

골격근섬유로 채워진 Gore-Tex[®] 도관을 이용한 신경재생에 있어서 Valproic Acid의 효과

강낙현¹ · 오현배¹ · 이기호¹ · 김종구²

충남대학교 의과대학 성형외과학교실¹, 을지대학교 의과대학 성형외과학교실²

Valproic Acid Effect in Nerve Regeneration Using Gore-Tex[®] Tube Filled with Skeletal Muscle

Nak Heon Kang, M.D.¹, Hyeon Bae Oh, M.D.¹,
Ki Ho Lee, M.D.¹, Jong Gu Kim, M.D.²

¹Department of Plastic & Reconstructive Surgery, College of
Medicine, Chungnam National University, Daejeon,

²Department of Plastic & Reconstructive Surgery, Eulji Medical
College, Daejeon, Korea

As the large defect of peripheral nerve occurs, the autologous nerve graft is the most ideal method but it has many limitations due to donor site morbidities. Various materials have been developed for the nerve defect as the conduits, but none of these materials is satisfactory. Among them, Gore-Tex[®] tube seems to be one of the most ideal nerve conduit materials at peripheral nerve defect. Many researches have focused on finding the neurotrophic factors. It is recently demonstrated that Valproic acid(VPA) has an effect of axonal regeneration as a neurotrophic factor without enzymatic degradation and toxicity problems. The purpose of this study is to evaluate the effect of VPA on the nerve regeneration at the peripheral nerve defect. A 10 mm gap of rat sciatic nerve was made and Gore-Tex[®] tube filled with biceps femoris muscle was placed at the nerve defect site. We let the rat take VPA as drinking water in experimental group and did not give VPA to the control group. We estimated the results as electrophysiologic and histological aspects for 16 weeks after the surgery. The nerve conduction velocity, total myelinated axon count, myelin sheath thickness and mean nerve fiber diameter significantly increased in VPA-treated experimental group when compared to the control ($p < 0.05$). From the above results, we conclude that VPA promotes the nerve regeneration at the peripheral nerve defect site. It is suggested that Gore-Tex[®] tube filled

with skeletal muscle and VPA administration may be a good substitute for autologous nerve graft.

Key Words: Gore-Tex[®] tube, Valproic acid

I. 서 론

결손의 범위가 큰 말초신경을 복원하는 경우에는 자가 신경이식술이 가장 좋은 방법이지만 공여신경의 기능손실이나 제한성 및 결과의 불확실성 등의 많은 문제점이 있어 최근 신경이식술을 대체할 방법에 대한 관심이 높아지고 있다.¹ 따라서 다양한 재료로 만들어진 신경도관을 이용하여 말초신경결손을 복원하려는 노력과 이상적인 신경도관을 찾기 위한 연구를 계속하고 있는데, 그 중에서도 Gore-tex[®]는 현재까지 알려진 것 중에 가장 이상적인 신경도관으로 생각되고 있다.² 도관술(tubulization)과 함께 신경재생을 촉진하는 또 하나의 방법으로 정맥도관(vein conduit) 내에 골격근섬유를 삽입하거나,³ 실리콘 도관 내에 아교질(collagen), 라미닌(laminin), 섬유결합소(fibronectin) 등을 채워서 신경결손의 재생에 대한 연구도 보고되었다.⁴ 이들 아교질, 라미닌 및 섬유결합소는 재생되는 축삭의 성장원추사족(growth cone filopodia)과 접촉하여 표적기관까지 도달하게 하는 신경돌기촉진요소(neurite promoting factor)로 알려져 있으나, 만일 gel의 농도가 적절하지 않은 경우에는 신경영양성요소(neurotrophic factor)의 확산과 축삭 성장을 방해할 수 있는 단점을 가지고 있다. 이에 반해 골격근섬유는 신경집세포(Schwann cell) 보다 더 많은 기저판(basal laminae)을 갖고 있어 풍부한 라미닌과 섬유결합소에 의해 자라나오는 축삭을 안내할 수 있다는 장점이 있다.^{3,5} 한편 신경영양성요소의 개념과 신경성장요소(nerve growth factor)가 발견된 이래 최근까지도 여러 가지 신경 성장 촉진물질에 대한 연구가 계속되고 있는데, 신경재생을 촉진하는 것으로 알려진 신경영양성요소로는 S-100 β , thyroid hormone, valproic acid(VPA) 등이 있으며 VPA를 제외하고는 전신투여 시 독성과 효소 파괴에 의한 효능 감소 때문에 국소투여나 도관 안에 주입해야 하는 단점이 있다.^{6,8} 또한 VPA는 분자량이 작기 때문에 혈액뇌장벽(blood-brain

Received November 25, 2005

Revised February 3, 2006

Address Correspondence: Ki Ho Lee, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Chungnam National University Hospital, 640 Daesa-dong, Jung-gu, Daejeon 301-721, Korea. Tel: 042) 220-7380 / Fax: 042) 220-7384 / E-mail: plasu3769@hanmail.net

barrier)을 빠르게 통과할 수 있는 특징을 가지고 있으며, 간질치료제(anti-epileptic drug) 및 기분안정제(mood stabilizer)로 임상에서 널리 사용되고 있다.

그러나 신경영양성요소로서, VPA가 중추신경계와 말초신경계에서 손상된 신경원(neuron)의 생존과 축삭 절단 후 축삭 재생과 운동기능 회복을 향상시킨다는 보고는 있었으나,⁷ 신경결손 부위에서 신경도관을 연결한 후 신경재생이 촉진되는지에 대한 연구는 아직까지는 없는 실정이다. 따라서 저자들은 흰쥐를 사용하여 좌골신경에 결손을 만들고 Gore-tex[®](W.L Gore & Associates, AZ, USA)도관 안에 골격근섬유를 삽입한 후 valproic acid를 투여하여 말초신경 재생에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였다.

II. 재료 및 방법

가. 실험동물

체중 230 - 250 gm의 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐 30마리를 사용하였으며, 1마리씩 우리에게 나누어 같은 조건에서 사육하였다.

나. 실험방법

실험은 15마리씩 두 개의 군으로 나누어 시행하였고 모든 실험동물에 5% ketamine hydrochloride를 체중 kg당 10 mg을 복강내부에 주입하여 마취시킨 후, 복외위로 사지를 고정하였다. 좌측 대퇴부 후면의 털을 깎고 povidone-iodine으로 소독하였다. 대퇴부 바깥쪽에 대퇴골과 평행하게 3 cm 피부절개를 한 후 대퇴근막을 절개한 다음 대퇴이두근을 아래쪽으로 당기면서 좌골신경을 노출시키고 인위적으로 10 mm의 신경 결손을 만들었다.

두께 0.5 mm와 30 μ m의 기공을 갖고 있는 Gore-Tex[®]를 내경 1.8 mm, 길이 14 mm로 만들고 직경 1.6 mm, 길이 10 mm의 대퇴이두근의 조각을 채취하여 도관 안에 삽입한 후 양쪽 신경 말단부가 2 mm씩 겹치도록 하고 10/0 nylon으로 각각 4군데씩 봉합한 다음 근육은 4/0 vicryl로, 피부는 4/0 nylon으로 단순 봉합하였다. lincomycin을 0.1 mg/100 gm의 농도로 희석하여 반대쪽 둔부에 근육주사하였다. 실험군에서는 매일 valproic acid(Sigma, St. Louis, USA) 300 mg/kg을 먹는 물에 녹여 투여하였으나 대조군에서는 투여하지 않았다. 수술 16주 후 전기생리학 및 조직학적 검사를 시행하였다.

다. 관찰방법

1) 전기생리학적 검사

16주 후 Gore-Tex[®]도관에 가느다란 은으로 만든 전기

자극 전극을 장착하고, 기록 전극은 족척근(plantaris)에 장착시켰다. 컴퓨터에 연결된 Nicolet compass meridian system(Nicolet biomedical Ins.)을 이용, 주파수 범위 2 - 10Hz, 자극 강도 0.39 mA, 자극 지속시간 100 μ sec, sweep speed 1 msec/division으로 시행하여 복합근육 활동전위(compound muscle action potential)의 기시잠시(onset latency)를 얻었으며, 자극 전극과 기록 전극 사이의 거리(0.05 m)를 측정하여 신경전도속도(nerve conduction velocity: m/s)를 계산하였다.

2) 조직학적 검사

a. 광학현미경 관찰

좌골신경에 이식된 Gore-tex[®]도관의 원위부위를 채취한 후, 2.5% glutaraldehyde 용액과 2.0% osmium tetroxide 용액에 고정하고 epon resin에 포매한 다음, 24시간 후에 microtome으로 절단하고 toluidine blue로 염색하여 사진광학현미경(Olympus BH-2, Japan)으로 100배, 400배로 확대한 사진을 촬영하였다.

b. 전자현미경 관찰

조직을 60 - 70 nm 두께로 절단하여 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하여 전자현미경(TEM Hitach H-600, Japan)으로 관찰하였다. IMT i-solution version 3.0의 image analyzer software(IMTechnology, 대전)를 이용하여 총 유수화 축삭 수(total myelinated axon count), 평균 수초두께(mean myelin sheath thickness) 및 평균 신경섬유직경(mean nerve fiber diameter)을 측정하였다.

3) 통계학적 검정

SPSS program(Version 11.5)을 이용하여 분석하였으며, 측정치는 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 대조군과 실험군간의 유의성은 independent T-test로 하였고 통계적인 유의수준 0.05 미만에서 검증하였다.

III. 결 과

가. 전기 생리학적 검사

신경전도속도는 실험군에서는 37.14 ± 4.28 m/s로, 대조군 28.92 ± 4.19 m/s보다 유의하게 증가하였다($p < 0.05$) (Table I).

나. 조직학적 검사

1) 광학현미경 소견

실험군에서 더 많은 숫자의 모양이 일정하며 수초 두께가 두꺼운 유수화 축삭이 보였고, 신경섬유의 크기 또한 더 커서 정상 신경에 가까운 양상을 보였다(Fig. 1).

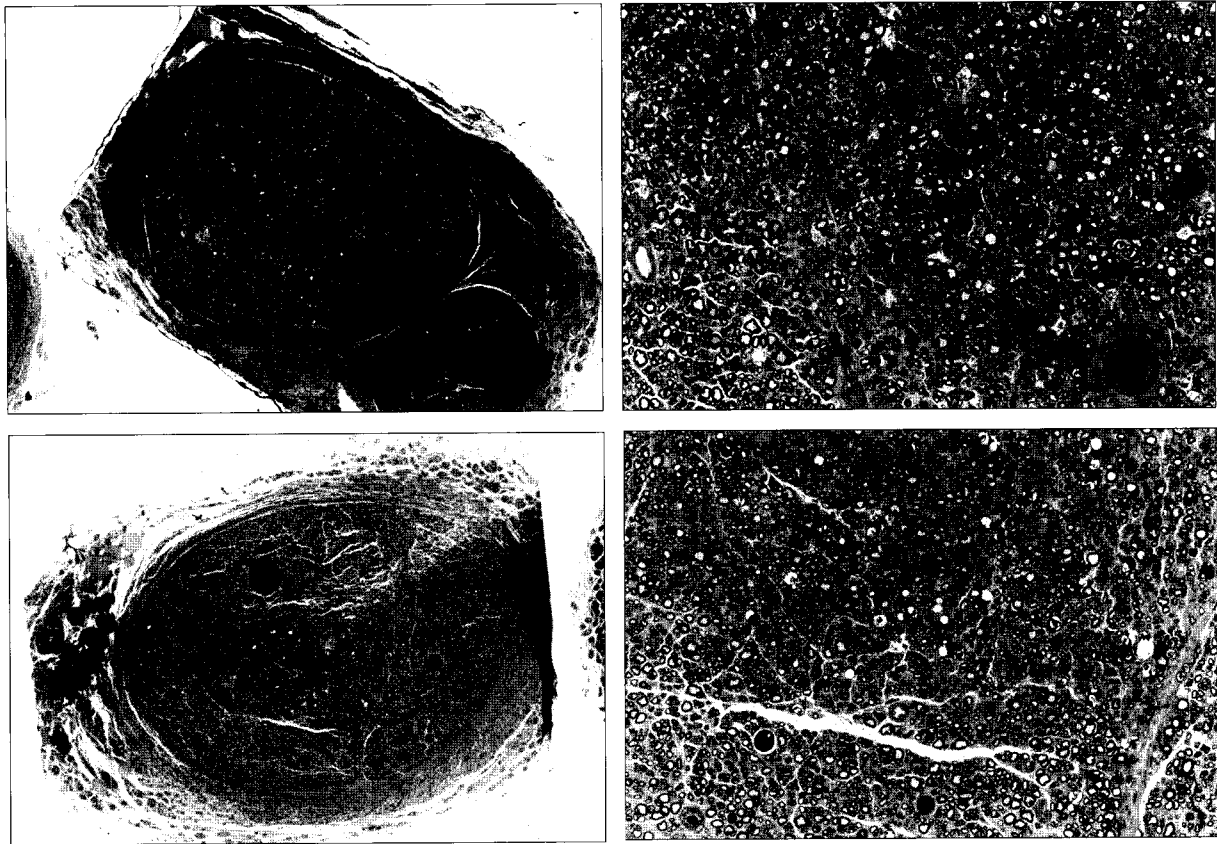


Fig. 1. Light photomicrographs of regenerated nerve(toluidine blue stain). (Above, left) Experimental nerve($\times 100$). (Above, right) Experimental nerve($\times 400$). (Below, left) Control nerve($\times 100$). (Below, right) Control nerve($\times 400$). The experimental group was shown well myelinated regenerating axons and nearly normal morphology compared to the control group.

Table I. Nerve Conduction Velocity of Experimental and Control Group

| | Nerve conduction velocity (m/s) | |
|---------|---------------------------------|-------------------|
| | E | C |
| 1 | 36.11 \pm 4.86* | 30.541 \pm 3.54 |
| 2 | 39.40 \pm 3.70* | 28.381 \pm 3.86 |
| 3 | 33.90 \pm 4.39 | 29.221 \pm 4.23 |
| 4 | 41.89 \pm 4.17* | 27.981 \pm 4.15 |
| 5 | 32.39 \pm 4.61 | 29.041 \pm 3.77 |
| 6 | 40.15 \pm 3.95* | 28.541 \pm 4.22 |
| 7 | 35.03 \pm 4.55* | 29.121 \pm 4.08 |
| 8 | 42.78 \pm 4.01* | 28.041 \pm 3.96 |
| 9 | 31.55 \pm 4.43 | 29.561 \pm 3.94 |
| 10 | 41.37 \pm 4.13* | 28.241 \pm 3.52 |
| 11 | 32.83 \pm 4.34 | 28.441 \pm 4.34 |
| 12 | 42.71 \pm 4.22* | 28.901 \pm 4.58 |
| 13 | 31.51 \pm 4.45 | 29.831 \pm 4.89 |
| 14 | 37.23 \pm 4.12* | 30.451 \pm 4.76 |
| 15 | 38.15 \pm 4.29* | 27.521 \pm 5.01 |
| average | 37.14 \pm 4.28* | 28.921 \pm 4.19 |

* $p < 0.05$, E: Experimental group, C: Control group

2) 전자현미경 소견(Fig. 2)

a. 유수화 축삭 수

실험군에서 1408 \pm 145개, 대조군에서는 987 \pm 248개가 보여 대조군보다 실험군에서 유의하게 증가하였다($p < 0.05$).

b. 평균 수초두께

실험군에서 0.82 \pm 0.39 μm , 대조군에서는 0.62 \pm 0.43 μm 로 측정되어 실험군에서 대조군에 비해 유의하게 증가되었다($p < 0.05$).

c. 평균 신경섬유직경

실험군에서 4.08 \pm 0.29 μm , 대조군에서는 3.58 \pm 0.1 μm 로 측정되어 실험군에서 통계학적으로 유의하게 증가되었다($p < 0.05$).

IV. 고 찰

말초신경결손의 범위가 큰 경우에 필요한 자가 신경이식술과 이를 대체할 방법에 대한 관심이 높아지면서 최근 까지 생체 재료를 포함하여 다양한 재료로 만들어진 도관을 이용해서 말초신경결손을 복원하려는 신경도관술과

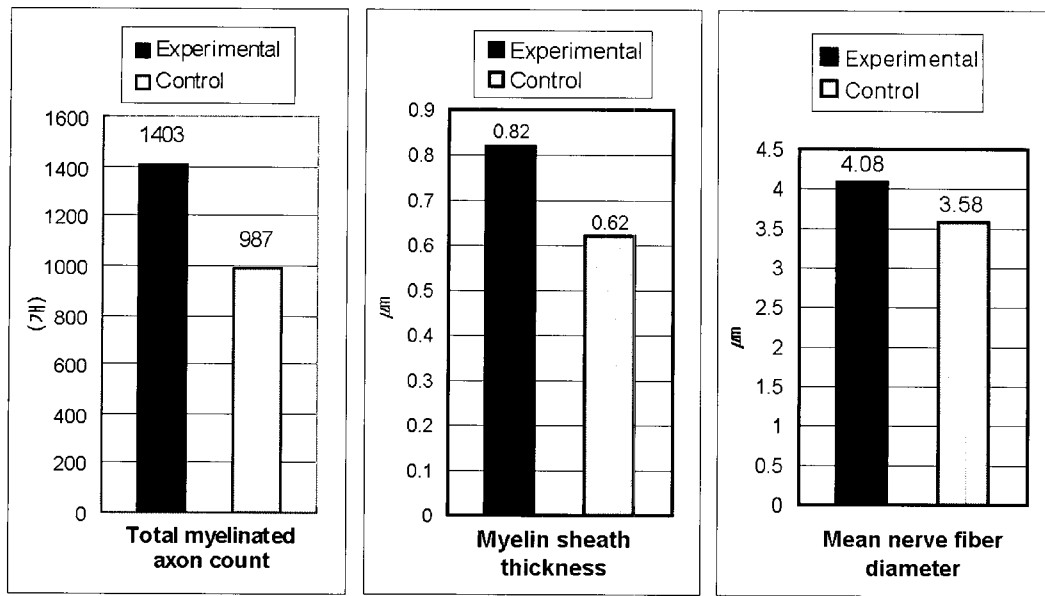


Fig. 2. Comparison of total myelinated axon count, myelin sheath thickness, and mean nerve fiber diameter between experimental and control group.

이상적인 신경도관을 찾기 위한 연구가 계속되고 있다.¹ 여러 가지 신경도관 중 실리콘 도관을 이용하여 신경재생에 대한 연구가 있었으나,⁹ 실리콘 도관은 만성적인 신경 압박을 유발시키므로 제거하여야 하며, 기공이 없어 산소 및 영양분 공급이 제한되어 축삭이 10 mm 이상 자라나가지 못하는 단점이 있고, 정맥 및 동맥 신경도관은 길이가 1 cm 이상인 경우 적절한 내경을 유지하지 못하고 붕괴되어 원위 신경 말단부에서 분비되는 신경영양성요소의 확산과 축삭의 성장을 방해하는 문제점이 있다.³ 이에 반해 Gore-tex[®]는 기공성을 지닌 반투과성 도관으로 신경재생에 필요한 영양분과 성장요소를 도관 내로 받아들여면서 신경재생에 방해가 되는 큰 물질은 들어오지 못하게 하는 장점이 있어² 현재까지 알려진 것 중에 가장 이상적인 신경도관으로 생각되고 있다.

신경이 절단되면 절단 원위부에서 축삭과 수초는 월러 변성(wallerian degeneration)이 일어나며 변성된 축삭과 수초는 혈액에서 동원된 대식세포(macrophage)와 증가된 신경집세포에 의해 제거된다. 신경손상 초기에 대식세포는 변성된 수초를 제거하는 기능과 더불어 혈소판기원성 성장인자(platelet-derived growth factor), 섬유모세포성장인자(fibroblast growth factor), interleukin-1(IL-1) 등의 신경영양성요소를 분비하여 신경재생을 촉진한다. 신경재생에서 중요한 신경집세포는 대식세포에서 분비되는 IL-1, 섬유모세포성장인자-2에 반응하여 월러 변성 초기에 증식되며 신경집세포기원 신경영양성요소(Schwann cell-derived neurotrophic factor)인 신경성장요소, 뇌기원 신경영양성

요소(brain-derived neurotrophic factor), 섬모 신경영양성요소(ciliary neurotrophic factor), insulin-like growth factor-1(IGF-1)을 분비하여 신경재생에 중요한 역할을 한다.^{5,10-12} 신경재생을 촉진하는 것으로 알려진 신경영양성요소로는 이외에도 S-100 β , thyroid hormone, VPA 등이 있다. 또한 월러 변성 초기에 대식세포에 의해 증식된 신경집세포는 여러 가지의 신경영양성요소의 분비와 더불어 band of Bunge로 알려진 신경집세포주(Schwann cell column)를 만들어 자라나오는 축삭의 성장원추를 받아들여 수초를 다시 형성하면서 축삭이 적당한 표적기관에 도달하게 하는 안내 역할을 한다. 축삭이 신경집세포주를 통해 자라나오는 기전은 신경집세포가 자신의 표면에 기저판을 만들고 그 안에는 신경돌기촉진요소인 라미닌과 섬유결합소가 풍부해서 이것들이 축삭 성장원추의 사족과 접촉하기 때문에 설명된다.⁵

한편, 신경재생을 촉진하는 또 다른 방법으로 도관 내에 라미닌, 섬유결합소, 아교질, 골격근섬유를 채우는 방법이 연구되어 왔다.^{3,4} 라미닌, 섬유결합소, 아교질은 불용해성 세포외기질 분자(insoluble extracellular matrix molecules)로서 위에서 언급했듯이 신경돌기촉진요소로 알려져 있으나, gel의 농도가 적절하지 않은 경우에는 신경영양성요소의 확산과 축삭 성장을 방해할 수 있는 단점이 있다. 또한 신경재생에 중요한 신경집세포를 도관 내에 주입하여 신경재생에 좋은 결과를 얻은 보고도 있었으나, 이것을 배양한데에는 기술 및 장비가 필요하며 7-10일 정도 소요되는 단점이 있다.¹³

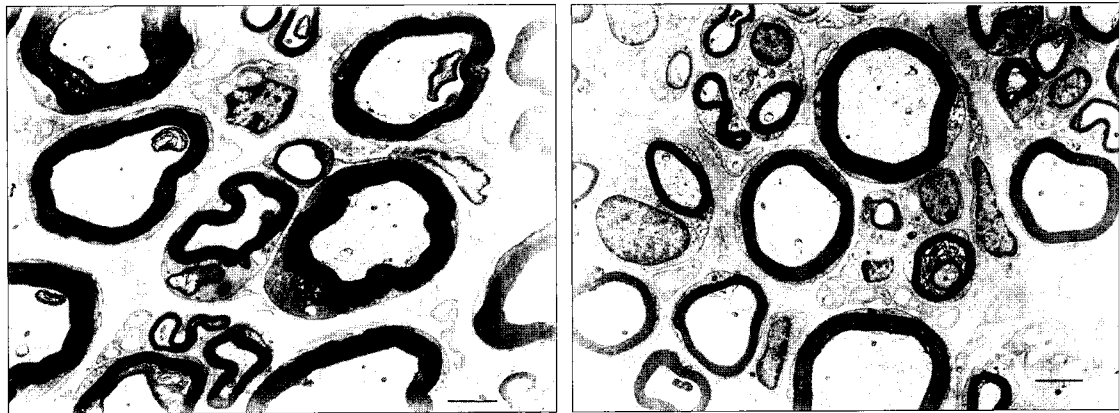


Fig. 3. Electron Photomicrographs of Regenerated Nerve($\times 3,000$). (Left) Experimental nerve. (Right) Control nerve. Experimental nerves are shown well myelinated regenerating axons, larger fiber diameter and myelin thickness.

저자들이 실험에서 Gore-tex[®]도관 내에 골격근섬유를 선택한 이유는 골격근섬유는 이런 단점들이 없으면서 수술 중 쉽게 얻을 수 있고 신경집세포 기저판보다 10배 많은 기저판을 갖고 있어 기저판 내에 풍부한 라미닌과 섬유 결합소에 의해 자라나오는 축삭을 안내할 수 있기 때문이다.^{3,5}

VPA는 내인성 신경영양성요소가 작용하는 세포의 신호 조절 활성효소 경로(extracellular signal regulated kinase pathway)를 직·간접으로 활성화시켜 growth cone-associated protein 43과 신경영양성요소를 증가시키는 임상에서 항 경련과 조음증 치료에 안정성이 입증된 약물이며, 수용성으로 전신투여가 쉽고 혈액뇌장벽을 통과할 수 있어 중추신경과 말초신경 모두에서 신경재생을 촉진할 수 있다. 이에 반해 지금까지 알려진 신경영양성요소들을 전신 투여할 때 혈액에서 효소 파괴에 의해 효능이 떨어지며, 독성이 나타날 수 있고, 혈액뇌장벽을 통과할 수 없으므로 중추신경에 작용을 할 수 없다.⁸

본 연구에서는 골격근섬유를 삽입한 Gore-tex[®]도관 이식술과 VPA를 투여한 실험군에서, 이를 투여하지 않은 대조군에 비해 16주 때 의미있게 증가된 유수화 축삭 수, 수초두께 및 신경섬유직경을 보였으며 전기생리 검사에서도 유의하게 증가된 신경전도속도가 나타났는데 이는 VPA가 신경재생을 촉진시켰기 때문이라고 사료된다.

결론적으로 성형외과영역에서 신경 결손의 범위가 클 경우 Gore-tex[®]도관 이식술과 함께 VPA를 투여함으로써 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료되며 다른 신경영양성요소와의 비교 연구도 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

Valproic acid가 말초신경의 재생에 미치는 영향을 알아

보기 위해서 흰쥐의 좌골신경에 10 mm의 신경 결손을 만들고 골격근섬유를 삽입한 Gore-tex[®]도관을 이식한 다음 VPA를 투여한 실험군과 이를 투여하지 않은 대조군을 비교하였으며 수술 후 16주에 전기생리학적 검사 및 조직학적 검사를 시행한 결과 신경전도속도, 총 유수화 축삭 수, 평균 수초두께, 평균 신경섬유직경은 대조군에 비해 실험군에서 모두 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). 실험군에서 더 많은 숫자의 모양이 일정하며 수초 두께가 두꺼운 유수화 축삭이 보였고, 신경섬유의 크기 또한 더 커서 정상신경에 가까운 양상을 보였다(Fig. 3).

이상의 결과로 보아 신경결손의 범위가 클 경우 말초신경 재생을 위해 자가 신경이식술 대신에 골격근섬유를 삽입한 Gore-tex[®]도관이식술과 함께 VPA를 투여함으로써 좋은 결과를 얻을 수 있었고, 앞으로 여러 가지 신경성장 인자에 대한 연구와 면역조직화학염색(immunohistochemical stain)을 이용한 VPA의 작용기전에 대한 연구가 계속 필요할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- Hudson TW, Evans GR, Schmidt CE: Engineering strategies for peripheral nerve repair. *Clin Plast Surg* 26: 617, 1999
- Stanec S, Stanec Z: Reconstruction of upper-extremity peripheral-nerve injuries with ePTFE conduits. *J Reconstr Microsurg* 14: 227, 1998
- Brunelli GA, Battiston B, Vigasio A, Brunelli G, Marocolo D: Bridging nerve defects with combined skeletal muscle and vein conduits. *Microsurgery* 14: 247, 1993
- Cheng YS, Hsieh CL, Tsai CC, Chen TH, Chen WC, Hu CL, Yao CH: Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. *Biomaterials* 21: 1541, 2000
- Ide C: Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res* 25: 101, 1996

6. Haglid KG, Yang Q, Hamberger A, Bergman S, Widerberg A, Danielsen N: S-100 β stimulates neurite outgrowth in the rat sciatic nerve grafted with acellular muscle transplants. *Brain Res* 753: 196, 1997
7. Voinesco F, Glauser L, Kraftsik R, Barakat-Walter I: Local administration of thyroid hormones in silicone chamber increases regeneration of rat transected sciatic nerve. *Exp Neurol* 150: 69, 1998
8. Cui SS, Yang CP, Bowen RC, Bai O, Li XM, Jiang W, Zhang X: Valproic acid enhances axonal regeneration and recovery of motor function after sciatic nerve axotomy in adult rats. *Brain Res* 975: 229, 2003
9. Kim JT, Kim IG, Uhm KI, Lew JM, Lee HS: An experimental study on the mechanism of nerve regeneration using effects of different distal stumps of silastic tube in resected sciatic nerve model of rats. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 18: 195, 1991
10. Cheng ET, Utley DS, Ho PR, Tarn DM, Coan GM, Verity AN, Sierra DH, Terris DJ: Functional recovery of transected nerves treated with systemic BDNF and CNTF. *Microsurgery* 18: 35, 1998
11. Lutz BS, Wei FC, Ma SF, Chuang DCC: Effects of insulin-like growth factor-1 in motor nerve regeneration after nerve transection and repair vs. nerve crushing injury in the rat. *Acta Neurochir* 141: 1101, 1999
12. Grothe C, Nikkhah G: The role of basic fibroblast growth factor in peripheral nerve regeneration. *Anat Embryol* 204: 171, 2001
13. Fansa H, Keilhoff G, Wolf G, Schneider W: Tissue engineering of peripheral nerves: A comparison of venous and acellular muscle grafts with cultured Schwann cells. *Plast Reconstr Surg* 107: 485, 2001