

쥐 전방십자인대 신경말단에서 대뇌피질까지 Pseudorabies virus (PRV)를 이용한 구심성 체성감각신경로의 추적

김진수 · 박형빈 · 정순택 · 조세현

경상대학교 의과대학 정형외과학교실

목적: 전방십자인대 내에 기계적 수용체의 존재가 밝혀지면서 전방십자인대는 신경근육의 조절에 관여하는 기능이 있는 것으로 추측되어왔다. 하지만, 기계적 수용체의 존재에도 불구하고 전방십자인대의 말단 신경수용체로부터 대뇌피질까지의 구심성 체성감각신경로는 아직 명확히 밝혀지지 않았다. 강력한 신경친화성 표지자이며 신경연접을 건너 분열, 확산하는 pseudorabies virus (PRV)를 이용하여 전방십자인대의 구심성 체성감각신경로를 추적하고자 하였다.

대상 및 방법: PRV를 쥐의 전방십자인대에 주입한 후 약 6-7일간 신경연접을 건너 확산하도록 허용한 후 각각의 쥐를 희생, 관류하였다. 대뇌와 척수를 채우로부터 분리하여 면역화학적으로 처리한 후 PRV의 존재여부를 확인하였다.

결과: PRV에 면역 활성화된 신경세포는 척수로부터 대뇌피질에 이르기까지 여러 위치에서 발견할 수 있었다. 특히, 뇌관의 망상활성계의 중뇌망상핵, 대뇌세포망상핵, 부거대세포망상핵, 거대세포망상핵에서 강한 양성표지반응을 보였다.

결론: 쥐의 전방십자인대의 신경말단은 척수, 뇌관 및 대뇌피질로 투사된다. 또한, 전방십자인대에 분포하는 신경말단으로부터의 대뇌피질로의 구심성 신경로에서 망상활성계가 중요한 역할을 담당할 것으로 추측된다.

색인 단어: 구심성 체성감각신경로, 전방십자인대, 신경말단, pseudorabies virus, 쥐

서론

최근 레저문화의 확산으로 스포츠로 인한 전방 십자인대의 손상이 증가하는 추세이고, 전방십자인대 재건술 후 스포츠 수준으로 복귀여부는 수술의 성공여부가 가장 중요한 요소이다. 대퇴골에 대하여 경골의 전방진위를 일차적으로 억제하는 전방십자인대의 생역학적 기능은 잘 알려져 있다. 그러나, 전방십자인대의 손상 후 슬관절을 구조적, 생체역학적으로 정상화시키는 것이 부상 이전의 스포츠기능으로 회복을 의미하지는 않는다⁷⁾. 이는 전방십자인대의 정상적인 기능 유지에는 생역학적 기능외의 여러 인자가 관여하는 하는 것을 의미하며, 신경근육의 조절 기전이 중요한 역할을 할 것으로 생각한다 (Michael: 2002). 신경근육의 조절 기전에 관한 연구로는 Kennedy 등²⁵⁾은 전방 십자인대를 싸고 있는 활막에서 자유 신경말단(Free nerve ending) 과 골지(Golgi)유사수용체의 존재를 발견하였다. Schultz 등³⁴⁾도 인간의 십자인대에서 기계수용체의 존재를 보고하였고, 이것이 고유감각을 담당하는

것으로 추측하였다. 현재, 전방십자인대는 기계적 수용체에 의해 광범위한 신경지배를 받는 것이 정설로 받아들여지고 있고, 이 기계적 수용체들은 구심성 기능을 담당한다고 알려져있다^{33,35)}. Gomez-Barrena 등¹⁴⁾은 고양이를 이용한 실험에서 전방십자인대로부터 척수까지의 구심성 신경로를 보고하였다. 하지만 그들의 연구는 구심성 신경로의 추적이 척수까지 한정되었기에 생리학적으로 중요성에도 불구하고 뇌피질까지의 구심성 신경로를 밝혀내지 못한 한계가 있었다. Martin & Dolivo²⁸⁾가 처음으로 신경전달 표지자(transneuronal markers)로 바이러스를 사용한 이후, 여러 종류의 바이러스가 신경전달 표지자로 사용되었고, 말초신경계와 중심신경계간의 연결을 추적하는데 중요한 수단으로 사용되고 있다. 가장 흔히 사용되는 바이러스는 Pseudorabies virus (PRV)로 다른 고식적인 표지자보다 많은 장점이 있다. 첫 번째는 단일 신경로에서 최소한 3개 이상의 신경세포로 이동 및 신경표지가 가능하며²¹⁾, 두 번째로는 Becker strain의 경우 구심성 및 원심성 신경추적이 가능하고^{4,20)}, 세포독성이 강하지 않아, 감염된 신경세포들이 수일간 생존하므로 전 신경로의 추적이 용이하며, 면역화학적으로 바이러스의 존재를 입증할 수 있다^{9,27)}. 마지막으로 herpes simplex virus type 1 이나, rabies 바이러스와는 달리 PRV는 인간에 병독성이 없다는 장점이 있다³⁶⁾. PRV-Becker strain은 이런 특장점 때문에 말초신경말단으로부터

통신저자: 박형빈

경상남도 진주시 칠암동 90
경상대학교병원 정형외과
TEL: 055) 750-8688 · FAX: 055) 761-9477
E-mail: hbpark@nongae.gsnu.ac.kr

중추신경계에 이르는 구심성 신경로의 추적에 유용한 표지자이다. 전방십자인대의 신경말단에서 중추신경계로 신경연결을 밝힌 연구는 지금까지 없어, 본 연구는 쥐의 전방십자인대의 신경말단에서 중추신경계에 이르는 구심성 신경로를 PRV를 이용하여 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물

230~350 g사이의 Sprague-Dawley 수컷 쥐 37마리를 이용하였고, 대조군으로 8마리, 실험군으로 29마리를 사용하였다. 모두 실험에서 PRV의 이용은 Biosafety level-2²⁶⁾에 한정된 설비 내에서 이루어졌다. 각각의 실험쥐는 Ketamin (0.75 mg/kg)과 Xylazine(1mg/kg)의 혼합물로 복강내 주사하여 마취하였다.

2. PRV 주입

우측 어깨골 하방에 약 5 mm의 횡절개를 가한 후, 어깨인대와 슬관절낭을 횡절개한 다음, 슬관절을 과굴곡시켜 전방십자인대를 충분히 노출시켰다. 전방십자인대의 경골부착부를 검자로 마모하여 PRV 주입을 용이하게 한 후 Hamilton syringe를 이용하여 10 μ l의 PRV 용액(Becker strain: 7.9×10^7 pFU/ml)을 분당 1 μ l의 속도로 천천히 주입하였다. 주입한 용액이 새지 않도록 유의하면서 주사기를 제거하였다. 주위 조직으로 바이러스가 전파되지 않도록 PRV 주입부와 관절강내를 면봉으로 깨끗이 닦아내고 관절막, 어깨인대 및 피부를 봉합하였다⁹⁾. PRV가 관절 내로 새어나와서 다른 부위의 신경전달이 일어날 가능성을 배제하기 위하여 대조군을 설정하여 실험군과 비교하였다. 대조군의 실험은 전방 십자인대에 PRV를 주입한 후 관절낭을 씻어내고 전방십자인대의 대퇴골 부착부를 절제하였다. 마취에서 깨어난 쥐는 각각의 분리된 사육장에 격리하였고, 바이러스 감염등 상태를 관찰하였다.

3. 관류(Perfusion)

실험쥐는 PRV 주입 후 약 150~180시간이 지난 후 Sodium Pentobarbital (60 mg/kg)을 복강내 주입하여 희생시키고, 18°C 헤파린식염수 100~200 ml과 400 ml의 4% paraformaldehyd-lysine periodate를 차례로 심장으로 관류시켰다. 뇌와 척수를 체부로부터 분리한 후 4°C sucrose용액에 24-36시간 동안 고정시켰다.

4. 면역조직화학(Immunohistochemistry)

뇌와 척수를 파라핀에 고정하고, 동결 미세절단도(freezing

microtome)를 이용하여 30 μ m 간격으로 절단하였다. 뇌와 척수의 절단편을 Avidin Biotinylated enzyme Complex (ABC) 용액(ABC kit, Vectastain, Inc. Peterborough, England)과 PRV 항체를 이용하여 PRV 존재를 면역화학적으로 찾아내었다. 각 6번째 절단편을 polyclonal rabbit anti-PRV 항체(1:20,000)에 38°C에서 하룻밤 동안 배양시킨 후 조직을 0.1M PBS로 헹구어 내고, ABC 용액과 이차 항체를 이용하여 처리하였다. 동일 조직을 3, 3'-diaminobenzidine 30 mg이 포함된 0.1M PBS 기질용액 100 ml로 처리하였다. 0.1M PBS용액으로 다시 씻어낸 후, 젤라틴이 코팅된 슬라이드에 부착시켜 건조시킨 후 glycerol PBS(29:1)를 이용하여 cover slide를 덮었다. 현미경하에서 염색된 세포체가 충분히 보이면 양성표지로 판정하였다. 저자는 Gerendai 등¹¹⁾의 방법을 변형하여, 표지강도를 결정하였다. 각 절단편의 표지강도는 각 신경세포의 양성 개수에 따라 음성, 약 양성, 중등도 양성, 강 양성으로 결정하였다. 음성은 절단편에 표지자가 염색된 세포가 없는 경우로 하였다. 약 양성 경우는 1~10개, 중등도 양성 경우는 11~20개 사이, 강 양성 경우는 20개 이상 염색된 세포가 있는 경우로 정의하였다.

결 과

전방십자인대에 PRV를 주입 후 PRV 면역반응 신경세포는 중추신경계의 여러 부위에서 발견할 수 있었다. 실험군의 PRV-반응 세포의 분포양식은 모두 동일하게 나타났었고, 대조군은 뇌와 척수에 반응세포가 없었다.

1. 척수

모든 실험군에서 각각의 척수분절마다 동일한 염색양상을 보였다. 분포양식은 경추부, 흉추부, 요추부에서 좌측(바이러스를 주입한 쪽)과 우측(주입하지 않은 쪽)이 달랐다(Fig. 1, Table 1). 요추부에서는 표지 강도가 주입한 쪽에서는 중등도 양성 소견을 보였고, 주입하지 않은 쪽에서는 약 양성 표지 발현을 보였다. 흉추부에서는 주입한 쪽에서 강 양성, 주입하지 않은 쪽은 중등도 양성 표지 발현을 보였다. 경추부에서는 주입한 쪽이 약 양성, 주입하지 않은 쪽에서는 음성의 표지 발현을 보였다.

2. 뇌간

뇌간에서는 망상활성계중 몇 개의 기저핵에서 강 양성 표지 발현을 보였다(Fig. 2, Table 1). 중뇌망상핵(mesencephalic reticular nucleus, MRN)은 양측 모두에서 강 양성 표지 발현을 보였다. 확대세포망상핵(magnocellular reticular nucleus, MARN), 부거대세포망상핵(paragi-

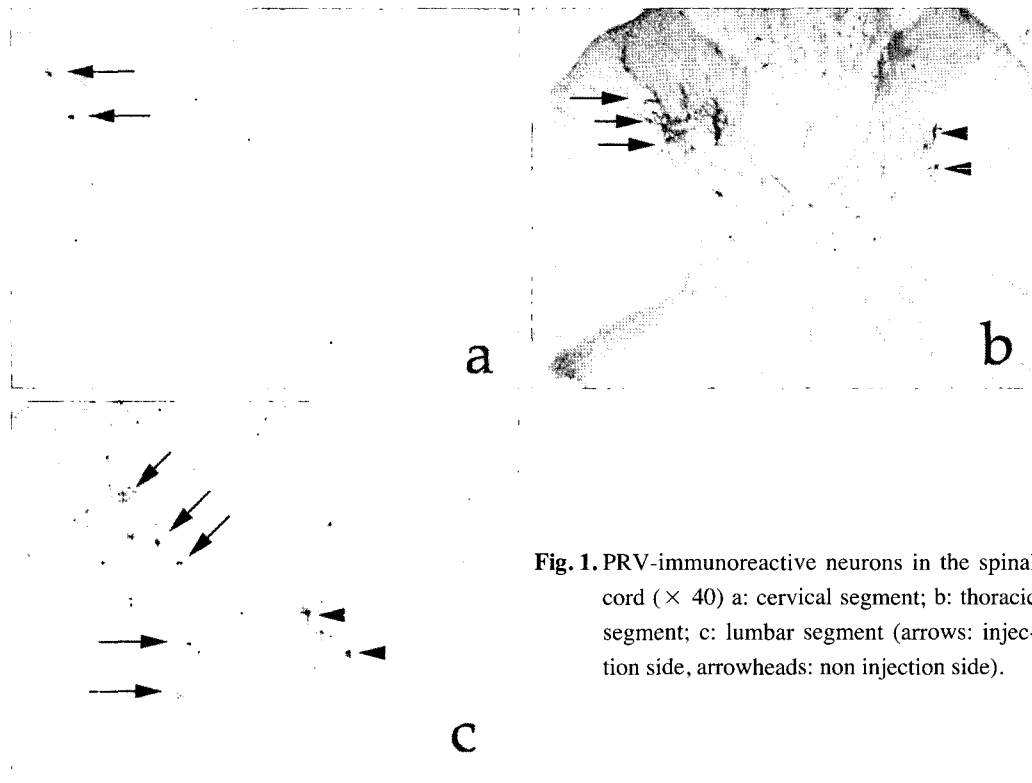


Fig. 1. PRV-immunoreactive neurons in the spinal cord ($\times 40$) a: cervical segment; b: thoracic segment; c: lumbar segment (arrows: injection side, arrowheads: non injection side).

Table 1. Quantitative analysis of the PRV-immunoreactive neurons in the spinal cord, brain stem, and cerebrum.

	Segment or Nucleus	Injection side	Non-injection side
Spinal cord	Cervical	+	-
	Thoracic	+++	++
	Lumbar	++	+
Brain stem	MRN	+++	+++
	MARN	+++	++
	PGi	+++	++
	Gi	+++	+
	NTS	+	+
	LC	++	++
	POR	++	++
Cerebrum	AVPV	+	+
	AHN	+	+
	LHA	+	+
	SPFT	+	+
	PAG	+	+
	PVN	++	++

Labeling intensity: -, negative (no labeled cells per section); +, weak (one to ten labeled cells per section); ++, moderate (ten to twenty labeled cells per section); +++, strong (more than twenty labeled cells per section)

The abbreviations used are: MRN, mesencephalic reticular nucleus; MARN, magnocellular reticular nucleus; PGi, paragigantocellular reticular nucleus; NTS, nucleus tractus solitarius; LC, locus ceruleus; POR, periolivary nucleus; AVPB, anteroventral periventricular nucleus; AHN, anterior hypothalamic nucleus; LHA, lateral hypothalamic nucleus; SPFT, subparafascicular thalamic nucleus; PAG, periaqueductal gray matter; PVN, paraventricular nucleus

giantocellular reticular nucleus, PGi)과 거대세포망상핵 (giantocellular reticular nucleus, Gi)은 주입한 쪽에서는 강 양성의 표지 발현을 보였으나, 주입하지 않은 쪽에서는 약 양성의 표지 발현을 보였다. 고립핵(nucleus tractus solitarius, NTS), 청색반점(locus ceruleus, LC)과 부올리브핵 periolivary nucleus (POR)에서는 양측 모두 중등도 양성의 표지발현을 보였다(Fig. 2, Table 1).

3. 대뇌

대뇌핵은 모든 표지가 양측에서 동일하게 나타났다. 전복측 뇌실주위핵(anteroventral periventricular nucleus, AVPV), 전시상하부핵(anterior hypothalamic nucleus, AHN), 외측 시상하부핵(lateral hypothalamic nucleus, LHA), 결수도관 회색질(periaqueductal gray matter, PAG) 및 밑다발결시상핵(subparafascicular thalamic nucleus, SPFT)은 모두 약 양성의 표지발현을 나타내었다. 뇌실결핵(paraventricular nucleus, PVN)은 중등도 양성의 표지발현을 보였다(Fig. 2, Table 1).

고 찰

전방십자인대의 신경수용체의 역할은 최근 최대의 관심사로 1982년 Kennedy 등²⁵⁾ 이 전방 십자인대의 활막에서 자유신

경말단과 골지 유사수용체의 존재를 밝힘으로 처음으로 논의 되었다. 몇 명의 저자는 동물연구에서 전방십자인대의 기계수용체를 보고하였다. Schutte 등³³⁾ 은 인간의 전방십자인대에는 파치니 소체(Pacinian corpuscles) 1종과 루피니 소체(Ruffini corpuscles) 2종의 다른 기계적 수용체와 자유신경말단이 존재함을 보고하였고, 이 기계적 수용체는 위치와 속력, 관절과 하지의 가속에 의한 인대의 장력이 변화함을 인지하는 역할을 한다고 하며, 자유신경말단은 통각을 담당한다고 하였다^{15, 18, 19, 32)}.

전방십자인대로부터 중추신경계로의 구심성 신경로의 추적은 부분적으로 소수의 저자들에 의해 시도되었다. Craig 등⁸⁾ 은 고양이 전방십자인대에 감각신경지배를 하고있다고 알려진 내측과 후측의 관절감각신경으로부터 척수까지의 신경로를 보고하였으나, 전방십자인대의 신경말단으로부터 직접적으로 척수까지의 구심성 신경로의 존재를 밝히지는 못하였다. Gomez-Barrena 등¹⁴⁾ 은 wheat germ agglutinin과 결합된 horseradich peroxidase를 이용하여 고양이의 전방십자인대의 신경말단으로부터 척수까지의 신경로의 존재를 보고하였으나, 그들의 연구도 구심성 신경로의 연구가 척수까지만 이루어졌다는 한계가 있었다. Pitman 등³¹⁾이 인간을 대상으로 관절경 시행 중 전방십자인대에 전기적 자극을 주어 체성감각 유발 전위를 대뇌피질에서 측정함으로 전방십자인대로부터 중추신경계로 전달되는 신경로의 존재의 직접적인 증거를 제공하였다. 그러나 이 연구도 전방십자인대에서부터 대뇌피질로

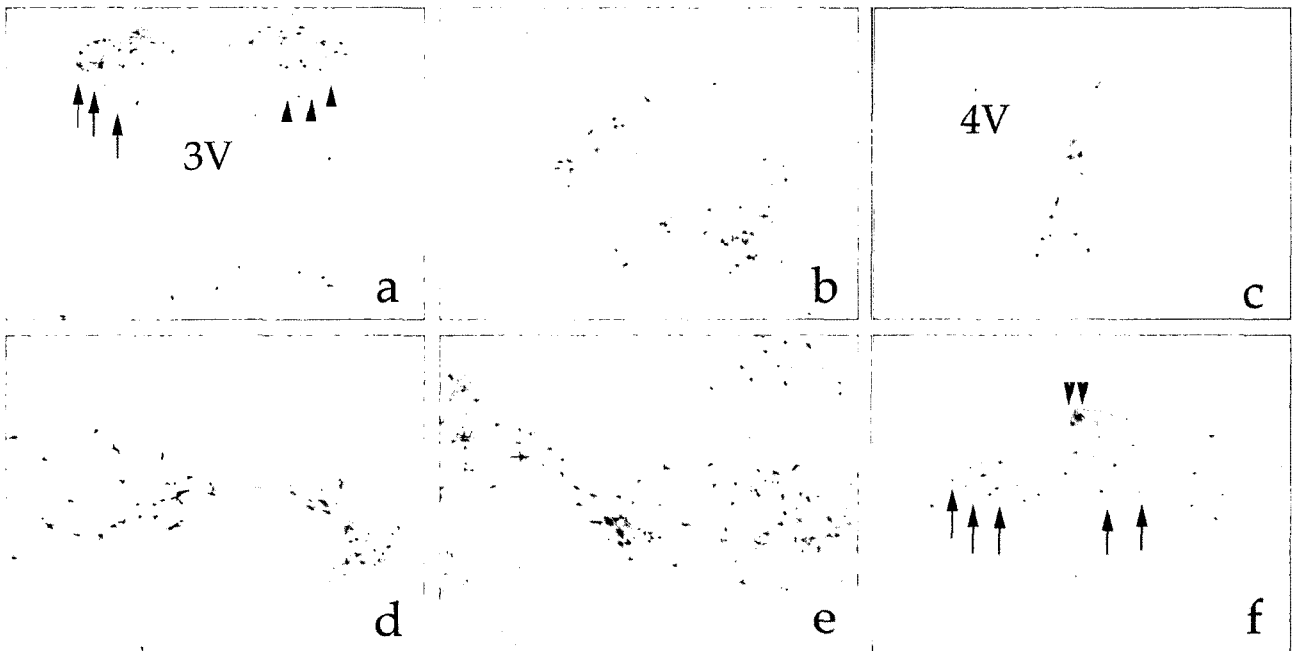


Fig. 2. PRV-immunoreactive neurons in the brain stem and cerebrum (× 40) a: Paraventricular nucleus(3V: the third ventricle, arrows: injection side, arrowheads: non injection side); b: Mesencephalic reticular nucleus; c: Locus ceruleus (4V: the fourth ventricle); d: Paragiantocellular reticular nucleus; e: Magnocellular reticular nucleus; f: nucleus tractus solitarius (arrows), and the area postrema (arrowheads)

연결되는 신경전달경로의 중간부를 밝힐 수는 없었다는 한계가 있었다. 본 연구는 전방십자인대의 신경말단에서부터 대뇌 피질까지의 모든 구심성 신경로를 형태학적으로 밝히기 위하여 시행되었다. 척수에서 신경핵의 표지양상이 PRV를 주입한 쪽과 주입하지 않은 쪽이 다르게 나타나는 것은 여러 종류의 체성감각로가 존재하기 때문이라고 생각한다. 구심성 감각로를 이루는 척수신경세포에는 일차 구심성 신경세포, 운동 신경세포, 개재신경세포, 척수고유로 신경세포, 상향로 신경세포 등으로 나누어지며, 개재신경세포와 단축삭돌기 섬유단 신경세포(short axoned funicular neurons)는 동일 혹은 인접한 척수분절들로 축삭돌기를 뺀 국소적 역할을 수행한다고 하며, 척수고유로 신경세포는 척수분절을 건너가서 신경활동을 통합하고 조절하는 기능을 한다고 한다²²⁾. 상향로 신경세포는 상위척수신경세포와 연결되어 감각정보를 뇌로 전달하는 기능을 한다. 본 실험에서 가해진 것과 같은 동통은 말초신경 말단으로부터 여러 구심성 신경로를 통해 상위 척수신경세포로 전달된다. 동통자극은 동측의 배측 척수신경절의 일차명령 신경세포를 통해, 후각의 이차명령신경세포로 전달된다: 이차명령신경세포의 축삭돌기는 반대편으로 전달되어 반대측의 상위척수신경세포로 동통자극을 전달하지만 일부의 이차명령신경세포의 축삭돌기는 동측의 상위 신경로를 따라간다. 후시냅스 통증 전달로는 동측으로 여러 단계의 연계를 거쳐 상위 척수부의 신경세포로 전달된다. 각 부위 중 요추부에서 좌우 표지강도가 다른 것은 실험쥐의 십자인대가 요추 3, 4, 5, 6 신경근으로 이루어진 대뇌신경의 후방관절분지의 여러 구심신경과 연관된 것으로 판단되며^{2,12)} 요추부의 신경세포들과 구심성 상위척수로의 신경세포들 사이에 중계 신경세포들의 존재를 시사하는 것이라고 생각한다. 경추의 동통로는 이차명령신경세포에서 짧은 전달 경로로 경추 1번, 2번 외측경추핵에 도달한다¹⁾. 이상의 정보들로 본 연구의 흉수 및 경수 신경핵들의 좌우의 다른 표지양상도 설명할 수 있다고 생각한다. 저자들은 흉수의 표지양상은 쥐의 전방 십자인대 신경말단으로부터 체성감각을 상위 신경세포로 중계하는 척수고유로 신경세포나 그 외의 다른 신경세포들의 존재를 시사한다고 생각한다. 특히 망상활성계에서 중뇌망상핵, 확대세포망상핵, 부거대세포망상핵, 거대세포망상핵에서 강 양성의 신경표지 양상을 보였다. 망상활성계 중 확대세포망상핵, 부거대세포망상핵, 거대세포망상핵은 말단신경으로부터 들어온 유해자극을 받아 처리하는 역할과, 유해 기계적 자극에 반응하는 역할을 한다^{3,6,13,16,37)}. 청색반점은 동통자극을 변화시켜 척수 및 뇌간 신경세포로 전달한다²³⁾. 본 결과는 전방십자인대의 유해자극에 대한 구심성 통로의 존재를 증명하였다고 생각한다. 뇌간의 망상활성계의 또 다른 역할은 골격근육의 긴장상태와 반사 활동을 중계하는 것이다^{17,19,24)}. 여러 연구에 의하면 확대세포망상핵, 부거대세포망상핵, 거대세포망상핵, 청색반점은 근육의 활동과 긴장상태에 관여한다고 알려져 있으나^{10,17,29,30)} 본 연구만으로는 이들 기저핵과 근육의 활동과의 직접적인 연관 관계를 증명할 수는 없었

다. PRV를 이용한 신경로 추적의 한계는 유해자극과 고유수용감각을 구별할 수 없다는 것이다. 세포수준에서 바이러스가 신경세포를 감염시키면, 그 바이러스는 신경핵속으로 들어가 증식한 후, 골지 복합체로부터 이중막을 얻고, 시냅스로 이동하여 외벽은 세포에서 빠져나올 때, 내벽은 세포로 들어갈 때 이용한다. 즉 신경 세포의 시냅스간 감염을 일으켜 그 증식이 연계되어 가는 것이다⁵⁾. 그러나 PRV는 여러 단계의 시냅스 추적에는 아주 효과적이나, 비특이적으로 시냅스를 건너 모든 종류의 감각로를 추적함으로 유해자극과 고유수용체 감각을 구별할 수 없다는 한계가 있다. 현재 신경생리적 지식은 각각의 척수신경, 망상활동계, 대뇌의 핵의 기능을 연구하고 있는 중이며, 아직 완전히 이해하지는 못하고 있다. 이 연구로 전방 십자인대의 신경말단이 각각의 기저핵으로 구심성 신경연결을 가진다는 사실을 밝혔다. 하지만 이들 기저핵들이 전방십자인대의 기능에 관여하는 역할을 규명하기 위해서는 추후 더 많은 연구가 필요할 것이다.

결 론

본 연구에서는 쥐 전방십자인대의 신경말단에서 척수, 뇌간 및 대뇌의 기저핵까지 형태학적으로 그 연결을 밝혔으며, 특히 망상활성계의 기저핵중 중뇌망상핵, 확대세포망상핵, 부거대세포망상핵, 거대세포망상핵에서 강 양성의 표지발현이 있음을 보였다. 이는 망상활성계가 쥐의 전방십자인대의 신경말단으로부터 대뇌피질에 이르는 구심성체성감각 신경로에 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다.

참고문헌

1. Almeida TF, Roizenblatt S and Tufik S: *Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. Brain Res, 12; 1000: 40-56, 2004.*
2. Asato F, Butler M, Blomberg H and Gordh T: *Variation in rat sciatic nerve anatomy: implications for a rat model of neuropathic pain. J Peripher Nerv Syst, 5: 19-21, 2000.*
3. Burton H: *Somatic sensory properties of caudal bulbar reticular neurons in the cat (Felis domestica). Brain Res, 11: 357-72, 1968.*
4. Card JP, Levitt P and Enquist LW: *Different Patterns of Neuronal infection after intracerebral injection of two strains of pseudorabies virus. J. Virol, 72: 4434-41, 1998.*
5. Card JP, Rinaman L, Lynn RB et al.: *Pseudorabies virus infection of the rat central nervous system: ultrastructural characterization of viral replication, transport, and pathogenesis. J. Neurosci, 13: 2515-39, 1993.*
6. Casey KL: *Somatic stimuli, spinal pathways, and size of*

- cutaneous fibers influencing unit activity in the medial medullary reticular formation. *Exp Neurol*, 25: 35-56, 1969.
7. **Cho SH, Park HB, Song HR et al.:** Change in sports activity after arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction using bone-patella tendon-bone autograft in patients with sports injury. *J Kor Sports Medicine*, 19, 8-13, 2001.
 8. **Craig AD, Heppelmann B and Schaible HG:** The projection of the medial and posterior articular nerves of the cat's knee to the spinal cord. *J Comp Neurol*, 276: 279-88, 1988.
 9. **Enquist LW and Card JP:** Pseudorabies virus: a tool for tracing neuronal connections, in: Lowenstein PR, Enquist LW (Eds.), *Protocols for Gene Transfer in Neuroscience: Towards Gene Therapy of Neurological Disorders*, Wiley, Chichester, UK, 333-348, 1996.
 10. **Fung SJ, Manzoni D, Chan JY et al.:** Locus Coeruleus control of spinal motor output. *Prog Brain Res*, 88: 395-409, 1991.
 11. **Gerendai I, Toth IE, Boldogkoi Z, Medveczky I and Halasz B:** CNS structures presumably involved in vagal control of ovarian function. *J Auton Nerv Syst*, 80: 40-5, 2000.
 12. **Gelder JB and Chopin SF:** The vertebral level of origin of spinal nerves in the rat. *Anat Rec*, 188: 45-7, 1977.
 13. **Goldman PL, Collins WF, Taub A and Fitzmartin J:** Evoked bulbar reticular unit activity following delta fiber stimulation of peripheral somatosensory nerve in cat. *Exp Neurol*, 37: 597-606, 1972.
 14. **Gomez-Barrena E, Martinez-Moreno E and Munuera L:** Segmental sensory innervation of the anterior cruciate ligament and the patellar tendon of the cat's knee. *Acta Orthop Scand*, 67: 545-52, 1996.
 15. **Grigg P:** Properties of sensory neurons innervating synovial joints. *Cells Tissues Organs*, 169: 218-25, 2001.
 16. **Haigler HJ and Spring DD:** Substance P, morphine and methionine-enkephalin: effects on spontaneous and evoked neuronal firing in the nucleus reticularis gigantocellularis of the rat. *Eur J Pharmacol*, 67: 65-74, 1980.
 17. **Hajnik T, Lai YY and Siegel JM:** Atonia-related regions in the rodent pons and medulla. *J Neurophysiol*, 84: 942-8, 2000.
 18. **Halata Z and Haus J:** The ultrastructure of sensory nerve endings in human anterior cruciate ligament. *Anat Embryol (Berl)*, 179: 415-21, 1989.
 19. **Halata Z, Wagner C and Baumann KI:** Sensory nerve endings in the anterior cruciate ligament (*Lig. cruciatum anterius*) of sheep. *Anatomical record* 254: 13-21, 1999.
 20. **Husak PJ, Kuo T and Enquist LW:** Pseudorabies Virus Membrane Proteins gI and gE facilitate anterograde spread of infection in projection-specific neurons in rat. *J. Viro*, 74: 10975-83, 2000.
 21. **Jasmin L:** Pseudorabies virus as a neuroanatomical tracer. *J Neurovirol* 1: 326-7, 1995.
 22. **Jankowska E:** Interneuronal relay in spinal pathways from proprioceptors. *Prog Neurobiol*, 38: 335-78, 1992.
 23. **Jones SL and Gebhart GF:** Inhibition of spinal nociceptive transmission from the midbrain, pons and medulla in the rat: activation of descending inhibition by morphine, glutamate and electrical stimulation. *Brain Res*, 460: 281-96, 1988.
 24. **Juch PJ, Schaafsma A and van Willigen JD:** Brainstem influences on biceps reflex activity and muscle tone in the anaesthetized rat. *Neurosci Lett*, 140: 37-41, 1992.
 25. **Kennedy JC, Alexander IJ and Hayes KC:** Nerve supply of the human knee and its functional importance. *Am J Sports Med*, 10: 329-35, 1982.
 26. **Laboratory Biosefety Manual;** World Health Organisation. 2nd Edition, 1993.
 27. **Loewy AD:** Viruses as transneuronal tracers for defining neural circuits. *Neurosci Biobehav Rev*, 22: 679-84, 1998.
 28. **Martin X and Dolivo M:** Neuronal and transneuronal tracing in the trigeminal system of the rat using the herpes virus suis. *Brain Res*, 273: 253-76, 1983.
 29. **Mileykovskiy BY, Kiyashchenko LI and Siegel JM:** Muscle tone facilitation and inhibition after orexin-a (hypocretin-1) microinjections into the medial medulla. *J Neurophysiol*, 87: 2480-9, 2002.
 30. **Mileikovskii BYU, Kiyashchenko LI and Titkov ES:** Changes in neuron activity in the dorsolateral part of the pons during stimulation of areas of the brainstem inhibiting movement and muscle tone. *Neurosci Behav Physiol*, 31: 641-6, 2001.
 31. **Pitman MI, Nainzadeh N, Menche D et al.:** The intraoperative evaluation of the neurosensory function of the anterior cruciate ligament in humans using somatosensory evoked potentials. *Arthroscopy*, 8: 442-7, 1992.
 32. **Schenk I, Spaethe A and Halata Z:** The structure of sensory nerve endings in the knee joint capsule of the dog. *Anat Anz*, 178: 515-21, 1996.
 33. **Schutte MJ, Dabezies EJ, Zimny ML and Happel LT:** Neural anatomy of the human anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg Am*, 69: 243-7, 1987.

34. **Schultz RA, Miller DC, Kerr CS and Micheli L:** *Mechanoreceptors in human cruciate ligaments. A histological study. J Bone Joint Surg Am, 66: 1072-6, 1984.*
35. **Song EK, Kim HS, Han HJ, Bae CS and Yoon JR:** *Innervation of human cruciate ligaments. J Kor Arthro Soc, 4: 197-207, 1992.*
36. **Strack AM, Sawyer WB, Hughes JH et al.:** *A general pattern of CNS innervation of the sympathetic outflow demonstrated by transneuronal pseudorabies viral infection.. Brain Res, 491: 156-162, 1989.*
37. **Willis WD, Jr.:** *Pain pathways in the primate. Prog Clin Biol Res, 176: 117-33, 1985.*

= ABSTRACT =

Somatosensory Afferent Pathway Tracing from Rat Anterior Cruciate Ligament Nerve Endings to Cerebral Cortex Using Pseudorabies Virus

Jin-Su Kim, M.D., Hyung-Bin Park, M.D.,
Soon-Taek Jeong, M.D., Se-Hyun Cho, M.D., PhD

*Department of Orthopaedic Surgery, College of Medicine,
Gyeong Sang National University, Jinju, Korea*

Purpose: The anterior cruciate ligament(ACL) has a neuromuscular control function as evidenced by the presence within it of mechanoreceptor. Although these mechanoreceptors have been identified, the afferent somatosensory pathways from ACL to the cerebrum have yet to be demonstrated in their entirety. In order to trace these afferent pathway, we conducted a viral trans-synaptic tracing experiment using the neurotropic pseudorabies virus(PRV).

Material and Methods: The PRV was injected into the ACL of rats and allowed to replicate and spread trans-synaptically for 6 to 7 days. The brain and spinal cord of each sacrificed rat was then removed and processed immunohistochemically to detect the presence of PRV.

Results: PRV-immunoreactive neurons were found to be localized in several different regions from the spinal cord to the cerebrum. Four nuclei in the reticular formation of the brain stem demonstrated strong positive labeling: the mesencephalic reticular nucleus, magnocellular reticular nucleus, paragi-gantocellular reticular nucleus, and gigantocellular reticular nucleus.

Conclusions: This finding suggests that the nerve endings of the rat ACL project into the cerebrum and that the reticular formation may play an important role in the afferent pathway of those nerve endings.

Key Words: Somatosensory afferent pathway, Anterior cruciate ligament, Nerve endings, Pseudorabies virus, Rat

Address reprint requests to **Hyung-Bin Park, M.D.**

Department of Orthopaedic Surgery, College of Medicine, Gyeong Sang National University,
90 Chilam-dong, Jinju, Gyeongnam, Korea

TEL: 82-55-750-8688, FAX: 82-55-761-9477, E-mail: hbpark@nongae.gsnu.ac.kr