시킨 방법이 다른 일반적인 슈반 세포를 미리 평면 배양해서 3차원화시킨 방법보다 우수한 결과를 확인할 수 있었으며, 배양 기간에 있어서는 2주간 배양한 뒤의 S-100염색된 세포 수가 72% ($86 \pm 7.9 \times 10^5/\text{ml}$)로, 1주 뒤의 13%, 3주 뒤의 70%보다 가장 많음도 확인할 수 있었다. 이런 결과를 바탕으로 체외에서 2주간 3차원 배양한 슈반 세포를 본 실험에서 선택했으며, 3차원 배양된 신경 도관에서의 슈반 세포 밀도 역시 2주 뒤에 10^6 cells/ml개로 산정하여 실험을 진행할 수 있었다.

1. 3차원 배양된 슈반 세포 도관 평가 (Evaluation of three-dimensionally cultured Schwann cell conduit)

2-1. 주행로 분석 및 보행 분석을 통한 기능 평가

이식 12주 제 측정된 좌골신경지수는 실험군에서 -60.1 ± 13.9 (n=5), 대조군에서 -87.0 ± 12.9 (n=4)로 실험군에서 기능 회복이 양호한 것 처럼 보였으나 통계적으로 유의성은 없었다 (Table 1).

Table 1. Comparison of Sciatic Function Index (SFI) and Ankle Stance Angle (ASA), after 12 weeks

	SFI	ASA (degrees ^o) [*]
Sham	17.4 ± 12.6	45.4 ± 8.8
Control	-87.0 ± 12.9	32.2 ± 4.8
Experimental	-60.1 ± 13.9	37.9 ± 5.4

* p < 0.05

SFI : $(-38.3 \times \text{PLF}) + (109.5 \times \text{TSF}) + (13.3 \times \text{ITF}) - 8.8$

PLF = (EPL-NPL)/NPL, TSF = (ETS-NTS)/NTS,

ITF = (EIT-NIT)/NIT

TS : Toe Spread, IT : Intermediate Toe spread,

PL : Print length, the operated foot : ETS, EIT and EPL, non-operated foot : NTS, NIT and NPL

ASA : At the mid-stance phase of the step cycle, formed by two lines, one referring to the shank and another connecting the lateral malleolus and the head of the fourth metatarsal bone.

발목관절 보행각은 조절군에서 $32.2^\circ \pm 4.8^\circ$ (n=4), 실험군에서 $37.9^\circ \pm 5.4^\circ$ (n=5)로 두 군간에 유의한 차이를 보였는데, 측정값을 Fig. 6과 Table 1에서 정리하였다.

2-2. 이식 도관 단면의 조직형태학적 분석 (Histomorphologic analysis of cross-sectional nerve conduit)

이식한 신경 도관의 단면을 S-100과 GFAP를 통한 면역조직화학염색에서는 실험군에서 대조군에 비해 보다 많은 세포외콜라겐기질과 양성 반응을 보이는 세포들이 관찰되었다 (Fig. 9). 수초화된 축삭돌기 섬유들도 LFB염색에서 강한 양성 반응을 보였는데 (Fig. 10), 신경 섬유들은 거의 대부분 분홍빛이나 보라색으로 cresyl violet 염색 반응을 보였다. 실험군에서 강한 푸른 빛의 양성 반응을 보였는데, 대조군에서 보다 수초화된 축삭돌기가 많이 증식된 것을 알 수 있었다. 또한, 신경 도관 중심부의 toluidine blue 염색에서 수초화된 정도와 재생된 축삭 돌기의 수를 셀 수 있었는데 (Fig. 11), 전체 축삭 돌기 수에서 통계적 유의성이 관찰되었으며 (Table 2), 실험군에서 $44.91\% \pm 0.13\%$ 의 수초화된 축삭 돌기가 관찰되었다. 정상비교군 (Sham group)의 단면에서는 반흔 조직 없이 정상적인 신경외피 (perineurium)가 관찰되었는데, 상대적으로 실험군의 신경외피는 약간 변형된 모습을 보였고 수초화된 축삭돌기와 신경내 혈관들도 정상비교군에 비해서는 적은 수를 보였으나, 고해상도 관찰에서는 재형성된 혈관 조직들의 분포와 잘 수초화된 섬유들의 양상이 사못 정상비교군에 근접한 양상을 관찰할 수 있었다. 반면, 대조군에서는 적은 혈관들과 변성된 신경 섬유들과 수초화된 축삭 돌기들도 크기가 작고 수도 적은 것을 볼 수 있었다 (Fig. 11).

수초화 지수 (Myelination index [MI]) 는 수초화된 정도를 전체 축삭 돌기의 수에 대한 비율 (ratio of myelin to axon surface area) 로 정의할 수 있는데, 대조군과 실험군에서의 수초화 지수는 각각 0.1648, 0.3007로, 실험군에서 두 배 가까이 큰 수초화 정도를 보여 주었다.

전자현미경 소견에서는 정상비교군의 좌골 신경 단면들은 슈반세포와 세포외기질들이 균일하게 배열된 잘 수초화된 신경 섬유들로 채워져 있었으며 (Fig. 12-a), 실험군에서는 비교적 덜 균일화 (disorganized)되고 두터워진 세포외 콜라겐 (thickened extracellular collagen)과 작은 슈반세포들이 많고, 얇게 수초화된 신경 섬유들이 많이 관찰되었는데 (Fig. 12-b), 특히 실험군의 원심부 단면에서는 왈리 변성으로 보여지는 림프구 침윤과 작은 수초 섬유들이 많이 관찰되었다 (Fig. 12-c).

2-3. 좌골 신경 지배 조직들의 조직 형태학적 비교

비복근과 대퇴이두건의 조직 형태적 비교에서는 정상비교군의 비복근 단면에서 세포 주변부에 핵이 분포된 뾰뾰한 근육 섬유들이 관찰된 반면, 실험군 및 대조군에서는 전반적인 섬유화가 증가되고 지방 침윤이 많아진 근육 위축 현상이 보였는데 특히, 대조군에서 더 심한 양상을 보였다 (Fig. 13-14).

Table 2. Comparisons of Axon counts

	Total Axons	Myelinated axons	Unmyelinated axons
Sham	850 ± 47.2	452 ± 38.4	332 ± 35.9
Control	358 ± 29.0 (42.1 ± 1.84%)	59 ± 19.0 (13.05 ± 1.95%)	274 ± 24.3
Experimental	675 ± 49.5 (79.4 ± 1.35%)	203 ± 17.4 (44.91 ± 0.13%)	489 ± 42.8

All data were counted using an image analyzer (ImageTool[®]) and significant ($p < 0.05$).

The % calculation was the ratio to sham group count.

각 군의 비골도 탈회하여 조직형태적인 분석을 시행하였는데 각 군간의 확실한 차이는 관찰할 수 없었으나, 정상비교군에 비해 실험군에서 약간 다른 골소주 (bone marrow) 형태 및 골밀도 감소가 보였다. 실험군의 족부 피부도 정상비교군에 비해 약간 위축된 조직 소견을 보였으나 역시 명확한 구분은 하기 어려웠다.

IV. 고 찰

말초 신경 재생은 신경영양 인자 (neurotrophic factors)를 포함하는 세포외기질 단백질과 신경관련 세포나 슈반세포와 같은 세포 성분간의 상호 작용에 의해 이루어지게 된다. 이중 슈반세포는 손상된 신경의 재생을 위해 필요한 환경 조성 (permissive climate)을 위해 반드시 필요한 역할을 담당하는데, 초기 신경 재생시 절단된 축삭의 공간에서 세포분열을 시작하게 된다^{2,30}. 말초 신경 손상시 손상된 축삭 돌기의 원심부는 변성 (degenerated)되기 시작하나 슈반세포와 기저막 (basal lamina)은 그대로 남게 되어 이 Buengner bands라 불리는 기저막을 통해 슈반세포가 성장하여 새로운 신경관이나 축삭을 만들게 되는데, 이런 과정이 신경 재생시 재생장에 반드시 필요한 필수적 단계가 된다^{31,32}.

세포 증식이 서서히 일어나고 새로 분화되기 시작하면서 이런 세포들은 신경성장인자 (nerve growth factor [NGF]), 뇌기원신경 영양인자 (brain-derived neurotrophic factor [BDNF]), 섬모신경 영양인자 (ciliary neurotrophic factor [CNTF]) 등과 같은 많은 영양 인자들 (trophic factors)을 분비하게 되며, 4형 콜라겐 (type IV collagen)과 라미닌 (laminin) 같은 세포외기질 분자들 (ECM molecules)을 합성하여 방출하게 되는데, 이러한 성분들이 신경 외성장 (neurite outgrowth)을 조절하여서 수초를 형성하고 이렇게 형성된 수초 등이 신경 자극 전달을 빠르게 촉진하며 많은 세포 부착물질들 (cell adhesion molecules [CAMs])을 만들게 된다. 이와 같이 여러 성분들이 신경이 새로이 생존하고 축삭 돌기가 재생하는 것을 돕게 된다^{11,33,34}. 따라서, 본 연구에서는 세포외기질내에 슈반세포를 3차원적으로 배양하여 신경 축삭 돌기들이 재생되면서 여러 신경 성장 인자들을 방출하는 것을 유도하는 효과를

촉진하여 세포의 증식을 돕도록 고안하였다.

슈반세포를 포함한 신경 재생시 필요한 여러 세포들은 그들 나름대로의 유전적인 조절 (intrinsic genetic programs)과 세포외 환경에 의해 영향받게 되는데, 여러 세포들과 세포외기질 등이 세포외 환경의 주요 구성 성분이라 할 수 있다. 이 실험에서는 라미닌 젤인 매트리지엘[®]을 세포외기질로 사용했는데 이 기질 내의 단백질이나 당단백 분자들 (protein and proteoglycan macromolecules)은 신경 세포들의 이주와 축삭 돌기가 성장하는 것을 유도하는 것을 조절하는 3차원적인 경로를 제공하게 된다. 매트리지엘[®]은 Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) mouse 육종에서 채취할 수 있는 용해성 기저막 기질 (solubilized basement membrane matrix)로서 신경 세포, 간세포들 (hepatocytes), Sertoli cells, 유선상피세포 (mammary epithelial cells), 흑색종세포 (melanoma cells), 혈관내피 세포 (vascular endothelial cells), 갑상선 세포들 (thyroid cells), 그리고 모낭세포 (hair follicle cells) 등이 잘 자랄 수 있는 좋은 환경을 제공하는 것으로 알려져 있다^{11,33,35,36}. 성장 인자 성분이 최소화된 매트리지엘[®] (growth factor reduced [GFR] Matrigel[®])의 주요 성분으로는 라미닌 (laminin, 61%), 4형 콜라겐 (collagen IV, 30%), 엔탁틴 (entactin, 7%), 황헤파린 당단백 (heparin sulfate proteoglycan, HSPG) 등이며, 또한 TGF- β , FGF (fibroblast growth factor), TPA (tissue plasminogen activator) 및 여러 성장 인자들을 포함하고, 부착 의존성 특징을 지닌다³⁶. BD 매트리지엘[®] (BD Matrigel[®])이라 불리는 다른 형의 젤은 또한, 라미닌 56%, 4형 콜라겐 31%, 엔탁틴 8% 등으로 구성되며 GFR 매트리지엘[®]보다 많은 성장 인자들을 지니게 되나, 이번 연구에서는 세포외기질내의 여러 영양 인자들의 효과를 최소화하기 위해 GFR 매트리지엘[®]을 선택하였다.

최근 들어 라미닌이나 4형 콜라겐은 신경 세포의 축삭 성장 (axonal growth)을 유도하나, HSPG는 상대적으로 억제하는 기능을 지닌다고 보고되고 있다. 매트리지엘[®]내의 대부분의 성분들이 축삭 성장을 돕고 슈반 세포를 분화시키는데 기여한다고 알려져 있으나 그 중 라미닌 성분이 가장 중요한 것으로 여겨지는데, 라미닌은 4형 콜라겐 및 세포면 수용기인 인테그린 (integrins)으로 매개되어 상피 세포 및 신경 세포의 성장에 필요한 부착 물질들에 결합하는 당단백으로서 특히 이번 연구에서처럼 3차원 배양에 중요한 것으로 알려져 있다. 다른 콜라겐과 마찬가지로 4형 콜라겐은 신경 도관의 형태를 지지하는 골격으로서 중요한 기저막의 기본 성분으로서 헤파린이나 HSPG에 결합하는 능력을 지닌다. 엔탁틴은 니도겐 (nidogen)으로도 불리우며 4형 콜라겐과 라미닌, 칼슘 사이의 강력한 결합을 매개하는 기저막 성분으로 알려져 있으며, 15 nm 길이의 막대형 또는 유연적인 연결부를 지닌 세 개의 globular domains으로 구성되어 있는 148 kDa의 단일 폴리펩타이드이다. HSPG는 음성 전하를 띠는 거대물질의 기저막 통과를 억제하는 등의 통과막 (permeability barrier)의 기능을 하는 음전하를 띠는 물질로 전술한 바와 같이 최근에는 축삭 돌기의 재생을 억제하는 역할을 하는 것으로 알려지고 있다^{35,36}.

뉴우런이나 슈반세포에서 나오는 여러 새로운 세포외기질 물질들이 신호 전달 과정을 조절함으로써 많은 신경전달물질과 영양 인자들의 분화를 촉진하여 수초화된 축삭들의 성장을 유도하

게 된다. 이러한 과정은 “synaptic plasticity”라 말할 수 있는데 최근 한 연구에서는 이러한 시냅스 연결부 전달의 효율이 고정된 것이 아니고 여러 활동적인 형태 (activity-dependent manner)에 따라 다양하게 변할 수 있는 것으로 보고되고 있다³⁷⁾.

최근 들어, 여러 신경 관련 연구에서 3차원 기질내의 세포 수 계산이 사용되고 뉴우런 등의 ‘unbiased’ 한 계산법이 소개 되었다. 본 연구에서는 혈구계산판이나 ImageTool[®] 프로그램과 같은 2차원적인 세포수 계산법을 사용했는데, 이와 같은 2차원적인 계산법이 다분히 ‘assumption-based’여서 부정확한 결과를 가져 온다는 보고도 있다^{38,39)}. 본 연구에서도 3차원적인 세포 수 산정이 가능하였으나, 3 μ m 두께의 조직 절편 슬라이드를 만드는 것이 충분히 가능하였기에 보다 과학적으로 정확할 수 있다 (more scientifically accurate estimates)는 근거에 준하여 2차원적인 세포수 산정을 시도하였다. 2주간 체외 배양한 슈반 세포의 순도는 $9.66 \pm 9.6 \times 10^6$ /ml 개였는데 세포의 형태로만 평가한 것으로, 슈반 세포는 긴 양극성 또는 삼극성의 돌기를 지니고 타원형의 핵을 지닌 방추형의 세포 모양을 가진 반면, 섬유모세포는 크고 둥근 모양의 핵과 몽통한 세포돌기를 지닌 편평한 다원형의 모양을 가진 것으로 구분하였다^{12,40)}.

백서의 척수후근절에서 슈반세포를 배양하기 위해 평면 배양 또는 3차원 배양에서 분열 억제제 처리와 효소 처리를 하는 효과적인 방법들은 이미 보고된 다른 연구에서와 같다^{12,19)}. 그리고, 3차원 체외 배양에서 얻어진 전체 세포수는 400배 확대한 컴퓨터 분석 프로그램에서 H&E 염색에서 343.62 ± 12.5 개, S-100 면역염색에서 193.2 ± 19.4 (56.22%)개, GFAP 면역염색에서 228.4 ± 14.7 (66.46%)개를 보였는데 (Fig. 8), 특히, GFAP 양성 반응을 보인 세포가 66.46%까지 증가된 것은 정상교전구 세포 (astroglial precursor cells)가 초기 2주내에 빠르게 분화하는 것을 설명해 준다. 즉, 초기 신경발생 시기 (initial neuronal stage) 에는 많은 전구세포와 미분화된 교세포들 (undifferentiated glial cells)이 말초 슈반세포 분화를 촉진시키게 되는데 성장한 다형성 수상세포들 (adult oligodendrocyte precursor cells [OPCs])은 중추 신경계 (CNS) 의 교세포의 5-8% 를 이루게 되며 이런 교세포 돌기들이 란비에 노드 (Ranvier nodes)와 접하면서 많은 시냅스를 이루게 된다⁴¹⁾. 척수 후근절에서 발생한 세포들은 슈반 세포, 교세포 및 성인 다형성 수상세포 등과 같이 다양한 뉴우런 관련 세포 등으로 분화하는데 비해, 교세포들은 대부분 슈반 세포로만 분화하게 되며 다른 형태의 세포로는 적게 분화하게 된다.

중추신경계 (CNS)에서는 다형성 수상세포 (oligodendrocytes)에 의해, 말초신경계 (PNS) 에서는 슈반 세포에 의해 만들어지는 수초는 수초 형성 교세포 (myelin-forming glial cells)와 관련된 축삭들 (target axons)간의 상호 신호로 밀접히 조절되어지는 것으로 알려져 있다^{42,43)}. 신경영양분 (Neurotrophins)이 p75NTR에 결합함으로써 슈반세포가 수초를 만들기 시작하는 양성 신호 (positive signal)로서 인지되는데, 수초화되거나 또는 수초화되지 않은 슈반 세포들은 모두 슈반 세포 전구체 (Schwann cell precursor)인 중간세포형을 통해 신경능 (neural crest) 조직에서 기원하게 된다. 슈반 세포와 전구체 역시 초기 신경 발달에 있어 세포 분화와

생존에 영향을 미치는 발육성 사인 (developmental signals)을 표시하는데 중요하데, 슈반세포 전구체의 생존과 성장은 신경성 기원의 사인 (neuronally derived signal)인 β neuregulin과 다른 요소들과 복합된 endothelins 등에 의해 이루어져서 전구체의 성숙 시기를 조절하고 슈반세포가 성장하는데 주요 역할을 담당한다⁴⁴⁾.

신경 결손 수복 12주 후 각 군의 신경 도관의 중간부 단면에서 재생 신경의 수초 축삭 돌기 등을 평가한 결과, 혈관과 신경속의 분포가 달랐으며 (Fig. 11), 전체 축삭 수 (total axon count)에서도 통계적인 유의성을 보였다 (Table 2). 전자현미경 소견에서는 정상비교군의 좌골 신경 단면들은 정상적인 신경중피 (perineurium)와 슈반세포와 세포의 콜라겐 기질들이 균일하게 배열된 잘 수초화된 신경 섬유들로 채워져 있었는데, 실험군에서는 신경중피가 약간 파괴되면서 비교적 덜 균일화되고 두터워진 세포의 콜라겐과 작은 슈반 세포들이 많고, 얇게 수초화 신경 섬유들이 많이 관찰되었다 (Fig. 12-b). 비록 고해상도 관찰에서 잘 수초화된 축삭 돌기들이 비교적 풍부한 혈관들과 관찰되기는 했으나 (Fig. 12-c), 수초화 지수에서 확인된 바와 같이 실험군에서의 수초화된 축삭은 정상 대조군의 수초화 정도에는 미치지 못하였다.

정상적인 신경에서는 신경 손상 후 적은 수의 신경내 대식 세포가 존재하게 되나, 수초 변성과 동반되어 슈반 세포가 증식함에 따라 여러 혈관내 대식 세포들이 생기게 된다. 축삭의 연속성이 끊어지면 대식세포가 원심측 신경으로 들어가게 되어 Wallerian 변성이 슈반 포로 채워진 실린더 막 (bands of Buenger)을 따라 일어나게 되며, 이처럼 Wallerian 변성은 많은 대식세포가 생겨 들어오면서부터 시작되어 손상받은 슈반세포들로부터 분비되는 α 종양괴사인자 (TNF- α)에 의해 계속 진행되게 된다⁴⁵⁾. 이처럼 대식세포들이 축삭의 변성과 분절화 (fragmentation)를 유발하게 되고, interleukin-1을 분비하여 슈반세포로 하여금 스스로를 비분화 (dedifferentiate)시키게 하여 수초 형성 능력을 떨어뜨리는 과정을 유도하게 된다^{29,45)}.

분화가 억제되었던 슈반세포가 분화하면서 몇 가지 성장 인자들과 세포외기질 성분들을 많이 분비하면서 축삭 재생을 위한 하나의 스캐폴드로서 역할하게 된다. 축삭과 수초 기질들은 계속 대식세포들에게 탐식되면서 새로이 형성되는 미세 환경들이 새로운 축삭 돌기의 형성을 촉진하여 국소적으로 축삭 돌기의 직경을 넓히고 돌기들이 자라게 만드는데, 비수초화 현상 (demyelination)과 가역적으로 일어나게 된다⁴⁶⁾. 12주 뒤에 재생된 조직들을 관찰해보면 수초화된 축삭을 포함한 전체 축삭이 많이 증가하며 동반하여 많은 혈관들도 생긴 것을 볼 수 있는데, 마찬가지로 신경 수초화 (nerve myelination)와 동반하여 슈반세포들이 교세포성장인자 (glial growth factors, GGFs)와 같은 많은 성장 인자들을 분비하면서 세포외기질내의 여러 환경에 영양을 공급하는 혈관들의 성장을 촉진하는 혈관생성 요소들을 분비한다고 생각할 수 있다⁴⁷⁾. 따라서, 초기 체외 2주간 3차원 배양이 슈반세포의 증식을 위해 필수적이라 사료되며, 특히 이와 같은 다양한 성장 인자들과 관련된 여러 세포들이 함께 자라게끔 하는 것이 중요하다 하겠다. 세포외기질 내의 혈관생성 요소들은 대부분 혈관의 성장을 직접 촉진하지는 않으며 슈반세포나 다른 신경

관련 세포들과 같은 목적 세포 (target cell)를 통하여 간접적으로 자극하게 된다^{17,18}. 가능한 기전이 보다 밝혀져야겠지만 확실한 것은 수초화된 축삭의 증가가 재생 신경의 혈관화와 동반하여 매우 중요한 본 실험의 결과인데, 3차원 배양된 슈반세포의 수초화 형성 능력은 Fig. 10에서와 같이 LFB 염색을 통해 확인할 수 있었다. 우리는 정상 비교군보다는 못하지만 대조군에 비해 실험군에서 보다 우수한 결과를 보였는데^{26,27}, 이러한 결과는 체외 3차원 배양 환경에서 라미닌이나 세포외기질 성분들 및 살아있는 슈반세포들의 활발한 분비가 이루어졌음을 뒷받침한다 하겠다.

축삭과 혈관들을 포함하여 신경계 구조를 구분하기 위한 많은 염색 방법이 있는데⁴⁶⁻⁴⁹, 뉴우런 구분을 위해서는 Olszewski's cresyl echt violet, Einarsen's galloyaniline 과 같은 Nissl body 염색법이 유용하다. 신경 돌기와 신경섬유 (neurofibril) 염색을 위해서는 Bielshwsky's silver impregnation, Bodian's silver proteinate, Holmes' silver impregnation 방법 등이 유용하며, 신경교세포(neuroglial cells) 염색을 위해서는 Weil's cresyl echt violet 염색법, modified phosphotungstic acid-hematoxylin glial fiber staining, Cajal's gold sublimate 염색법 및 Holzer's crystal violet-potassium bromide 염색법이 유용하다. 수초를 구분하기 위해서는 Weigert-Pal's mordant-hematoxylin 염색법이나 Marchi's osmium tetroxide 염색법 또는 LFB 염색법이 흔히 사용되는데^{26,28}, 본 연구에서는 이 중 가장 재현성이 좋으며 예민한 결과를 보이는 것으로 알려져 있는 LFB 염색법을 선택해서 수초층은 푸른색으로 염색되었으며, 다른 교섬유들이나 평활근세포들과 세포핵은 붉은 보라색 (red violet)으로 염색되었다. 또한 LFB 염색법에서는 축삭 돌기와 결합 조직들은 염색되지 않고 남아있기도 하고 콜라겐 덩어리와 같이 혼합되어 불규칙적으로 보이는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 대조군보다 실험군에서 정상 비교군에 비교적 가까운 염색 정도와 색상을 보였는데, 수초층을 형성하기 위한 세포의 기질의 효과와 그 안에서 3차원

배양에 의해 분화된 슈반세포들로부터 분비된 여러 인자들의 효과를 설명하기에 충분한 근거가 될 것으로 사료되었다. 신경 내의 탈수초화 (demyelination)는 세포골격(cytoskeletal elements)에도 변화를 가져오게 되는데, 슈반세포 부족 (depletion)과 저형성된 수초 (poor myelination)들로 축삭의 전송 신호가 느려지거나 감소되어 정상 신경들보다 신경 기능이 회복이 현저히 낮게 된다⁵⁰.

비복근과 대퇴이두근에 대한 조직형태학적 비교 (Fig. 13, 14)에서는 실험군과 대조군 모두 정상비교군에 비해 작고 둥근 근섬유를 보이며 성기고 섬유화된 양상을 보였는데, 특히 대조군에서는 섬유화가 증가하고 지방 변성도 증가한 것을 알 수 있었다 (Fig. 13-b, 14-b). 이러한 결과는 근육과 피부 등이 모두 불용성 위축되어 그 정도는 좌골신경 기능 지수와 연관된다 하겠다. 실험동물의 크기나 조직 검사한 부위의 차이 등 여러 비교상 변수가 고려되어야겠지만, 전술한 바와 같이 수초화 형성 능력이 떨어질수록 축삭의 신호 전달 (axonal transport)은 느려지고, 따라서 그런 신경 도관에서는 보다 약한 활동 전압이 발생하게 되어⁵¹ 재생될 신경 섬유들의 성숙도 또한 떨어져서 관련 근육 등이 위축되

는 것은 분명하다 하겠다. 본 실험에서 각 근간의 비골에 대한 조직 소견을 살펴보았으나 큰 차이점을 발견하지 못했는데, 신경 도관을 통한 비골 골막을 지배하는 비골 신경의 운동 신경 가지와 혈행 등은 충분하였기 때문일 것으로 생각되었으며, 향후 골 밀도와 골 석회화 정도에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료되었다. 좌골 신경 절제후 상피 표피층 두께가 급격히 감소하며 신경이 차단된 피부 (denervated skin)가 종종 건조되고 얇아져서 궤양에 취약해진다고 알려져 있다⁵². 백서 뒷 족부의 피부 역시 좌골 신경 절제후 표층이 40% 정도 얇아진다고 알려져 있는데, 이러한 결핍 변화("trophic" change)를 일으키는 자세한 기전은 확실히 알려져 있지 않다⁵³. 본 연구에서도 실험군, 대조군 간의 족부 피부에 약간의 피부층 두께의 변화는 관찰되었으나, 명확한 차이는 정상 비교군에 비해 관찰되지 않았다.

최근 들어 신경 도관으로 불려지는 신경 유도 채널 (nerve guidance channels)은 생물학적인 재료로 만들어져서 말초신경계 및 중추신경계의 재생을 돕게 되는데, 기존의 단순히 도관 역할을 해왔던 것과 달리 점차 축삭 돌기가 자라나고 반흔 조직이 적어지며 체액성 요소들 (humoral factors)이 많아지는 재생 신경내 환경을 조절하는 역할까지도 담당하게 된다⁵⁴⁻⁵⁶. 처음 실험에서는 다공성인 셀룰로오스 아세테이트 필터 도관 (Millipore®, pore size 0.45 μm, 2.0 mm I.D., Millipore Co, USA)을 이용해서 도관 외부에서부터 영양 공급이 유리하도록 하고 섬유성 조직들이 침투하는 것을 방지하도록 고안했는데, 강도와 균일함이 본 실험 목적에는 부합하지 않았다. Hadlock 등이 PLLA 와 polylactic-co-glycolic acid copolymer 튜브를 사용하거나 다른 여러 연구에서 도관내에 슈반 세포를 이식해서 재생 효과를 관찰한바 있었는데^{56,57}, 본 연구의 초기에는 반다공성인 자체 제작한 PAN/PVC 도관 (Polyacrylonitrile/Polyvinyl chloride copolymer conduit)을 이용해보기도 했으나 너무 견고해서 이식 실험 시 봉합하는 데 어려움이 많았다. 따라서, 본 연구에서는 내경 1.98 mm 실리콘 도관 (Silicon elastomers [SE] conduit)을 사용해서 매트릭셀®을 채우고 그 안에 3차원적으로 슈반 세포를 배양하였다. 14 mm 길이의 신경 도관을 3/4 두께만 남도록 윗 부분을 잘라서 그 윗부분으로 주 배양액인 D-10 배양액이 들어가 슈반세포가 자라는 매트릭셀®의 영양 공급을 돕도록 했다 (Fig. 2).

최근 여러 문헌에서 슈반세포를 포함한 신경도관의 유용성을 보고하고 있는데, 7 mm 간격을 슈반 세포를 넣은 다형성 폴리머 도관 (polymer foam conduits)으로 말초 신경 재생을 증진시킨 보고⁵⁸와 슈반세포와 동시에 교세포성장인자 (glial growth factor)를 넣음으로서 역시 보다 나은 말초 신경 재생 효과를 가져왔다는 보고도 있었다⁵⁹. 이런 연구에 준하여 본 연구에서는 매트릭셀®에 슈반세포를 직접 배양한 14 mm 길이의 실리콘 신경 도관을 고안하게 되었다.

신경 도관을 이식한 후 도관의 양쪽 끝을 피브린 접착제 (fibrin glue)를 이용하여 밀봉하였는데, 피브린 접착제는 피브리노겐 (fibrinogen)과 트롬빈 (thrombin)을 섞은 것으로 주 성분은 혈액 응고와 창상 치유 과정에 필수적이라 알려져 있는 피브린 성분이다. 본 연구에서는 녹십자사의 그린플라스트® (Greenplast,

NoksybjaPBM Co., Korea) 제제를 사용했는데, 피브린 접착제는 세포 이식 (cell transplantation) 시 주요한 생물학적 매개체 (biological vehicle) 역할을 하는데 특히 신경 세포를 포함하여 여러 다양한 세포와 조직의 결합 능력 (binding capacity)과 생체 친화성 (biocompatibility) 등을 지니는 것으로 알려져 있다. 특히 성분 중 하나인 피브린-안정 요소 (fibrin-stabilizing factor) XIII는 아직 미분화된 줄기 세포 (undifferentiated mesenchymal stem cells)를 고도의 교차 구조 (highly cross-linked structure)인 피브린 접착제로의 이동 (migration)을 증진시켜서 슈반 세포나 다른 신경 세포로의 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있다^{60,62}. 따라서, 이러한 피브린 접착제의 성분을 이용한 흡수성 신경 도관 (absorbable nerve conduit)을 연구하는 것도 말초 신경 재생을 위한 앞으로의 과제가 되리라 사료되었다.

슈반세포는 주조직적합성 항원 I과 II (major histocompatibility complex class I, II antigens)를 지니는 면역성을 가져서 신경 조직 내에서 항원제공 세포 (antigen-presenting cells)로서 기능하게 된다⁶⁰. 사이클로스포린 A (CsA)는 신경 이종 이식 거부 반응 (nerve allograft rejection)을 예방하기 위해 사용되었는데 이종 신경 이식 시 신경 재생 효과를 촉진하기 위해 사용된다^{60,63}. 본 연구에서는 이식 거부 반응의 예방 목적으로 Cyclosporin A (CsA, 100mg/ml, Novartis, USA)를 최소한의 용량인 5mg/kg으로 수술 후 1주일간 사용했는데, 신경성 항원 (neural antigens)에 민감한 (sensitized) T 세포군 (T cells)의 활성을 억제함으로써 신경 재생 기간 동안 면역계의 억제 작용을 큰 독성 (morbidity) 없이 얻을 수 있었다. 또한, CsA는 미세환경을 조절함 (modulating the microenvironment)으로서 신경 재생에 좋은 영향을 미치는데 이와 같은 면역계와 염증 과정 (inflammatory process)을 조절함으로써 신경 재생을 강화시킬 수 있을 것으로 사료되었다⁶⁴.

주행로 분석은 임상적으로 전형적인 하지 신경 결손부나 좌골 신경 기능을 평가하기 위해 시행되어 왔다. 족흔 분석법 (foot-print analysis) 또한 정상 백서 및 실험 백서에서 여러 성분들을 재현할 수 있어서 많이 사용되어 왔다. 본 연구에서 12주 뒤 측정된 좌골 신경 기능 지수는 실험군에서 -60.1 ± 13.9 (n=5), 대조군에서 -87.0 ± 12.9 (n=4)로 실험군에서 보다 우수한 결과를 보였는데, 측정이 정확하지 않은 족흔을 가진 개체를 제외하면서 개체수가 줄어서 통계적으로 유의성은 발견할 수 없었다.

좌골 신경 기능 지수는 De Medinaceli 등²⁹에 의해 처음 소개되었고, 이후에도 좌골 신경의 운동 기능을 평가하기 위한 연구 방법으로 많이 사용되어 왔다^{22,23,25}. 그러나 이런 주행로 검사법은 상대적으로 준비하기가 어렵고 족흔을 얻는 과정에서 재현성이 부족하며 좌골 신경 기능 지수 계산법이 쉽지 않고 시간도 많이 걸리는 데다가, 무엇보다도 어두운 주행로는 보다 정성적인 주행 형태에 대한 분석을 어렵게 한다. 따라서, 최근에는 보다 정량적이며 재현성 있고 쉬운 평가법으로 비디오 및 컴퓨터 분석 프로그램을 이용한 보행 분석법이 추천되고 있는데, 본 실험에서도 역동적인 주행 형태 (kinematic gait pattern)를 평가하기 위해 역동적인 보행 분석기 (dynamic gait analysis tester)를 고안해 내었다. 일반적으로 걸음 속도 (walking speed), 보행 및 디딜 때의 폭

(stance and swing phases), 걸음 길이 (step length), 발목 관절의 보행각 (angle of the ankle joint), 최종 보행 시 꼬리의 높이 (tail height at terminal stance), 최종 보행 시 꼬리의 변위 (tail deviation at terminal stance), 디딜 중의 정중 변위 (midline deviation at midswing) 등과 같은 보행시 일어날 수 있는 변수들의 값을 구하게 된다^{23,65}. 본 실험에서는 이 중에서 각 군별 좌골 신경 손상에 대한 평가에서 가장 재현성 있으며 신뢰할 수 있는 측정값으로 알려져 있는 발목 관절 각도 값을 구하였는데, 이전 문헌에서 보고된 값을 참고하면 정상 백서의 값은 $50^\circ \pm 6^\circ$ 이고, 자가 신경 이식을 시행한 군에서는 4개월 뒤 $36^\circ \pm 6^\circ$, 신경 이식을 하지 않은 군에서는 4개월 뒤 $22^\circ \pm 7^\circ$ 였다^{65,67}. 발목관절 보행 각도는 보행중간 단계 (mid-stance phase of the gait cycle)에서, 하지 선 (shank line) 및 4번째 족부 골 (head of the fourth metatarsal)과 발목 (lateral malleolus)이 이루는 선이 이루는 각도로서, 큰 값은 발목과 발바닥인 지저부의 신전이 보다 큰 것을 의미한다. 보행 경로 중 바닥에서 처음 떼기 시작한 보행 (first began to walk) 및 중간에 멈춰선 (stopped walking) 경우는 제외하였으며, 매 개체마다 세 번의 측정값의 평균치를 구하였다. Bain 등²⁹은 좌골 신경 전체 (complete sciatic), 비골신경 (peroneal nerve) 그리고 후경골 신경 (posterior tibial nerve) 손상 후 각각의 기능 지수를 측정하였는데 비골 신경 손상 후 지수 값이 좌골 신경 전체 손상 후 지수 값과 유사하였으며, 이는 Lin 등^{66,67}의 연구 결과에서도 비슷하였는데 비골신경 손상이 발목 관절 각도 (ASA) 값이 역시 좌골신경 손상시 값과 유사하였다.

본 연구에서 3개월 뒤 ASA 값은 조절군에서 $32.2^\circ \pm 4.8^\circ$, 실험군에서 $37.9^\circ \pm 5.4^\circ$ 로서 전술한 자가신경 이식을 한 군과 비교할 때 3개월 후의 본 실험 결과가 보다 우수함을 알 수 있으며, 또한, 비복신경 등 다른 신경들이 재생된 것보다 비골신경이 재생된 효과와 유사함도 알 수 있었다. 이처럼 비디오를 통한 보행로 분석은 보다 쉽고 간편하며 무엇보다 재현성이 우수하여 다른 여러 실험군에도 항상 비교할 수 있는 장점이 있다 하겠는데, 본 실험의 실험군과 대조군 모두에서 신경 이식을 하지 않은 값인 4개월 후 $22^\circ \pm 7^\circ$ 값보다 우수한 것으로 보아 슈반 세포와 매트릭셀?을 이용한 신경 도관 이식 자체의 우수성을 입증한다고 볼 수 있다. 따라서 말초 신경 재생의 성공을 위해서는 신경 도관내의 세포의 기질로 채우는 것이 필요하며 그 중에 라미닌과 4형 콜라겐 성분 또한 축삭의 재생을 촉진시키는 주요 요소이므로 이런 결과를 바탕으로 신경 재생을 위해 향후 다른 여러 성장 요소들 (growth promoting substances)을 포함하는 이상적인 성장 촉진 매개체 (ideal growth promoting medium)를 개발하는 것 역시 중요한 연구 과제가 될 것으로 사료되었다.

V. 결 론

신경 내부의 미세구조와 환경을 기존의 신경 도관보다 개선한 효과적인 신경 도관을 매트릭셀® (BD Biosciences, 미국)과 척추 후근절을 이용한 삼차원 슈반세포 배양 기법을 고안하였으며, 백서 좌골신경 결손 모델을 이용해 신경 도관의 재생 능력을 평

가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 매트릭젤®의 3차원 배양에서 얻은 슈반 세포의 평균 수는 $86 \pm 7.9 \times 10^6/\text{ml}$ 로서 슈반 세포를 바로 배양하기 위한 신경 도관으로 사용하기에 적절할 것으로 생각되었다.
2. 좌골 신경 기능 지수 (SFI [standard sciatic function index])는 12 주 뒤, 실험군에서 -60.1 ± 4.8 (n=5)로서 대조군의 -87.0 ± 12.9 (n=4)보다 증가된 값을 보였다.
3. 발목 관절 각도 (ASA [ankle stance angle])도 실험군에서 $37.9^\circ \pm 5.4^\circ$ 를 보여서 대조군의 $32.2^\circ \pm 4.8^\circ$ 보다 우수하였다.
4. 수초화 지수 (Myelination index [MI])도 대조군 및 실험군에서 각각 0.1648 및 0.3007를 보여 3차원 배양군에서 우수함을 알 수 있었고, 재생된 신경중 전체 축삭기에 대한 수초화된 축삭의 비율은 정상대조군의 $79.4 \pm 1.35\%$ 에 비해 실험군에서는 $44.91 \pm 0.13\%$ 였다.
5. LFB 염색 및 전자현미경 소견에서는 실험군에서 보다 균일화되고 많은 (abundant and well organized) 수초화된 신경 섬유 조직들이 대조군에 비해 관찰되었으며, 비복근과 대퇴이두근의 위축과 섬유화 현상도 대조군에서 보다 많이 관찰되었다.

결론적으로, 3차원 배양된 슈반세포를 이용한 실리콘 신경 도관을 제작하는 새로운 기술이 고안되었으며, 이 방법은 기존의 전형적인 평면 배양 방법보다 신경 재생에 있어 보다 향상된 방법임을 알 수 있었다.

References

1. Hadlock TA, Sundback CA, Hunter DA, Vacanti JP, Cheney ML. A new artificial nerve graft containing rolled schwann cell monolayers. *Microsurg* 2001;21:96-101.
2. Bryan DJ, Wang KK, Chakalis-Haley DP. Effect of schwann cells in the enhancement of peripheral-nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg* 1996;12:439-446.
3. Tseng CY, Hu G, Ambron RT, Chiu DT. Histologic analysis of Schwann cell migration and peripheral nerve regeneration in the autogenous venous nerve conduit (ANVC). *J Reconstr Microsurg* 2003;19:331-340.
4. Koshimune M, Takamatsu K, Nakatsuka H, Inui K, Yamano Y, Ikada Y. Creating bioabsorbable Schwann cell coated conduits through tissue engineering. *Biomed Mater Eng* 2003;13:223-229.
5. Lundborg G, Rosen B, Dahlin L, Danielsen N, Holmberg J. Tubular versus conventional repair of median and ulnar nerves in the human forearm: early results from a perspective, randomized, clinical study. *J Hand Surg* 1997;22A:99-106.
6. Den-Dunnen WF, van der Lei B, Robinson PH, Holwerda A, Pennings AJ, Schakenraad JM. Biological performance of a degradable poly-(lactic acid-epsilon-caprolactone) nerve guide: influence of tube dimensions. *J Biomed Mater Res* 1995;29:757-766.
7. Doolabh VB, Herd CM, Mackinnon SE. The role of conduits in nerve repair: a review. *Rev Neurosci* 1996;7:47-84.
8. Shen ZL, Lassner F, Becker M, Walter GF, Bader A, Berger A. Viability of cultured nerve grafts: An assessment of proliferation of Schwann cells and fibroblasts. *Microsurg* 1999;19:356-363.
9. Lundborg G. Nerve regeneration: the nerve chamber as an experimental tool. In: Lundborg G, editor. *Nerve injury and repair*. New York: Churchill Livingstone; 1988. p 163-178.
10. Levi ADO, Sonntag VKH, Dickman C, et al. The role of cultured Schwann cell grafts in the repair of gaps within the peripheral ner-

- vous system of primates. *Exp Neurol* 1997;143:25-36.
11. Shen ZL, Berger A, Hierner R, Allmeling C, Ungewickell E, Walter GF. A Schwann cell-seeded intrinsic framework and its satisfactory biocompatibility for a bioartificial nerve graft. *Microsurg* 2001;21:6-11.
12. Kim SM, Lee JH, Kim NY, Ahn KM, Choi WJ, Choi SH, Cha MJ, Lee JY, Hwang SJ, Jahng JW, Myoung H, Choi JY, Seo BM, Choung PH, Kim MJ. Improved protocol for schwann cell isolation and proliferation from rat dorsal root ganglia in vitro. *J Korean Academy Maxillofac Reconstr Surg* 2003;25:265-272.
13. Kim SM, Lee JH. The most appropriate antimitotic treatment of Ara-C in Schwann cell-enriched culture from dorsal root ganglia of new born rat. *J Korean Associat Oral Maxillofac Surgeons* 2004;30:(in press).
14. Freshney RI. *Culture of animal cells; a manual of basic technique*. 2000. fourth ed. Wiley-Liss Inc 9-18, 89-104.
15. Mosahebi A, Wiberg M, Terenghi G. Addition of fibronectin to alginate matrix improves peripheral nerve regeneration in tissue-engineered conduits. *Tissue Eng* 2003;9:209-218.
16. Evans GRD, Brandt K, Katz S, Chauvin P, Otto L, Bogle M, Wang B, Meszlenyi RK, Lu L, Mikos AG, Patrick CW. Bioactive poly(L-lactic acid) conduits seeded with Schwann cells for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 2002;23:841-848.
17. Toriumi DM, Woolford TJ, Teitelbaum B. Growth factors in nerve regeneration. *Fac Plas Surg Clin Nor Am*. 1995;3:287-300.
18. Ahmed Z, Underwood S, Brown RA. Nerve guide material made from fibronectin: assessment of in vitro properties. *Tissue Eng* 2003;9:219-231.
19. Terris DJ, Cheng ET, Uteley DS, Tarn DM, Ho PR, Verity AN. Functional recovery following nerve injury and repair by silicon tubulization: comparison of laminin-fibronectin, dialyzed plasma, collagen gel, and phosphate buffered solution. *Auris Nasus Larynx* 1999;26:117-122.
20. Wingerd BD. The nervous system, in: *Rat dissection manual*. The Johns Hopkins University Press, 32-40, 1988.
21. Yeh LS, Gregory CR, Theriault BR, Hou SM, Lecouter RA. A functional model for whole limb transplantation in the rat. *Plast Reconstr Surg* 2000;105:1704-1711.
22. De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol* 1982;77:634-643.
23. Dijkstra JR, Meek MF, Robinson PH, Gramsbergen A. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. *J Neurosci Methods* 2000;96:89-96.
24. Varejao ASP, Cabrita AM, Patricio JA, Bulas-Cruz J, Gabriel RC, Melo-Pinto P, Couto PA, Meek MF. Functional assessment of peripheral nerve recovery in the rat:gait kinematics. *Microsurg* 2001; 21:383-388.
25. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1989;83:129-136.
26. Kluver H, Barrera E. A method for the combined staining of cells and fibers in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 1953;12:400-403.
27. Clasen RA, Simon RG, Scott R, Pandolfi S, Laing I, Lesak A. The staining of the myelin sheath by Luxol dye techniques. *J Neuropathol Exp Neurol* 1973;32:271-283.
28. Heijke GCM, Klopper PJ, Baljet B, Van Doorn IB, Dutrieux RP. Method for morphometric analysis of axons in experimental peripheral nerve reconstruction. *Microsurg* 2000;20:225-232.
29. Levi ADO. Characterization of the technique involved in isolating Schwann cells from adult human peripheral nerve. *J Neurosci Meth* 1996;68:21-26.
30. Mosahebi A, Fuller P, Wiberg M, Terenghi G. Effect of allogenic Schwann cell transplantation on peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol* 2002;173:213-223.
31. Mirsky R, Jessen KR, Brennan A, Parkinson D, Dong Z, Meier C,

- Parmantier E, Lawson D. Schwann cells as regulators of nerve development. *J Physiology-Paris* 2002;96:17-24.
32. Kioussi C, Gruss P. Making of a Schwann. *Trends Genet* 1996;12:84-86.
 33. Labrador RO, Buti M, Navarro X. Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair. *Exp Neurol* 1998;149:243-252.
 34. Shamash S, Reichert F, Rotshenker S. The cytokine network of wallerian degeneration: Tumor necrosis factor- α , Interleukin-1 α , and Interleukin-1 β . *J Neuroscience*. 2002;22:3052-3060.
 35. Cassell OC, Morrison WA, Messina A, Penington AJ, Thompson EW, Stevens GW, Perera JM, Kleinman HK, Hurley JV, Romeo R, Knight KR. The influence of extracellular matrix on the generation of vascularized, engineered, transplantable tissue. *Ann N Y Acad Sci* 2001;944:429-442.
 36. Kleinman HK, Philp D, Hoffman MP. Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Curr Opin Biotechnol* 2003;14:526-532.
 37. Dityatev A, Schachner M. Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nature Rev Neurosci* 2003;4:456-468.
 38. Benes FM, Lange N. Two-dimensional versus three-dimensional cell counting: a practical perspective. *Trends Neurosci* 2001;24:11-17.
 39. Williams RW, Rakic P. Three-dimensional counting: an accurate and direct method to estimate numbers of cells in sectioned material. *J Comp Neurol* 1988;278:344-352.
 40. Lopez TJ, De Vries GH. Isolation and serum-free culture of primary Schwann cells from human fetal peripheral nerve. *Exp Neurol* 1999;158:1-8.
 41. Levine JM, Reynolds R, Fawcett JW. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends Neurosci* 2001;24:39-47.
 42. Garbay B. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* 2000;61:267-304.
 43. Notterpek L. Neurotrophins in myelination: a new role for a puzzling receptor. *Trends Neurosci* 2003;26:232-234.
 44. Ferguson KL, Slack RS. Growth factors: can they promote neurogenesis? *Trends Neurosci* 2003;26:283-285.
 45. Luk HW, Noble LJ, Werb Z. Macrophages contribute to the maintenance of stable regenerating neurites following peripheral nerve injury. *J Neurosci Research* 2003;73:644-658.
 46. McQuillan W. The use of nerve isolation. *Hand* 1970;2:19-20.
 47. Coleman DJ, Sharpe DT, Taylor IL, Chander CL, Cross SE. The role of the contractile fibroblast in the capsules around tissue expanders and implants. *Br J Plast Surg* 1993;46:547-556.
 48. Meyer RS, Abrams RA, Botte MJ, Davey JP, Bodine-Fowler SC. Functional recovery following neurotomy of the rat sciatic nerve by epineurial repair compared with tubulization. *J Orthop Res* 1997;5:664-669.
 49. Chamberlain LJ, Yannas IV, Arrizabalaga A, Hsu H-P, Norregaard TV, Spector M. Early peripheral nerve healing in collagen and silicon tube implants: myofibroblasts and the cellular responses. *Biomaterials* 1998;19:1393-1403.
 50. Varejao ASP, Cabrita AM, Meek MF, Geuna S, Patricio JA, Azevedo HR, Ferreira AJ, Meek MF. Functional assessment of sciatic nerve recovery: biodegradable poly(DLLA- ϵ -CL) nerve guide filled with fresh skeletal muscle. *Microsurg* 2003;23:346-353.
 51. Meek MF, Dunnen WFA, Schakenraad JM, Robinson PH. Evaluation of several techniques to modify denatured muscle tissue to obtain a scaffold for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 1999;20:401-408.
 52. Puigdemivell-Sanchez A, Forcada-Calvet P, Prats-Galino A, Molander C. Contribution of femoral and proximal sciatic nerve branches to the sensory innervation of hindlimb digits in the rat. *Anat Rec* 2000;260:180-188.
 53. Yongbo Li, Hsieh ST, Chien HF, Zhang X, McArthur JC, Griffin JW. Sensory and motor denervation influence epidermal thickness in rat foot glabrous skin. *Exp Neurol* 1997;147:452-462.
 54. Lee JH, Hwang SJ, Choi WJ, Kim SM, Kim NY, Ahn KM, Myung H, Seo BM, Choi JY, Choung PH, Kim MJ, Kim HM, Park KP, Kim JS. Development of microporous calcium phosphate coated nerve conduit for peripheral nerve repair. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surgeons* 2003;29:151-156.
 55. Valenti RF, Aebischer P. Strategies for the engineering of peripheral nervous tissue regeneration, in Lanza RP, Langer R, Chick WL (eds): Principles of tissue engineering. Austin: Academic Press, 1997:678.
 56. Dahlin LB, Lundborg G. Use of tubes in peripheral nerve repair. *Neurosurg Clin N Am* 2001;12:341-352.
 57. Hadlock T, Elisseff J, Langer R, Vacanti J, Cheney M. A tissue-engineered conduit for peripheral nerve repair. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;124:1081-1086.
 58. Hadlock T, Sundback C, Hunter D, Cheney M, Vacanti JP. A polymer foam conduit seeded with Schwann cells promotes guided peripheral nerve regeneration. *Tissue Eng* 2000;6:119-127.
 59. Bryan D, Holway A, Wang KK, Silva AE, Trantolo DJ, Wise D, Summerhayes I. Influence of glial growth factor and Schwann cells in a bioresorbable guidance channel on peripheral nerve regeneration. *Tissue Eng* 2000;6:129-138.
 60. Yamada Y, Boo JS, Ozawa R, Nagasaka T, Okazaki Y, Hata K, Ueda M. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *J Cranio-Maxillofac Surg* 2003;31:27-33.
 61. de Vries J, Menovsky T, van Gulik S, Wesseling P. Histologic effects of fibrin glue on nervous tissue: A safety study in rats. *Surg Neurol* 2002;57:415-422.
 62. Yin Q, Kemp GH, Yu LG, Wagstaff SC, Frostick SP. Neurotrophin-4 delivered by fibrin glue promotes peripheral nerve regeneration. *Muscle Nerve* 2001;24:345-351.
 63. Bain JR, Mackinnon SE, Hudson AR, Falk RE, Falk JA, Hunter RT. The peripheral nerve allograft: an assessment of regeneration across nerve allograft in rats immunosuppressed with Cyclosporin A. *Plast Reconstr Surg* 1988;82:1052-1064.
 64. Feringa ER, Vahlsing HL. Immunologic consideration in nervous system repair, in FJ Seil (eds): Nerve, organ and tissue regeneration: research perspectives. New York: Academic Press, 1983:171-192.
 65. Lee JH, Hwang SJ, Ahn KM, Kim SM, Nam DW, Kim JH, Park YW, Kim NY, Jang JW, Lee SK. Dynamic evaluation of sciatic nerve function in animal model: video gait analysis. Abstracts in Congress of Korean Academy Maxillofac Reconstruc Surg Associat 2003;68:204.
 66. Lin FM, Pan YC, Hom C, Sabbahi M, Shenaq S. Ankle stance angle: a functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery after complete transection. *J Reconstruc Microsurg* 1996;12:173-177.
 67. Walker JL, Evans JM, Meade P, Resig P, Siskin BF. Gait-stance duration as a measure of injury and recovery in the rat sciatic nerve model. *J Neurosci Methods* 1994;52:47-52.

Legends

- Fig. 1. Dissected spine for dorsal root ganglia harvesting
- Fig. 2. Modification of a silicon tube and dimensions (Internal Diameter 1.98 mm, length 14 mm)
- Fig. 3. Schematic drawing of three-dimensional rafting culture method of DRG plated Matrigel[®] loaded silicon conduit
- Fig. 4. Experimental design of 3D cultured and 2D cultured nerve conduit
- Fig. 5. Detail of entubulization between the proximal and distal nerve end
- Fig. 6. Photograph showing steal image of the mid-stance phase of a step cycle ASA : the ankle joint angle measured at the mid-stance phase of the step cycle, formed by two lines, to the shank and another connecting the lateral malleolus and the head of the fourth metatarsal
- Fig. 7. Photomicrographs of primary cell culture in plain dish, after 2 weeks
- Photomicrograph of primary cell culture (phase contrast, $\times 100$)
 - Photomicrograph showing parallel orientation of Schwann cell process (S-100 immunostain, $\times 400$)
- Fig. 8. Photomicrographs of three dimensional culture, after 2 weeks ($\times 200$)
- Photomicrograph of H&E stained total cells
 - Photomicrograph showing S-100 positively stained cells
 - Photomicrograph showing GFAP positively stained cells
- Fig. 9. Photomicrographs of cross section in the mid-portion of nerve conduit ($\times 400$)
- Photomicrograph showing S-100 positively stained cells in sham group
 - Photomicrograph showing S-100 positively stained cells in experimental group
 - Photomicrograph showing GFAP positively stained cells in sham group
 - Photomicrograph of showing GFAP positively stained cells in experimental group
- Fig. 10. Photomicrographs of axon and myelin LFB staining in the mid-portion of nerve conduit ($\times 400$)
- Photomicrograph in sham group
 - Photomicrograph in control group
 - Photomicrograph of experimental group
- Fig. 11. Photomicrographs of cross-sectional view of axon and myelin in the mid-portion of nerve conduit (toluidine blue stained, $\times 200$)
- Photomicrograph in sham group
 - Photomicrograph in control group
 - Photomicrograph in experimental group
- Fig. 12. Transmission electron photomicrographs of cross section in the nerve conduit
- Photomicrograph showing well myelinated fibers aligned with Schwann cells and extracellular collagen matrix in sham group ($\times 3,000$)
 - Photomicrograph showing thin myelinated fibers with disorganized and thickened extracellular collagen, and small Schwann cells in the mid-portion of experimental nerve conduit ($\times 5,000$)
 - Photomicrograph showing small myelinated fibers with Wallerian degeneration, and lymphocyte infiltration in the distal-portion of experimental nerve conduit ($\times 5,000$)
- Fig. 13. Photomicrographs of cross section in the gastrocnemius muscle (H&E, $\times 200$)
- Photomicrograph showing well aligned muscle bundles with closely packed fibers and the nuclei at the cell periphery in the sham group
 - Photomicrograph showing severe muscle atrophy with increased fibrosis and fatty infiltration in the control group
 - Photomicrograph showing generalized muscle atrophy with mild fibrosis in the experimental group
- Fig. 14. Photomicrographs of cross section in the biceps femoris tendon (H&E, $\times 100$)
- Photomicrograph showing well aligned muscle bundles in the sham group
 - Photomicrograph showing increased fibrosis with fatty infiltration in the control group
 - Photomicrograph showing mild fibrosis in the experimental group
- Fig. 15. Anatomic dissection showing the lateral view of the left hindlimb of the rat
- bf : rostral insertion of the femoral biceps muscle
 - gm : gluteus maximus muscle
 - vlq : lateral vastus of the quadriceps muscle
 - pc : posterior cutaneous nerve, origin of the thigh
 - mc : musculocutaneous branch of the sciatic nerve
 - sc : sciatic nerve, and its main branches; tibial(t), peroneal(p), and sural(s) nerves

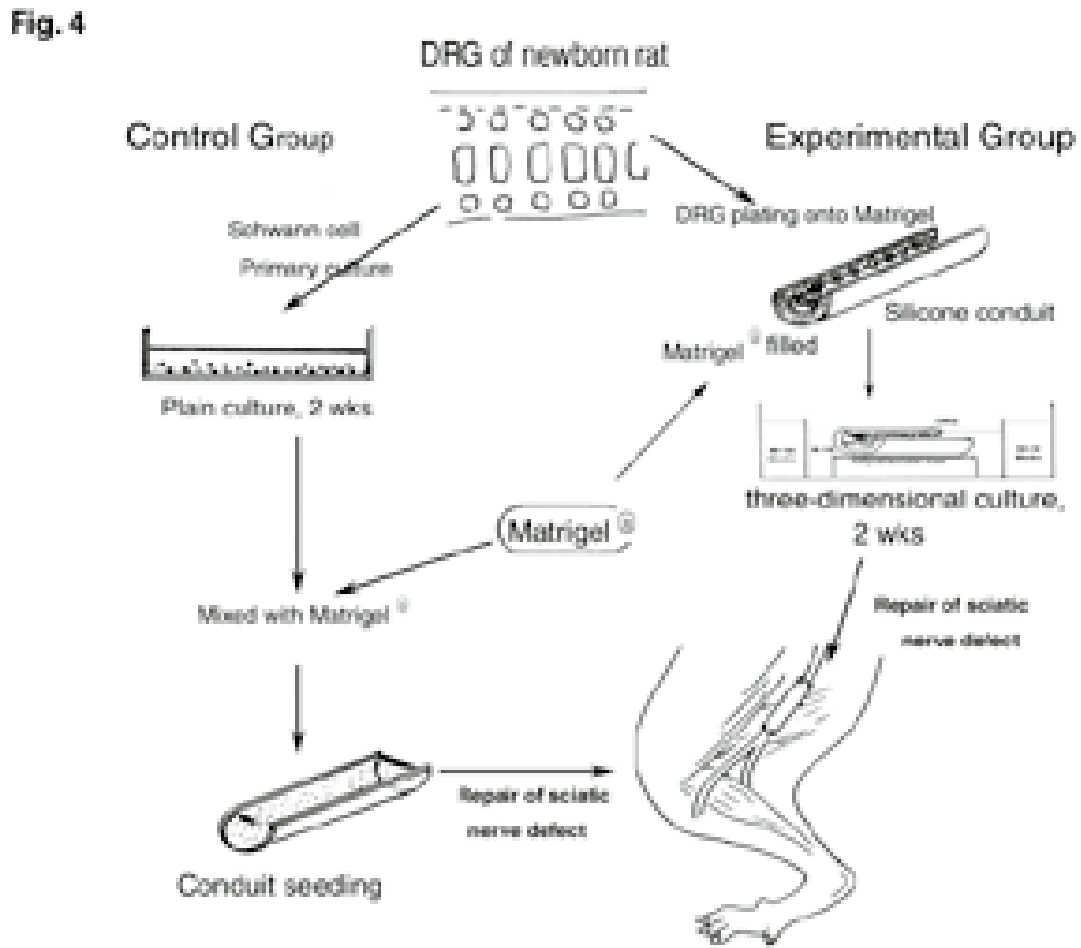
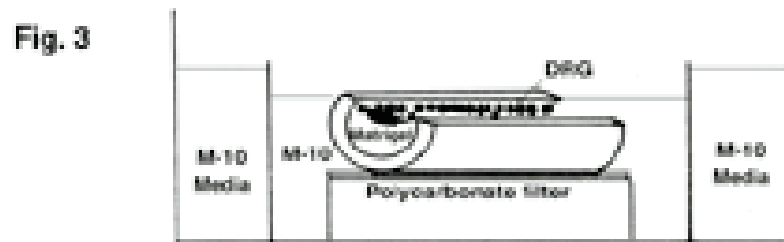
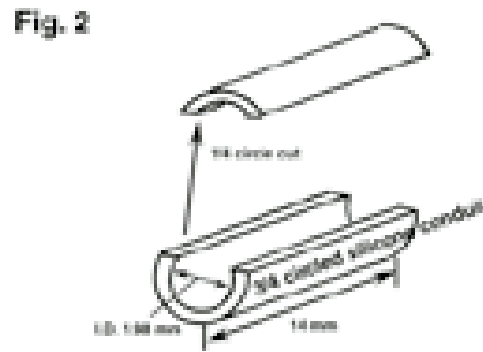
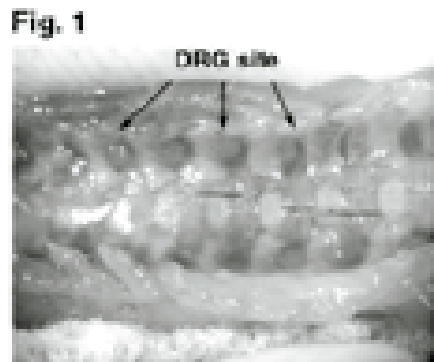


Fig. 5

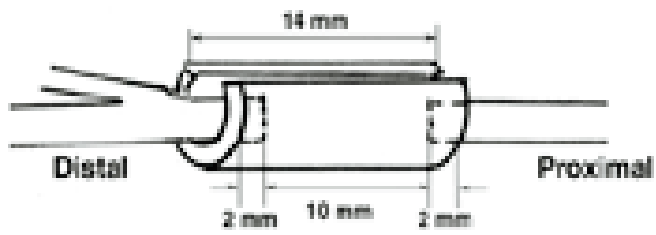


Fig. 6

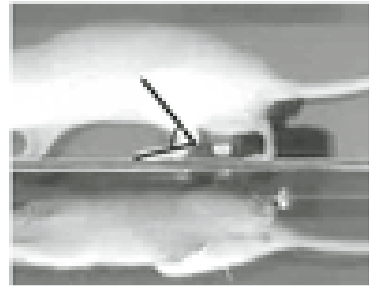


Fig. 7

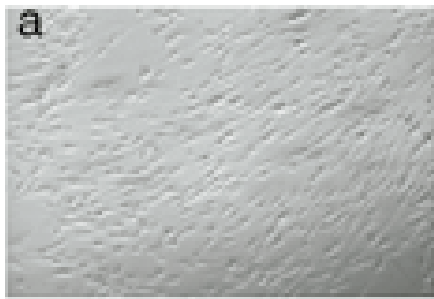


Fig. 8

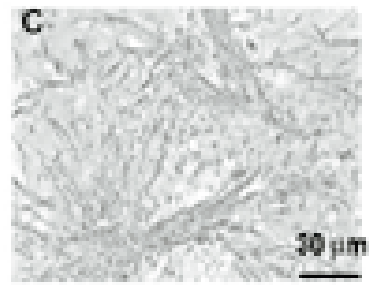
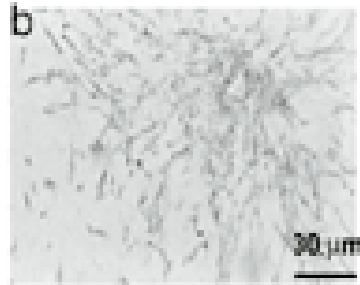


Fig. 9

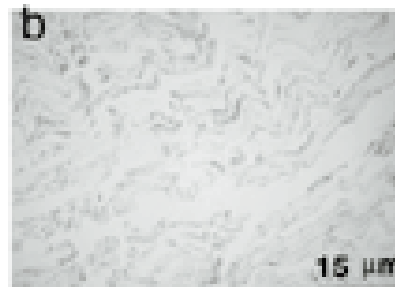
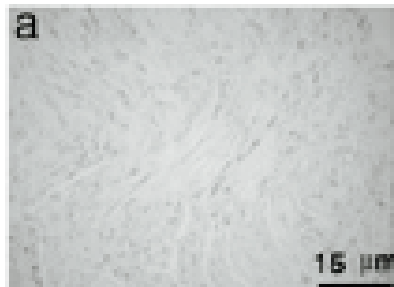


Fig. 9

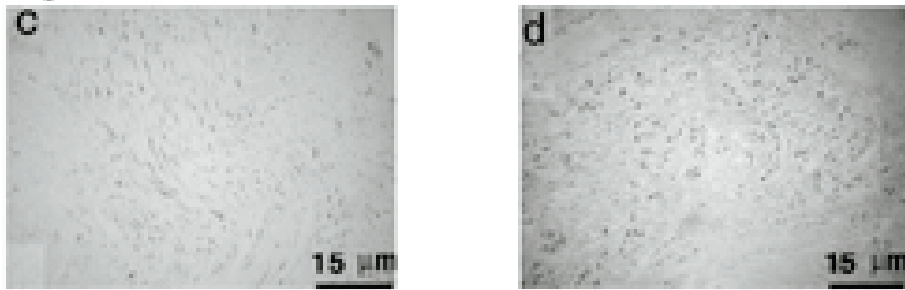


Fig. 10

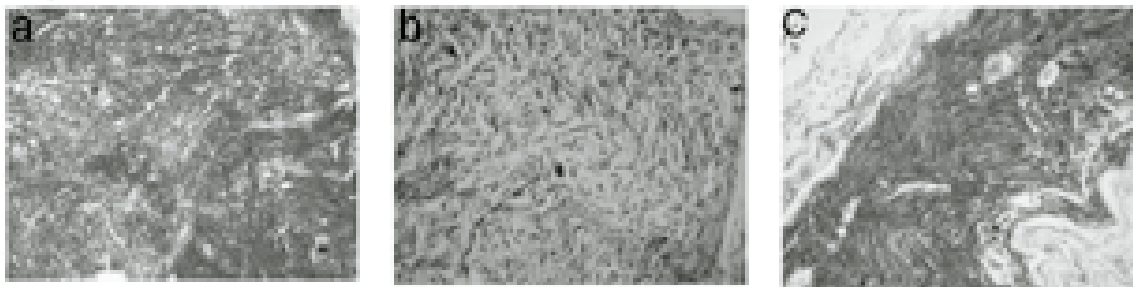


Fig. 11

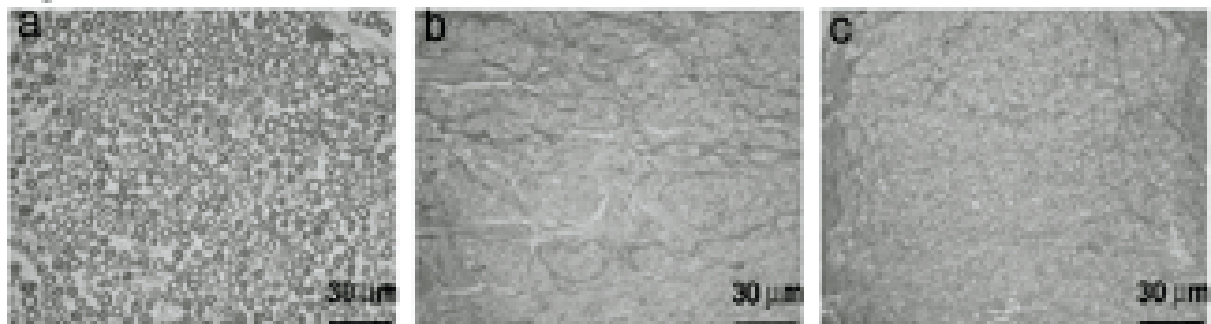


Fig. 12

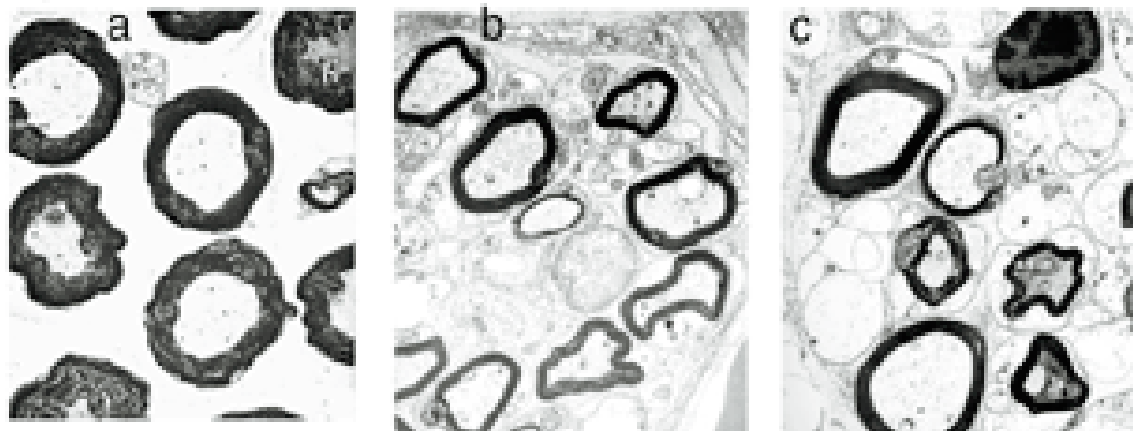


Fig. 13

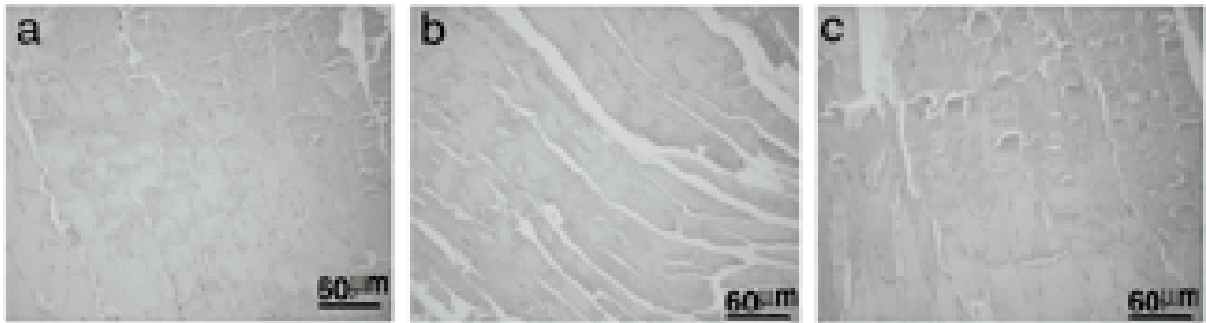


Fig. 14

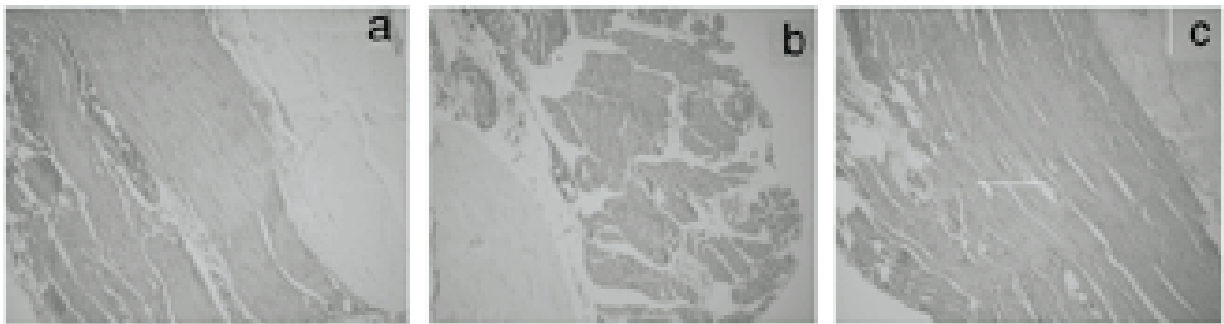


Fig. 15

