

운동이 좌골신경 손상 F344쥐의 Neurotrophins, BDNF, NT-3, GAP-43 단백질 발현과 축삭재생에 미치는 영향

윤진환* · 서태범

한남대학교 생활체육학과

Received February 21, 2006 / Accepted March 7, 2006

Effect of Exercise on Neurotrophins, BDNF, NT-3, GAP-43 Protein Expression and Axonal Regeneration after Sciatic Nerve Injury in F344 Rats. Jin-Hwan Yoon* and Tae-Beom Seo. *Department of Sports and Leisure Studies, Hannam University* – Peripheral nerve injuries are a commonly encountered clinical problem and often result in severe functional deficits. In the present study, the effects of treadmill exercise on neurotrophin expressions and functional recovery following sciatic crushed nerve injury were investigated. Animals were randomly assigned into four groups: the sciatic nerve injury group, the sciatic nerve injury and 3-day-exercise, the sciatic nerve injury and 7-days-exercise, and the sciatic nerve injury and 14-days-exercise groups. Sciatic nerve injury was caused by crushing the right sciatic nerve for 30 s using a surgical clip. A the light-exercise was applied to each of the exercise group over the respective number of days. In the present results, we identified enhanced axonal re-growth in the distal stump of the sciatic nerve 3 - 14 days after crush injury with treadmill training. Dorsal root ganglion (DRG) neuron when cultured from animals with nerve injury and treadmill training showed more enhanced neurite outgrowth than that of sedentary animals. Nerve growth factor (NGF) protein levels in low-intensity treadmill training group were highly induced in the injured sciatic nerves 3, 7 and 14 days after injury compared with sedentary group, and brain-derived neurotrophin factor (BDNF) protein levels in treadmill exercise group were highly induced in the injured sciatic nerve 3 days after injury compared with sedentary group. Then, treadmill exercise increased neurotrophic factors induced in the regenerating nerves. We further demonstrate that motor functional recovery after sciatic nerve injury was promoted by treadmill exercise. Thus, the present data provide a new evidence that treadmill exercise enhanced neurotrophins expression and axonal regeneration after sciatic nerve injury in rats.

Key words – Treadmill exercise, neurotrophic factors, sciatic nerve injury, axonal regeneration

서 론

신경계는 뇌와 척수로 구성된 중추신경계(central nervous system, CNS)와 중추 신경계에서 기시되는 모든 신경으로 구성되는 말초신경계(peripheral nervous system, PNS)로 분류된다. 이러한 신경계에 상해를 입으면 운동 신경과 감각 신경 모두 심각한 손상을 입게 됨으로 기능적인 장애를 가져오게 된다 [7]. 손상을 받은 CNS는 재생(regeneration) 능력을 갖지 못하고, 결국 세포를 사망에 이르게 한다. 이러한 변성(degeneration) 과정은 CNS의 glial cell에서 재생 억제 단백질이 발현되어 성장을 촉진시키는 유전자의 활동을 차단하기 때문이다. 그러나 손상을 받은 PNS는 축삭 재생 능력을 가지는 것으로 알려져 있으며, PNS의 재생 가능성은 레티노익(retinoic acid)이 재생 진행 과정을 조절하는 수많은 사이토카인(cytokines)의 합성을 유발하기 때문인 것으로 보고되고 있다[26,28]. 그러므로 상해 후 PNS와 CNS neurons의 재생

가능성 차이는 손상된 신경세포에서 발현되는 분자적인 차이 때문인 것이다[28]. 구체적으로 PNS의 상해는 손상된 신경 자체에 변화를 초래할 뿐만 아니라 감각 뉴런(sensory neurons), 운동 뉴런(motor neurons)의 세포체에 변화를 가져와 뉴런의 생존과 손상된 부분에 축삭 재생(axonal regeneration)을 증진시켜, 결국에는 기능적인 회복을 증가시킨다[7]. 상해가 가해진 말초신경은 축삭 재생을 유도하는 슈반세포(schwann cell)에 의해 세포 유착분자(cell adhesion molecules)와 세포외간질 단백질 섬유결합소(extracellular matrix glycoprotein fibronectin)의 증가를 유도한다[15,24]. 또한 손상된 좌골 신경의 슈반세포는 neurotrophins[nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3) and NT4]와 같은 neurotrophic factors들을 합성한다. Neurotrophic factors는 신경세포의 성장과 분화에 관여하고, synaptic plasticity 조절능력을 가지고 있으며[3,14], 모든 neurotrophins는 비슷한 생화학적 특성을 가지고 있다. 이러한 단백질들은 선구단백질(precursor protein)의 형태로 만들어진 후 구조적 변형과정을 거쳐 완전한 단백질(mature protein)로 형성되어 세포 밖으로 분비되며 이

*Corresponding author

Tel : +82-42-629-7990, Fax : +82-42-629-8402

E-mail : yoonjh@hannam.ac.kr

분자체를 이루어 기능하게 된다[17].

선행연구에 따르면, 각각의 neurotrophin은 신경 손상 후 시간에 따라 다르게 발현되는 것으로 알려졌고[9], NGF, BDNF 그리고 NT-4는 말초신경 상해 후 원위부분에서 증가하지만, NT-3는 오히려 감소한다고 보고하고 있다[8]. 또한 손상된 좌골신경에서 합성된 neurotrophins는 정상적인 영양 공급(trophic supply)이 되지 않는 뉴런의 생존을 조절하는데 중요한 작용을 함으로써 기능적인 회복을 증가시키고, 손상된 감각신경절(dorsal root ganglion; DRG)의 감각 뉴런을 보호하는 것으로 알려져 있다[21]. NGF는 쥐 모델에서 말초신경 상해 후 감각 뉴런의 생존과 재생을 촉진시키고[9], BDNF, NT-3 그리고 NT-4는 일시적이기는 하지만 신경절단 후 운동 뉴런의 사멸을 7-14일까지 연장시키는 것으로 보고하고 있다[27]. 최근의 선행연구에서는 자발적인 운동이 운동 뉴런의 유전자 발현 수준에서 neurotrophins를 증가시킨다고 보고하고 있고[11], Raffaellae등[25]의 연구에서는 자발적인 운동이 L4-5 DRGs 감각뉴런에서 BDNF, NT-3, synapsin I 그리고 Growth-associated protein 43(GAP-43) 단백질을 증가시키고, 좌골신경 손상 후에도 감각뉴런에서 이러한 단백질의 발현을 증가시킨다는 것을 증명하였다.

이러한 neurotrophins 외에 신경 재생에 관련하는 수많은 단백질 중 가장 중요한 단백질은 Growth-associated protein 43 (GAP-43)이다[27]. GAP-43는 신경계에서만 유일하게 발견되는 단백질이고, 신경세포에만 특이적이며, 축삭말단(axonal terminal)에 가장 많이 존재한다.

말초 신경 압박 손상(Peripheral nerve crush injury) 후 재생을 하는 동안 가장 중요한 것은 감각운동기능의 회복이다. 선행 연구에서 이러한 기능적인 측면의 회복은 좌골 신경 손상 후 운동을 수행하였을 때 신경 재생과 감각운동기능 회복이 촉진된다고 보고된 바 있다[30]. Nico등[23]의 연구에서는 좌골 신경 압박 손상 쥐에게 운동을 수행시켰을 경우 상해 초기 단계에서 감각운동기능의 회복이 향상되고, 상해 후 24일까지 운동의 효과를 관찰 할 수 있다고 보고하고 있다. van Meeteren등[31]은 운동이 좌골신경 손상 24일 후에도 축삭 재생과 기능적인 변화에 영향을 미친다는 것을 증명하였는데, 이것은 운동이 좌골신경 손상 초기단계에서부터 지속적으로 영향을 미쳐 행동학적인 측면의 회복까지 촉진할 수 있는 것으로 여겨진다.

이처럼 선행연구에서는 좌골신경 압박 손상 후 신경 재생 기간 동안 생화학적, 조직학적 그리고 형태학적인 측면의 변화에 대해 많은 입증은 하였지만, 신경 손상 후 운동을 수행하였을 때 이러한 재생의 척도들이 어떻게 변화하는 지에 관한 연구는 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 흰쥐의 좌골신경을 압박 손상시킨 후 트레드밀 운동을 적용하여 neurotrophic factors 발현과 축삭 재생의 변화를 분석함으로써, 말초신경 재생 기간 동안 운동이 생화학적, 조직학적인 변화에 미치는 영향을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

연구대상

본 연구의 실험동물은 친자교배 시킨 생후 9주령 된 F344 계열 수컷 흰쥐를 사용하였다. 실험동물은 실험 전 일주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 2주(좌골신경 압박손상 후 3, 7, 14일) 동안 사육 및 실험을 거쳤다. 실험동물은 전 실험 기간을 통하여 고형 사료와 물을 자유스럽게 섭취하도록 하였으며, 온도는 22-24°C, 습도는 50 ± 10%가 유지되도록 하였고, 조명은 실험동물의 야행성을 고려하여 밤낮주기(12시간 주/야)가 조절되는 실험실 환경에서 사육하도록 하였다.

실험절차

실험동물은 무작위 표본추출에 의하여 좌골신경 손상 후 비운동군, 좌골신경 손상 후 3일 동안 운동한 그룹, 7일 동안 운동한 그룹 그리고 14일 동안 운동한 그룹으로 분류하였고, 그룹 당 8마리를 할당하였다. 좌골신경 압박 손상을 주기 전 1주일 동안 treadmill 운동에 적응시키고, 적응 기간이 지난 후에 각 그룹에 좌골신경 압박 손상을 가하였다.

운동방법

각 그룹에 운동 강도는 동일하게 사용하였으며, 운동 프로토콜은 트레드밀에서 18 meter/min의 속도로 하루에 30분씩 2번 수행하는 저강도 운동으로 수행하였다. 수술을 받은 모든 쥐들은 2일 동안의 휴식을 취한 후 각각의 그룹에 해당하는 요일 동안 운동을 수행하였다. 좌골신경 압박 손상 후 3, 7, 14일 동안 운동을 수행 한 쥐들은 각 그룹에 맞는 날짜에 마취시킨 후 좌골신경(sciatic nerve, SN), 감각신경절(dorsal root ganglion, DRG) 그리고 척수(spinal cord, SC)를 분리해 내었다. 분리된 모든 조직들은 실험에 사용될 때까지 -70°C 냉동고에 보관하였다.

좌골신경 압박손상 수술 방법

각 그룹의 쥐들은 케타민(80 mg/kg)과 럼폰(5 mg/kg)의 혼합 용액을 복강에 주입하여 마취시킨 후 좌측 둔부의 근육과 대퇴 근육의 경계선을 절개하고, 좌골신경을 드러내어 핀셋을 이용해 30초 동안 압박한 후 1분간의 휴식을 취하고 다시 30초 동안 압박하는 반복 손상을 주었다. 수술 후 2일 동안은 모든 그룹이 휴식을 취하게 한 후 실험을 수행하였다.

측정방법

단백질 전기영동 (Western blot)

신경 조직을 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂PO₄, 2 mM KH₂PO₄ (pH 7.4)가 함유된 PBS로 씻은 후 50-200 μl의 triton lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.4, 137 mM NaCl, 25 mM β-blycerophosphate, pH 7.14, 2 mM so-

dium pyrophosphate, 2 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 1% Triron X-100, 10% glycerol, 5 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml aprotinin, 3 µM benzamidine, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF에 담그어 초음파 분해하였다. 그 후 각 sample에 대한 단백질을 정량하였으며, 그 중 10 µg의 단백질을 western analysis에 사용하였다. 단백질의 발현은 anti-Nerve growth Factor (NGF, sc-549, Santa Cruz) antibody, anti-Brain-derived neurotrophin factor (BDNF, sc-546, Santa Cruz) antibody, anti-Neurotrophin 3 (NT-3, sc-547, Santa Cruz) antibody 그리고 anti-Growth-associated protein 43 (GAP-43, sc-7457, Santa Cruz) antibody를 이용하여 확인하였다. 정량을 수행한 proteins는 12% SDS-PAGE (1.5 M Trizma base, 10% Sodium Dodecyl Sulfate, 30% Acrylamide, 10% Ammonium Sulfate, TEMED) 상에서 79V/280 mA의 전압으로 전기영동 시킨 후 PVDF membrane (Pall Corporation, U.S.A)에 전기이동 시켰다. Antibody와의 비특이적 결합을 막기 위해 3% BSA, 0.1% Tween 20을 함유하고 있는 TBS buffer에서 membrane을 1시간 동안 상온 반응 시키고 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 반응을 끝낸 membrane을 TBST buffer에 washing한 후 rat NGF, BDNF, NT-3 그리고 GAP-43의 C-terminal에 특이적인 polyclonal antibody를 Blocking buffer (1X TBS buffer, 3% BSA, 0.1% Tween 20)에 1:1000의 비율로 희석하여 상온에서 1시간 30분 동안 반응 시켰다. 그런 후 membrane을 TBST buffer로 씻어내고 anti-rabbit IgG (Santa Cruz, U.S.A)가 결합되어 있는 horseradish peroxidase를 skim milk buffer (1X TBST buffer, 10% Skim milk)에 1:1000의 비율로 희석하여 상온에서 1시간 30분 동안 처리 하고 다시 한 번 씻어내었다. 마지막으로 Membrane에 부착된 단백질을 Western blotting detection system을 이용하여 측정할 수 있었으며 Kodak scientific imaging film (Esteman Kodak Co., U.S.A)에 감광 하였다. Membrane을 densitometer (Sharp jx-330)를 이용하여 스캔한 후 이미지 분석 프로그램(Image Master ver. 3.0, Biotech pharmacia)을 통해 NGF, BDNF, NT-3 그리고 GAP-43 단백질량을 산출하였다.

면역형광 염색법 (Immunofluorescence staining)

신경 조직은 -20°C에서 냉동시킨 후 cyostat를 이용하여 20 µm의 두께로 잘라 슬라이드에 붙인다. 이중 면역형광 염색법(double immunofluorescence staining)을 수행하기 위해, 4% paraformaldehyde, 4% sucrose가 혼합된 PBS [137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂PO₄, 2 mM KH₂PO₄ (pH 7.4)]에 45분 동안 슬라이드를 넣어 조직을 고정시킨다. 그 후 0.5% nonidet P-40이 함유된 PBS를 각 조직에 처리하여 세포에 투과성을 높여주고, Antibody와의 비특이적 결합을 막기 위해 PBST에 2.5% BSA, 2.5% horse serum을 함유하고 있는 blocking buffer에 4시간 동안 담그어 놓는다. 4시

간 후 각 조직에 첫 번째 antibody를 처리하게 되는데, 좌골 신경(SN), 감각신경절(DRG), 척수(SC) 조직에 첫 번째 antibody로 anti-neurofilament 200 antibody (NF-200, N52, sigma), anti-βIII-tubulin antibody (TUJ1, Covarice), anti-S100β antibody (Dako), anti-NGF antibody, anti-BDNF antibody, anti-NT-3 antibody 그리고 anti-GAP-43 antibody를 처리한다. 이 때 antibody는 2.5% BSA, 2.5% horse serum을 함유하고 있는 blocking buffer에 1:200에 비율로 혼합하여 처리한 후 4°C에서 16시간 동안 반응시킨다. 첫 번째 antibody의 반응이 끝난 후 PBST로 조직을 씻어내고, 2.5% BSA, 2.5% horse serum을 함유하고 있는 blocking buffer에 Fluorescein-goat anti-mouse와 Rhodamin-goat anti-rabbit antibody (Molecular probes)를 1:100으로 혼합하여 암실에서 1시간 30분 동안 두 번째 antibody 처리를 수행한다. 두 번째 antibody는 빛에 민감하기 때문에 반응 시간동안 반드시 암실에서 수행되어야만 한다. 마지막으로 gelatin mount medium을 이용하여 cover-slide를 붙인다. 본 연구에서는 두 번째 antibody만 처리한 control slide를 첨부하는데 이것은 antibody의 반응이 정확함을 확인하기 위한 것이다. 모든 조직 sample은 형광현미경(Zeiss fluorescent microscope)을 통해 관찰되었고, images는 Axioskop camera를 이용하여 찍었다. 디지털 카메라로 찍은 모든 images는 Adobe Photoshop (version 5.5)을 이용하여 green과 red의 밝기와 강도를 같은 비율로 증폭시켜 관찰하였다. 그리고 Photoshop program의 Layer blending mode options를 이용 images를 중복시켜 관찰하여 각 단백질의 발현 위치를 관찰하였다.

Sciatic functional index (SFI)

기능적인 평가는 좌골 신경 상해 후 쥐의 발바닥에 검은 색 잉크를 문힌 후 하얀 종이 위에 직선으로 걷게 하여 찍힌 발의 모양으로 계산하는 sciatic functional index (SFI)로 평가하였다. SFI는 4개 구성요소로 이루어졌다[2]. 상해 받은 쪽 발의 발가락 퍼짐 정도(experimental toe spread, ETS), 정상인 발의 발가락 퍼짐 정도(normal toe spread, NTS), 상해 받은 쪽 발의 프린트된 발의 길이(experimental paw length, EPL) 그리고 정상인 발의 프린트된 발의 길이(normal paw length, NPL) 이다. 실험에서 얻어진 값은 아래의 공식에 대입하여 SFI 값을 산출하게 된다. SFI의 값이 0이 되면 정상으로 판정하고, -100이상이면 좌골신경에 기능이 완전히 상실했다는 것을 의미한다.

통계처리

본 연구의 자료 처리는 SPSS 통계프로그램을 이용하여 각 항목별 평균과 표준편차를 구하였고, 항목별 그룹간의 차이를 알아보기 위해 일원변량 분산분석(one-way ANOVA)를 이용하였다. 유의차가 나타난 항목에 대한 사후검증은

Duncan의 방법을 이용하였다. 통계적 유의수준은 * p<.05와 ** p<.005로 정하였다.

결 과

운동이 축삭 재생에 미치는 영향

좌골신경 손상 후 운동이 축삭 재생에 미치는 효과를 확인하기 위해 좌골신경을 적출하여 급속 냉동을 한 후 20 μm의 두께로 절편 하였고, 이 표본을 이용하여 면역형광 염색을 수행하였다. 조직 내에서 재생하는 축삭을 확인하기 위해 neurofilament 항체를 1차로 사용하였고, 2차 항체로는 rhodamin을 사용하였다. <Fig. 1>에서 보는 것처럼, 정상적인 좌골신경에 neurofilament는 끈게 일직선으로 지나가는 것을 볼 수 있고, 그 양도 상당히 많은 것으로 나타났다.

그러나 좌골신경 압박 손상 1일 후 원위부의 neurofilament를 보면 신경의 변성으로 인해 거의 존재하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 압박 손상 후 시간 별로 운동을 수행한 그룹과 수행하지 않은 그룹에 재생하는 축삭의 변화를 관찰해 본 결과, 손상 후 3일에서 운동을 수행한 그룹에 축삭 재생이 운동을 수행하지 않은 그룹보다 양적으로 많고, 그 길이도 긴 것을 볼 수 있었다. 손상 후 7일에서는 두 그룹 간 재생하는 축삭의 길이에는 차이는 없지만, 양적으로는 운동을 수행한 그룹이 많은 것으로 나타났다. 그러나 손상 후 14일에서는 두 그룹 간에 차이는 관찰할 수 없고, 재생하는 축삭의 양이 정상과 비슷한 것으로 나타났다.

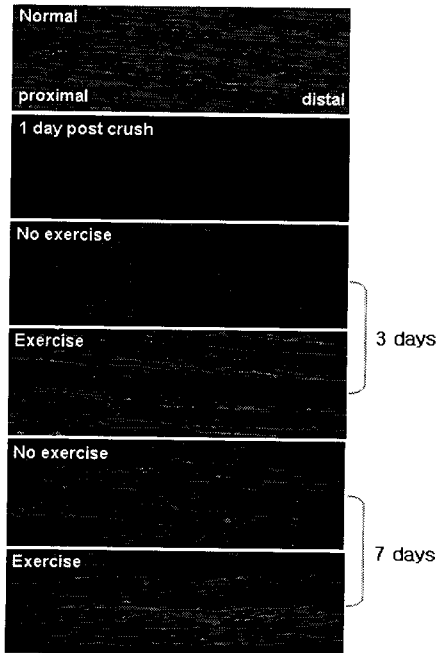


Fig. 1. Effect of treadmill exercise on axonal regeneration after sciatic nerve injury. Neurofilament-200 antibody was used for staining regenerating axons.

운동이 NGF, BDNF 발현에 미치는 영향

좌골신경 손상 후 손상된 부위에서 발현되는 NGF와 BDNF가 운동에 의해 어떠한 변화가 있는지를 확인하기 위해 western blot을 수행하였다. NGF와 BDNF는 Neurotrophic factors로써 축삭 재생을 촉진하는 단백질로 널리 알려져 있다. <Fig. 2>에서 보는 것처럼, NGF 발현은 신경 손상 3일 후부터 14일까지 비운동 그룹에 비해 운동 그룹에서 발현량이 많은 것으로 나타났다. BDNF 발현은 신경 손상 후 3일에서 비운동 그룹에 비해 운동 그룹에서 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 단백질의 증가는 재생의 정도를 확인하는 척도로 사용되기 때문에 운동에 의해 재생이 촉진된다는 것을 간접적으로 보여주는 실험 결과이었다.

운동이 감각신경절(DGR)의 감각신경 세포에서 발현되는 NGF와 BDNF에 미치는 영향

손상된 좌골신경을 지배하는 감각신경세포가 존재하는 감각신경절은Lumbar4-5이다. 좌골신경 손상 후 이 감각신경절에서는 NGF와 BDNF가 발현되는데 treadmill 운동이 이러한 단백질에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하기 위해 면역형광 염색을 수행하였다. Tubulin 항체를 이용하여 감각신경 세포체를 염색하였고, 감각신경세포체에서 발현되는 NGF, BDNF를 염색하기 위해 NGF, BDNF 항체를 사용하였다. 현광현미경에서 관찰할 때 Tubulin은 녹색으로 염색되고, NGF와 BDNF는 빨강색으로 염색되었다. <Fig. 3>에서 보는 것처럼, 좌골신경 손상 3일 후 감각신경세포체에서 NGF의 발현은 비운동 그룹보다 운동 그룹에서 증가하는 것으로 나타났다. 또한 BDNF도 운동 그룹이 비운동 그룹보다 증가하였다. 발현되는 NGF와 BDNF가 감각신경 세포체에서 발현되는 지를 확인하기 위해 tubulin 염색 결과와 NGF, BDNF 결과를 중복하였는데 정확히 감각신경 세포체에서 발현되는 것을 알 수 있었다. Control은 1차 항체를 처리하지 않고 2차 항체만 처리하였다.

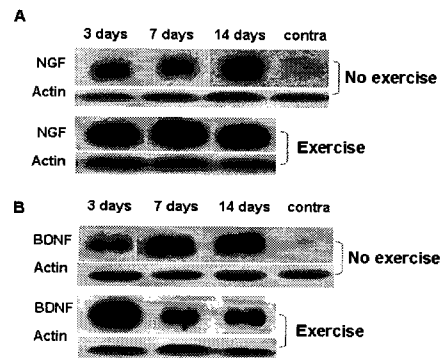


Fig. 2. Effect of treadmill exercise on expression of NGF and BDNF protein in injured sciatic nerve. Actin is an internal loading control. contra, contralateral side.

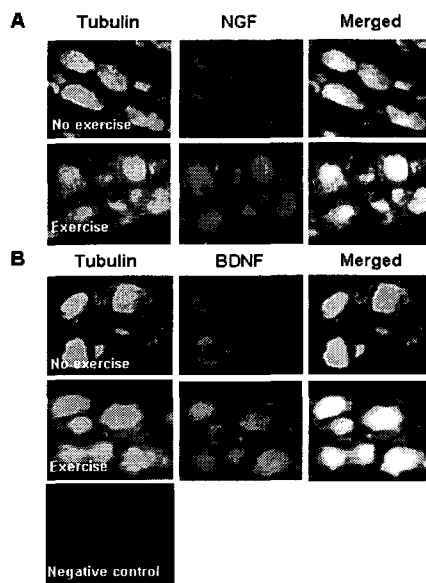


Fig. 3. Effect of treadmill exercise on NGF and BDNF in dorsal root ganglion 3 days post crush. A. Treadmill exercise increases levels of NGF protein in DRG 3 days after injury. B. Treadmill exercise up-regulates levels of BDNF protein in DRG 3 days after injury. Negative control is only stained with secondary antibody.

좌골신경 손상 후 운동이 sciatic functional index (SFI)에 미치는 영향

운동이 좌골신경 손상 후 행동학적인 면에 미치는 영향을 확인하기 위해 Foot-printing 방법을 이용해 SFI 값을 구하였다. 통제군에서 3, 7, 그리고 14일에 측정된 수치는 각각 -84.85 ± 4.94 , -79.29 ± 3.91 , 그리고 -69.11 ± 5.60 이었고, 운동군의 경우 -81.01 ± 3.61 , -64.71 ± 3.93 , 그리고 -43.38 ± 4.87 이었다. <Fig. 4>에서 보는 것처럼, 좌골신경 손상 후 3일에서는 운동을 수행하지 않은 그룹과 운동을 수행한 그룹에 차이는 없었고, 7일 후에는 약간의 차이는 있지만 통계적으로 유의한 차이는 확인할 수 없었다. 그러나 좌골신경 손상 14일 후에는 운동을 수행한 그룹에 SFI 값이 운동을 수행하지 않은 그룹보다 통계적으로 유의하게 감소한 것을 확인할 수 있었다.

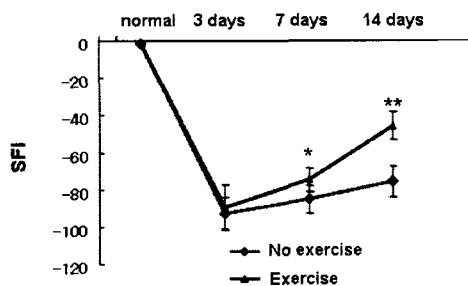


Fig. 4. Effect of treadmill exercise on SFI values after sciatic nerve injury. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$.

고 찰

본 연구는 흰쥐의 좌골신경을 압박 손상시킨 후 3, 7, 14일 동안 트레드밀 운동을 적용하여 DRG 감각신경세포에서의 신경돌기 성장과 좌골신경의 축삭 재생 및 신경성장 인자 발현 그리고 SFI값의 변화를 관찰하여 분석하였다.

좌골신경 축삭 재생 단계는 가장 먼저 손상부위에서 슈완세포의 증식이 일어나고, 슈완세포가 원위부로 이동하며, 그런 후 손상 부위에서 축삭의 접촉이 발생하고, 접촉 후 재생이 이루어진다. 이러한 재생은 말초조직까지 이루어지게 되고, 재생이 일어나는 원위부부터 마이엘린을 형성하기 위해 슈완세포의 분화가 발생하고, 마지막으로 마이엘린이 형성되는 것으로 보고하였다[1]. 본 연구에서 압박 손상 후 좌골신경의 조직학적인 변화를 관찰하기 위해 수행한 면역형광법 검사결과 손상 부위 3mm 원위부에서 3일 그리고 7일 동안 운동을 수행한 그룹의 신경 재생이 운동을 수행하지 않은 그룹보다 축삭 재생이 촉진되었다. 그러나 14일에서는 두 그룹 간에 차이를 확인하기는 힘들었다. 이것은 재생하는 축삭에 대한 분석을 수행한 부분이 손상 부위에서 3mm 원위부까지만을 특정적으로 관찰하였기 때문이다. 또한 좌골신경 손상 14일에 손상 부위에서는 슈완세포의 증식이 정지하였고, 증식하는 슈완세포가 원위부 쪽으로 이동하여 손상부위에서는 재생의 마지막 단계인 슈완세포 분화가 발생하고 있다고 설명할 수 있다. 손상 부위에서 마이엘린이 형성되기 전 재생하는 축삭이 운동에 의해 촉진된다는 것은 대단히 흥미로운 발견이라고 생각되고, 앞으로는 재생하는 신경에 증식과 마이엘린 형성이 운동에 의해 어떠한 변화를 나타낼 수 있는지 확인하는 연구가 이루어져야 할 것이다.

Neurotrophic factors는 신경세포의 성장과 분화에 관여하고, synaptic plasticity 조절능력을 가지고 있으며[29], 모든 neurotrophins[nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3) and NT4]는 비슷한 생화학적 특성을 가지고 있다[9]. Neurotrophins과 이들에 수용체(receptors)들의 발현량은 신경세포의 활동성에 의해 변화할 수 있다. 그러므로 synaptic transmission에 변화는 끊임없이 이루어진다[6]. BDNF와 NT-3는 Muscle-dorsal root ganglion-spinal cord interface에서 발생하는 감각-운동 기능을 조절하는데 중요한 요소이다[28]. Gomez-Pinilla등[11,12] 그리고 Ying등[32]은 자발적인 저강도 운동 후 BDNF와 NT-3의 발현이 척수와 골격근에서 증가한다고 보고하였다.

또한 Neurotrophic factor들은 마이엘린 형성에 관여하는 것으로 알려지고 있는데 마이엘린 수초는 신경 세포로부터 전송된 활동전위의 속도와 효율성을 최대화하기 위한 신경계의 유일한 구조이다. 말초신경계와 중추신경계가 근본적으로 다르게 마이엘린이 구성되어 있다. 예를 들어 마이엘린

의 지방 이중층에 들어가 있는 단백질의 본질이 다르다. 말초신경의 마이엘린에 존재하는 단백질은 상당한 주목을 받고 있다. 왜냐하면 이러한 단백질을 encoding하는 유전자에 변화는 탈마이엘린 말초 신경병증(demyelinating peripheral neuropathies)에 호전을 줄 수 있기 때문이다. 말초신경계에 마이엘린 형성은 매우 복잡하고, 두 개의 다른 세포 형태인 슈완세포와 신경세포들이 관련된 역동적인 과정이다[16]. 마이엘린을 형성하기 위해서는 슈완세포 성장과 분화의 3가지 중요한 단계가 상호작용해야 한다. 이러한 단계는 증식 시기에 슈완세포의 증식과 이동, 마이엘린 전 단계에서 슈완세포에 의한 축삭의 성장 그리고 마이엘린 시기에서 마이엘린 수초의 성장과 비유로 이루어져 있다[20]. 슈완세포의 분화는 신경세포의 생존과 분화를 포함한 축삭의 적당한 성장에 필요한 상호작용이다[18].

마이엘린 형성에 대한 neurotrophins의 역할은 슈완세포-축삭 상호작용이 신경 손상에 의해 방해 받았을 때 가장 활발하게 나타난다. 예를 들어, 좌골 신경의 절단이나 압박 손상시 Nerve growth factor (NGF)와 p75 neurotrophin receptor (NTR)은 손상 부위의 원위부 분절에서 빠르게 증가한다[13]. 대조적으로 손상 초기에 NT3의 발현은 감소하고, BDNF와 NT4는 손상 2주 후 원위부 분절에서 발생된다[4]. 신경세포 생존과 분화를 증진시키는 이러한 neurotrophins와 수용체들은 말초신경 손상 후 중요한 역할을 수행한다. 그러나 neurotrophins의 역할은 신경세포에만 제한적이지는 않다. 아교세포 뿐만 아니라 내분비계, 심혈관계, 면역계에서 중요한 역할을 한다는 보고가 있다[19]. 선행 연구들은 NT3가 희소아교돌기세포의 증식, 생존 그리고 분화에 관여한다고 보고하였다[3]. 또한 neurotrophins는 p75 수용체를 통해 슈완세포 이동에 영향을 미치고[5], BDNF는 신경 재생을 하는 동안 마이엘린 형성에 영향을 미친다고 보고하였다[33]. 최근에는 BDNF를 포함한 neurotrophin factors가 말초 신경 손상 후 축삭재생과 생존을 향상시키는 것으로 보고된 바 있다[33]. 그러나 neurotrophins의 역할을 단정하기는 어렵고, 아직은 재생에 관여하는 단계에 대한 명백한 증거는 부족한 실정이다.

본 연구에서 좌골신경 손상 후 손상된 부위에서 NGF 발현은 신경 손상 3일 후부터 14일까지 비운동 그룹에 비해 운동 그룹에서 발현량이 증가하였고, BDNF 발현은 신경 손상 후 3일에서 운동 그룹에서 증가하였다. 손상된 좌골신경을 지배하는 감각신경세포가 존재하는 감각신경절은 Lumbar 4-5이다. 좌골신경 손상 후 이 감각신경절에서는 NGF와 BDNF가 발현되는데 트레드밀 운동이 이러한 단백질 발현을 증가시켰다. 이러한 단백질의 증가는 재생의 정도를 확인하는 척도로 사용되기 때문에 운동에 의해 재생이 촉진된다는 것을 간접적으로 보여주는 결과이다. Molteni등[22] 그리고 Gomez-Pinilla 등[12]은 운동을 수행한 그룹에 L4-5 DRG는 운동을 수행하지 않은 그룹보다 더 높은 NGF, BDNF, NT3,

synapsin I 그리고 GAP-43 mRNA를 발현하고, 운동 수행 전 감각신경절(DRG)에 Trk neurotrophin receptor inhibitor인 K252A를 주입하였을 경우 synapsin I transcription에 관한 운동의 효과를 차단하였고, 운동에 의한 neurite growth 증가를 발생시켰다고 보고하였다. 이러한 발견은 운동으로 인해 야기된 neurotrophin signal transduction의 활성화가 감각신경 세포의 성장을 증진시키는데 중요하다는 것을 나타내는 것이다. 또한 Gomez-Pinilla등[12]의 연구에 따르면, 운동이 척수 내에 유전자 발현을 조절한다고 보고하였다. 본 연구에서 운동 후 손상 신경에서 neurotrophin factors에 발현과 감각신경 세포에서의 NGF, BDNF 발현은 운동이 유전자 발현 수준에서 변화를 가져온다는 것을 입증해 주었다.

운동이 좌골신경 손상 시 회복을 촉진시키는 기전적인 부분은 아직 불분명하지만, 본 연구결과에서는 좌골신경 손상 후 운동이 좌골신경의 기능적 회복을 촉진시키는 것으로 나타났다. 좌골신경 손상 후 7일과 14일에 측정된 좌골신경기능지수(SFI)가 비운동그룹에 비해 운동그룹에서 유의하게 감소되었다. 이것은 좌골신경 손상 후, 좌골신경 기능이 운동에 의해 보다 빠르게 회복되었음을 의미하는 것이다. van Meeteren등[31]은 운동훈련이 말초신경손상 후 초기 회복단계에서 감각운동신경의 기능회복을 촉진시킴을 보고 한 바 있다. 게다가 이들은 손상 후 초기 24일간의 운동으로 얻어진 말초신경의 회복효과가 상당기간 지속되는 것을 관찰하였다[31]. 결론적으로 본 연구결과 트레드밀 운동을 통해 손상된 좌골신경의 재생촉진과 신경영양인자의 발현증가 그리고 말초기능이 향상됨으로써, 운동이 좌골신경 환자를 위한 적절한 치료방법으로 사용될 수 있는 가능성을 제시 할 수 있다고 생각한다.

요 약

본 연구에서는 흰쥐의 좌골신경을 손상시킨 후 트레드밀 운동을 적용하여 신경돌기 성장과 좌골신경의 축삭 재생 및 신경성장 인자 발현 그리고 신경기능지수의 변화를 연구했다. 본 연구결과 좌골신경 손상 후 트레드밀 운동을 실시한 그룹이 비운동군에 비해 축삭재생이 촉진되었고, 원위부의 좌골신경에서도 NGF, BDNF 단백질 발현이 상당히 증가된 것으로 나타났다. 또한 좌골신경지수를 검사한 결과에서도 운동을 실시한 흰쥐가 비운동 흰쥐에 비해 기능적 회복이 상당히 빠른 것으로 나타났다. 이러한 결과는 좌골신경 손상 후 운동의 실시가 좌골신경의 축삭재생 촉진과 신경영양인자의 발현증가를 통해 기능적 회복에 도움이 될 수 있음을 보여주는 것이다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2004-041-G00102).

참 고 문 헌

1. Akassoglou, K., W. M. Yu, P. Akpınar and S. Strickland. 2002. Fibrin inhibits peripheral nerve remyelination by regulating Schwann cell differentiation. *Neuron* **33**, 861-875.
2. Bain, J. R., S. E. Mackinnon and D. A. Hunter. 1989. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plastic and Reconstructive Surgery* **83**, 129-138.
3. Barde, Y. A., D. Edgar and H. Thoenen. 1982. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO Journal* **1**, 549-553.
4. Barres, B. A., M. C. Raff, F. Gaese, I. Bartke, G. Dechant and Y. A. Barde. 1994. A crucial role for neurotrophin-3 in oligodendrocyte development. *Nature* **367**, 371-375.
5. Bentley, C. A. & K. F. Lee. 2000. p75 is important for axon growth and schwann cell migration during development. *Journal of Neuroscience* **20**, 7706-7715.
6. Canossa, M., A. Gartner, G. Campana, N. Inagaki and H. Thoenen. 2001. Regulated secretion of neurotrophins by metabotropic glutamate group I (mGluRI) and TRK receptor activation is mediated via phospholipase C signaling pathways. *EMBO Journal* **20**, 1640-1650.
7. Fawcett, J. W. and R. J. Keynes. 1990. Peripheral nerve regeneration. *Annual Review of Neuroscience* **13**, 43-60.
8. Funakoshi, H., J. Frisen, G. Barbany, T. Timmusk, O. Zachrisson, V. M. Verge and H. Persson. 1993. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *Journal of Cell Biology* **123**, 455-465.
9. Gillen, C., C. Korfhage and H. W. Muller. 1997. Gene expression in nerve regeneration. *Neuroscientist* **3**, 112-122.
10. Gold, B. G., W. C. Mobley and S. F. Matheson. 1991. Regulation of axonal caliber, neurofilament content, and nuclear localization in mature sensory neurons by nerve growth factor. *Journal of Neuroscience* **11**, 943-955.
11. Gomez-Pinilla, F., Z. Ying, P. Opazo, R. R. Roy and V. R. Edgerton. 2001. Differential regulation by exercise of BDNF and NT-3 in rat spinal cord and skeletal muscle. *European Journal of Neuroscience* **13**, 1078-1084.
12. Gomez-Pinilla, F., Z. Ying, R. Roy, R. Molteni and V. Edgerton. 2002. Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. *Journal of Neurophysiology* **88**, 2187-2195.
13. Heumann, R., S. Korsching, C. Bandtlow and H. Thoenen. 1987. Changes of nerve growth factor synthesis in non-neuronal cells in response to sciatic nerve transection. *Journal of Cell Biology* **104**, 1623-1631.
14. Klintsova, A. Y. and W. T. Greenough. 1999. Synaptic plasticity in cortical systems. *Current Opinion in Neurobiology* **9**, 203-208.
15. Lefcort, F., K. Venstrom, J. A. McDonald and L. F. Reichardt. 1992. Regulation of expression of fibronectin and its receptor, 51, during development and generation of peripheral nerve. *Development* **116**, 767-782.
16. Lemke, G. 2001. Glial control of neuronal development. *Annual Review of Neuroscience* **24**, 87-105.
17. Lewin, G. R. and Y. A. Barde. 1996. Physiology of the neurotrophins. *Annual Review of Neuroscience* **19**, 289-317.
18. Martini, R. 2001. The effect of myelinating Schwann cells on axons. *Muscle Nerve* **24**, 456-466.
19. McAllister, A., L. C. Katz and D. Lo. 1999. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annual Review of Neuroscience* **22**, 295-318.
20. Mirsky, R. and K. R. Jessen. 1996. Schwann cell development, differentiation and myelination. *Current Opinion in Neurobiology* **6**, 89-96.
21. Miyata, H. and H. Itoh. 1986. CNS changes in the meconium aspiration syndrome. *Kobe Journal of Medical Sciences* **32**, 179-195.
22. Molteni, R., J. Q. Zheng, Z. Ying, F. Gomez-Pinilla and J. L. Twiss. 2004. Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 8473-8478.
23. Nico, L. U., P. T. van Meeteren, B. S. Brakkee, P. J. Hamers & W. H. Gispen. 1997. Exercise Training improves functional recovery and motor nerve conduction velocity after sciatic nerve crush lesion in the rat. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* **78**, 70-77.
24. Nieke, J. and M. Schachner. 1985. Expression of the neural cell adhesion molecules L1 and N-CAM and their common carbohydrate epitope L2/HNK-1 during development and after transection of the mouse sciatic nerve. *Differentiation* **30**, 141-151.
25. Raffaella, R., D. Gioia, M. De Andrea, P. Cappello, M. Giovarelli, P. Marconi, R. Manservigi, M. Gariglio and S. Landolfo. 2004. The interferon-inducible IFI16 gene inhibits tube morphogenesis and proliferation of primary, but not HPV16 E6/E7-immortalized human endothelial cells. *Experimental Cell Research* **293**, 331-345.
26. Schwab, M. E. 2000. Neurobiology. Finding the lost target. *Nature* **257**, 259-260.
27. Sendtner, M., B. Holtmann, R. Kolbeck, H. Thoenen and Y. A. Barde. 1992. Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature* **360**, 757-759.
28. Tetzlaff, W., N. R. Kobayashi, K. M. Giehl, B. J. Tsui, S. L. Cassar and A. M. Bedard. 1994. Response of rubrospinal and corticospinal neurons to injury and neurotrophins. *Progress in Brain Research* **103**, 271-286.
29. Thompson, S. W. N., D. L. H. Bennet, B. J. Kerr, E. J. Bradbury and S. B. McMahon. 1999. Brain-derived neurotrophic factor is an endogenous modulator of nociceptive responses in the spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 7714-7718.
30. van Meeteren N. L., J. H. Brakkee, P. J. Helders and W. H. Gispen. 1998. The effect of exercise training on functional recovery after sciatic nerve crush in the rat. *Journal*

of the Peripheral Nervous System **3**, 277-282.

31. van Meeteren, N. L., J. H. Brakkee, P. J. Helders, G. Croiset, W. H. Gispen, and V. M. Wiegant. 1997. Recovery of function after sciatic nerve crush lesion in rats selected for diverging locomotor activity in the open field. *Neuroscience Letters* **238**, 131-134.
32. Ying, Z., R. R. Roy, V. R. Edgerton and F. Gomez-Pinilla. 2003. Voluntary exercise increases neurotrophin-3 and its receptor TrkC in the spinal cord. *Brain Research* **987**, 93-99.
33. Zhang, J. Y., X. G. Luo, C. J. Xian, Z. H. Liu and X. F. Ahou. 2000. Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. *European Journal of Neuroscience* **12**, 4171-4180.