

랫드 척수신경 결찰에 따른 척수신경절세포의 퇴행성변화

김 이 석¹, 조 승 목*

¹이화여자대학교 의학전문대학원 해부학교실
가천의과학대학교 기초의학부 해부학과

Degenerative Changes of the Rat Dorsal Root Ganglion (DRG) Cells Following a Tight Spinal Nerve Ligation

Yi-Suk Kim¹ and Seung Mook Jo*

¹Department of Anatomy, Ewha Womans University School of Medicine, Seoul 158-710, Korea
Department of Anatomy, Gachon Medicine and Science University, Incheon 406-799, Korea
(Received August 25, 2009; Accepted September 22, 2009)

ABSTRACT

This study aim to disclose a possible mechanism for the neuronal cell death induced by peripheral nerve injury following a spinal nerve ligation (SNL) as a neuropathic pain model. Male Sprague-Dawley rats (270~290 g) were used for this study. Pain threshold was evaluated for their response to mechanical (von Frey hairs) stimuli 1, 3, and 7 days after a tight ligation of L5 ventral ramus.

In control group, the small ganglion cells were strongly stained with routine toluidine blue(TB), whereas the large ganglion cells showed a little bit weak stainity. Each large ganglion cell is surrounded by perineuronal satellite cells.

In experimental groups, small ganglion cells showing apparent degenerative changes increased on 1 day, and showed a peak in degenerative cell number at 3 days group, and decreased gradually at 7 days group. We also found a small number of large-sized ganglion cells showing mild degenerative changes. However their satellite cells were relatively intact with no typical findings throughout this experiment. Under the electron microscope, small ganglion cells showed various stage and typical features of the dark degeneration including mitochondrial swelling.

Keywords : Dark degeneration, Ganglion cell, Nerve ligation, Rat

서 론

본 연구자들은 몇 가지 랫드 통증모델을 만들어, 수술 후 시간경과에 따른 통증에 대한 반응을 행동검사로 확인하고, 각 실험동물의 척수 내 Zn^{2+} 의 변화를 조직화학법으로 염색한 후 형태계측학적으로 정량화함으로써 통증의 발달, 유지, 종결 등 복잡한 통증기전에서 Zn^{2+} 가 관여되어 있음을 보고

한 바 있다(Kim et al., 2004; Lee et al., 2005).

통증은 일반적으로 급성 및 만성통증으로 구분하며, 척수 신경절(dorsal root ganglion, DRG)에 있는 일차감각신경세포(primary afferent neurons)에 의해 만들어지는 말초신경계 통과 척수 및 뇌로 구분되는 중추신경계통에 거쳐 복잡한 조절기전으로 구분된다. 논란의 여지가 있으나 급, 만성통증의 특징인 “Central Sensitization (CS)”에 의한 통증은 일차 감각세포가 위치하는 DRG와 이들 신경섬유가 정지하는 부

* Correspondence should be addressed to MD, PhD. Seung Mook Jo, Department of Anatomy, Gachon Medicine & Science University 534-2, Yeonsu-3 Dong, Yeonsu-Gu, Incheon 406-799, Korea. Ph.: (032) 820-4703, Fax: (032) 460-3824, E-mail: josm@gachon.ac.kr

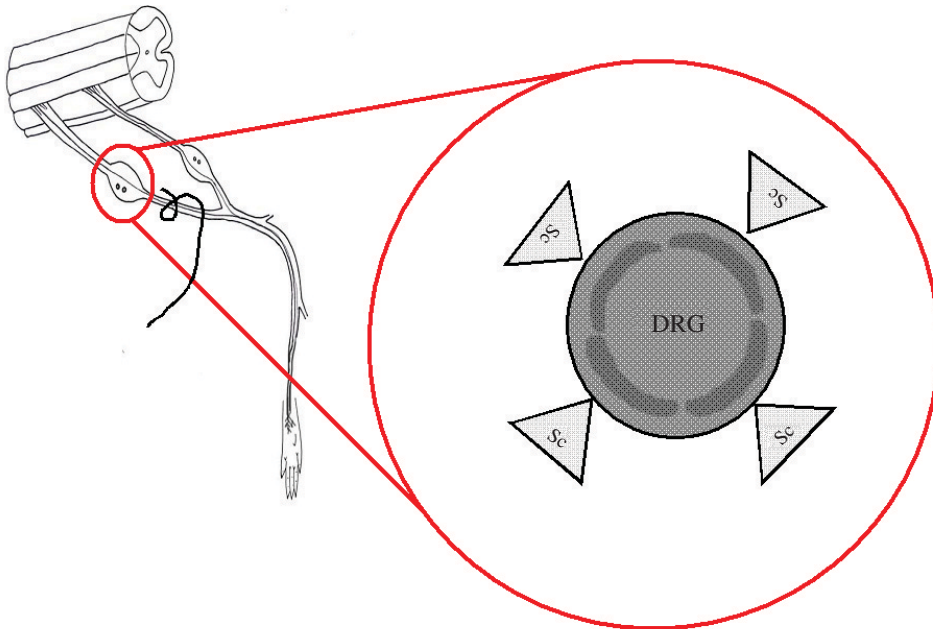


Fig. 1. Schematic drawing of surgical approach for rat spinal nerve ligation (SNL). Left sciatic nerve is exposed and a single silk ligature is tied tightly the nerve. The rat dorsal root ganglion consists of small, medium-sized, and large ganglion cells (DRG) with surrounding satellite cells (Sc).

위, 즉 척수의 등쪽 회색질 내에서 발달된다(Dykes, 1983; Besson, 1999; Zimmermann, 2001).

최근 들어 다양한 통증모델 동물을 대상으로 통증의 발달, 유지 및 회복 등에 관련된 기전을 밝히기 위해서 연구가 활발하다. 형태학적으로는 이들 동물의 척수회색질 및 척수신경절 내 존재하는 각종 신경활성물질들 - substance P (Mapp et al., 1993; Furst, 1999), glutamate (Sluka et al., 1993), NMDA receptors (Ren & Dubner, 1993), opioid receptors (Goff et al., 1998), NGF (Lee et al., 1998) 등의 변화가 주목된다.

따라서 본 연구자들은 잘 알려진 랫드 통증모델에서 신경활성물질의 변화와 함께 일차적으로 통증자극 후 시간경과에 따른 척수신경절 내 신경절세포의 변성과정을 광학 및 전자현미경으로 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 연구에서는 10주령, Sprague-Dawley 계통의 랫드를 사용하였으며, 척수신경 결찰 수술기준으로 1일, 3일 및 7일 실험군으로 대별하였다.

2. 척수신경 결찰

랫드를 pentobarbital (50 mg/kg, ip)로 깊게 마취한 후 등쪽의 털을 깎고, 수술대 위에 복외위(prone position)로 위치시켰다. 모든 수술은 무균적으로 조작하였고, 일단 랫드의 왼쪽 허리엉치부위(lumbar & sacral regions)의 등쪽(정중

서 외측 5 mm) 피부를 위, 아래로 충분히 절개하였다. 이어서 등근육을 찌는 근육을 미세가위를 사용하여 등근육과 결합조직을 제거하여 6번째 허리척추(L6)의 가로돌기를 노출시켰다. 골겸자(rongeur)를 사용하여 L6 가로돌기를 제거하고, 그 아래로 지나가는 L5 척수신경의 앞가지(ventral ramus)를 실크(black silk, 6.0)를 이용하여 단단히 붙들어 매고, 매듭의 아래 척수신경을 미세가위로 자르고, 근육과 피부를 봉합하여 일련의 결찰수술을 완료하였다(Fig. 1). 대조군은 위의 방법중 결찰과 신경절단 전단계까지는 동일하게 시행한 후 각각의 실험군에 대응시켰다.

3. 조직표본제작

각 실험군의 흰쥐는 해당 시간군에 이르러 ether로 알게 마취시킨 후 pentobarbital (30 mg/kg)으로 깊게 마취한 후 3% glutaraldehyde (GA) 액으로 관류고정시키며, 동물을 희생시켰다. 조직채취는 여섯 번째 허리 척수신경절(L6)을 절취하였고, 약 30분간 4°C에서 동일고정액에 추가로 후고정하고 나서, 30% sucrose 용액에 가라앉을 때까지 담가두었다. 이어서 냉동절단기(freezing microtome)로 30 μ m 두께의 냉동절편을 만들어 젤라틴이 발라진 슬라이드 위에 올리고, 실온에서 약 10분간 말린 후 냉장고에 보관하였다. 일반적인 조직관찰을 위해서 toluidine blue (TB) 염색을 사용하였으며, 알코올과 자일렌 등을 이용한 탈수과정 및 청명과정을 거쳐 반영구적인 광학현미경 조직표본을 완성하였다.

전자현미경 관찰을 위한 실험으로 고정된 척수신경절을 떼어낸 후 일반적인 전자현미경 포매과정을 거쳐, 2 μ m 두께의 semithin section을 만들어 우선 광학현미경으로 필요한

부위를 관찰하고, 100 nm의 thin section을 만들어 우라닐과 납을 이용한 이중염색을 시행한 후 투사전자현미경 (Philips 208)으로 관찰하였다.

결 과

1. 통증반응검사

척수신경 결찰수술이 성공적으로 끝난 랫드의 경우 수술된 쪽의 발바닥이 아래로 떨어지고(plantar flexion), 안쪽을 향하며(inversion), 뒷다리를 약간 절름거리며 지면에 완전히 착지하지 못하는 특징을 보인다. 이러한 랫드는 수술 후 1일에 특징적인 신경병성통증반응(neuropathic behaviors), 즉 부드러운 낙타털의 자극에도 발바닥을 들어 올리는 행동을 보였으며, 이러한 통증반응은 수술 후 5일에 가장 최고점에 이르렀다가, 그 후 수 주간에 걸쳐 조금씩 감소되는

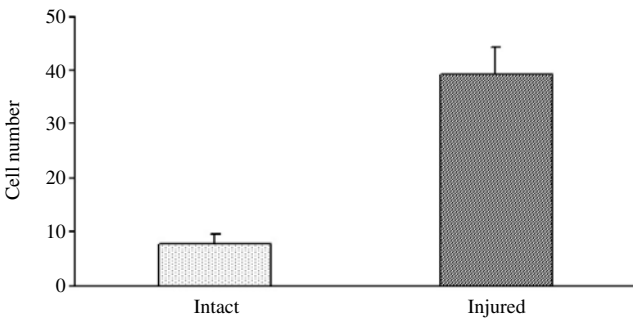


Fig. 2. Increased number of small ganglion cells showing typical dark degenerative changes at 3 days after SNL. The degenerative cells per unit area (1 cm²) is counted under ×200 in magnification.

양상이었다(data not shown).

2. 광학현미경 소견

흰쥐 척수신경절은 크게 2부분으로 구분되었는데, 신경절 세포체가 무리지어 많이 분포해 있고 신경섬유가 적은 주변 부위를 피질구역(cortical zone)과 신경섬유가 많고 소수의 신경절세포가 흩어져 있는 중심부위를 수질구역(medullary zone)으로 구분되었다(Fig. 3A). 피질구역에 관찰된 신경절 세포의 세포체는 둥글거나 타원형이며, 모든 신경절세포의 세포체는 신경아교세포의 일종인 한 층의 납작한 위성세포(satellite cell)에 의하여 둘러싸여 있었으며, 특히 큰 신경절 세포의 경우 3~5개의 위성세포가 관찰되었다(Fig. 3B).

작은 신경절세포의 경우 1일군에서 이미 대조군에 비해 유의한 수준으로 증가되었으며, 실험 3일군과 7일군에서 단위면적당 변성소견을 보이는 작은 신경절세포의 수가 대조군에 비해 급격히 증가되었다(Fig. 2). 반면 큰 신경절세포의 경우 실험 1일 및 3일군에서 대조군과 별다른 차이점이 관찰되지 않았으나, 실험 7일군에 이르러 미약한 변성을 보이는 세포가 관찰되었다. 특히 이들 세포를 둘러싸고 있는 위성세포의 경우 전혀 변성소견을 보이지 않았다.

3. 전자현미경 관찰

작은 신경절세포의 경우 1일군 이후에서 뚜렷한 변성양상이 흔히 관찰되었다. 세포질소기관중에서 사립체 능선(cristae)의 변형이 뚜렷하였으며, 3일군 이후에는 사립체의 심한 부종이 관찰되었으며, 7일군에서는 세포질이 전반적으로 검게 변하는 암적화 변성(dark degeneration)을 보였다(Fig. 4). 반면 큰 신경절세포의 경우 세포질 소기관들의 형태가

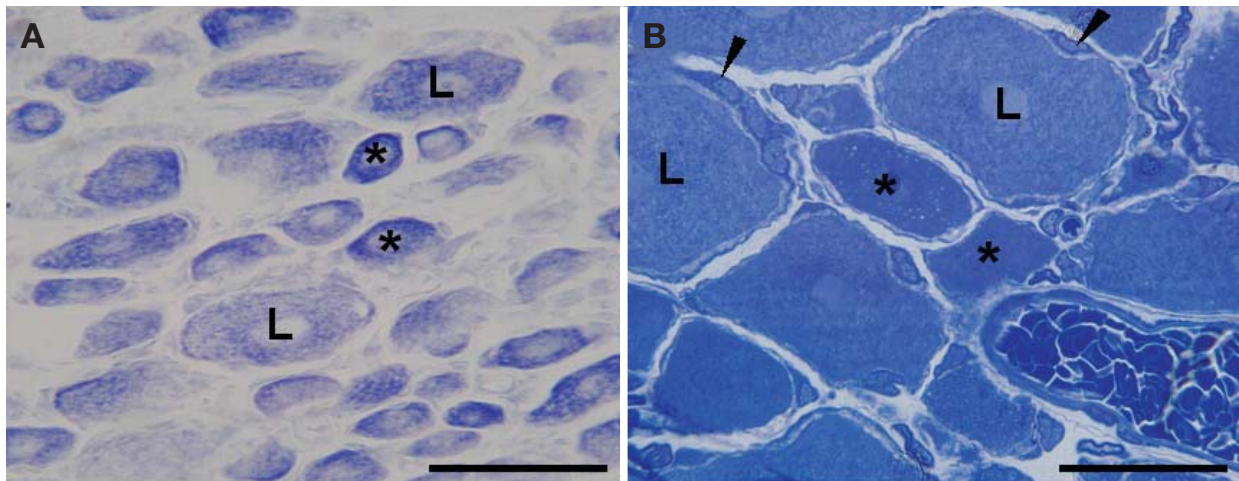


Fig. 3. Light micrographs taken from rat L5 spinal ganglion at the control (A) and 1 day groups (B). Ganglion cells vary in size from 15 to 100 μm. In general, these cells fall into two size groups, that is, the small ganglion cells (asterisks) are strongly stained with TB, whereas the large ganglion cells (L) show weak positive staining. Arrowheads indicate the satellite cells surrounding the large ganglion cells. Scale bars in A & B indicate 100 μm & 50 μm, respectively.

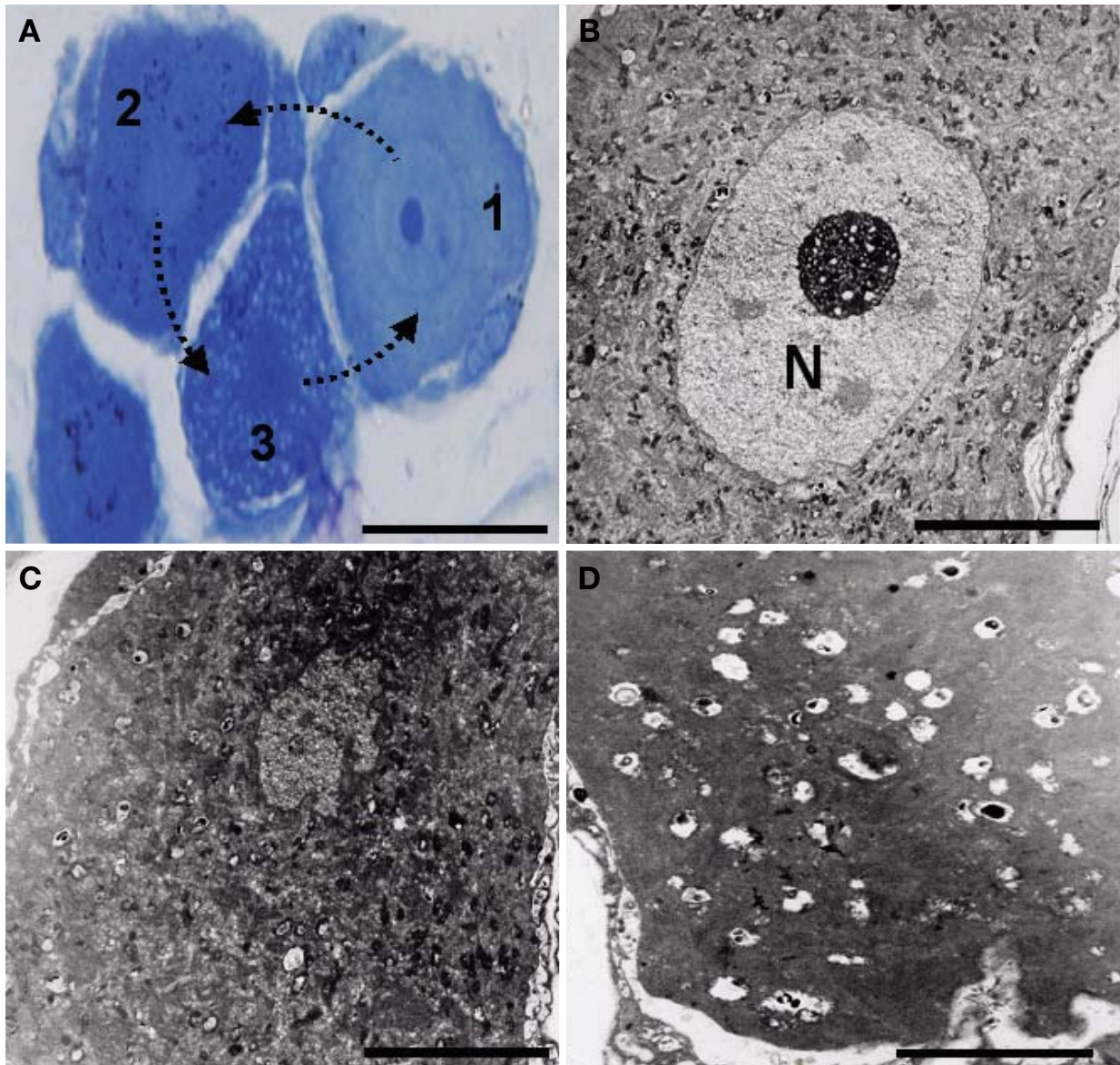


Fig. 4. Electron micrographs (B, C, D) taken from the rat ganglion cells at 7 days after the SNL. Ganglion cells show various stage and typical features of the dark neurodegeneration in the perikarya. Panel A is taken from an epon-embedded section and stained with toluidine blue (TB). Ganglion cells showing different stages (1, 2, 3) of dark degeneration are simultaneously found. Scale bars in Fig. A & B-D indicate 50 μm and 10 μm , respectively.

비교적 잘 보존되어 있었으며, 검게 변성된 세포는 전혀 관찰되지 않았다.

고 찰

척수신경 결찰 후 시간경과에 따른 기계적 통증자극에 대한 행동반응을 확인하였으며, 결찰 후 1일에 이미 유의한 수준으로 변화되었으며, 이는 7일군까지 지속되었다. 이러한 통증에 대한 예민도는 대개 3일군에 최고점에 도달하였다

가 수 주(2~3 wks) 내로 정상치로 회복되는 경향을 보였다. 이러한 연구결과는 본 연구자의 보고(Kim et al., 2004; Lee et al., 2005; Jo et al., 2007)와 일반적인 패턴에서 일치하였다. 피질구역에 관찰된 신경절세포의 세포체는 둥글거나 타원형이며, 작은 신경절세포, 큰 신경절세포 및 중간크기의 세포 등 최소 3종류로 구분되었으며, 작은 신경절세포의 세포체의 직경은 15~30 μm 였으며, 큰 신경절세포의 직경은 100 μm 에 이르는 것도 관찰되었다. 이러한 결과는 과거 연구자들의 보고와도 부합되었다(Velazquez et al., 1999; Pérez-Castejón et al., 2002).

과거 몇 가지 통증모델을 대상으로 시행된 연구결과들은 주로 척수신경 손상(Furst, 1999; Kato et al., 2003) 및 염증성 통증자극(Ji et al., 1994; Wang et al., 1999; Gould et al., 2004; Inglis et al., 2005; Takeda et al., 2005)과 같은 만성통증에 관한 연구가 대부분이다. 이들의 연구목적은 통증관련 신경활성물질의 변화를 조직화학적으로 정량하고, 이를 통증의 발달, 유지, 회복 등 복잡한 통증기전과 어떤 상관관계를 밝히는 기능적 연구에 집중되어 왔을 뿐 신경절세포의 변성기전을 밝히고, 형태학적 변화를 경시적으로 관찰한 연구보고를 접하기는 어려웠다.

본 연구에서 신경결찰을 시행한 실험군에서 변성소견을 보이는 작은 신경절세포의 수를 계수하였던 결과 1일부터 증가되기 시작하여, 3일군에 이르러 유의한 수준으로 감소되었고, 7일군에 이르러 최고점에 이르렀다. 이는 신경결찰에 따른 통증자극에 의해 신경절세포가 손상되어 사멸되기 때문이라고 생각된다. 말초신경의 자극에 따른 척수신경절세포의 손상에 관한 연구보고(Henken et al., 1993; Lekan et al., 1997)는 소수 접할 수 있으며, 다섯째 허리신경을 묶는 시술(tight ligation of ventral ramus, L5)에 의해 본 연구와 비슷한 시기에 약 40% 이상의 신경절세포의 소실이 관찰되었다고 보고된 바 있다.

그러나 말초 결합조직 및 중추 신경조직에서의 변화가 이들의 중간 다리 역할을 하는 DRG와 기능적으로 매우 밀접한 관련이 있지만, 반드시 형태학적으로 일치하지 않을 수 있음을 시사한다. 이를 뒷받침하는 과거 연구결과로서 Klein et al. (1991)은 말초신경의 손상은 신경절세포의 손실 또는 사멸의 여부와 관계없이 척수회색질 내 신경활성물질의 분포에 영향을 줄 수 있다고 보고한 바 있다. 통증반응과 신경활성물질의 변화량 간에 일치하지 않는 소견은 본 연구자들이 생쥐에서 척수신경 결찰에 따른 통증반응의 양상과 척수회색질 내 신경활성물질의 변화를 비교한 최근 연구결과(Jo et al., 2007)에서도 관찰되었다.

본 연구에서 신경결찰에 따른 신경절세포의 변성소견을 주로 사립체를 포함한 세포소기관의 부중에 이어 세포질이 전자밀도가 증가되는 소견을 보였는데, 이는 세포사멸기전 중 괴사(necrosis)의 일종으로 이에 대한 몇몇 보고가 다양한 신경독성모델에서 보고된 바 있다(Jo et al., 1998).

척수신경절세포의 사멸기전과 관련된 연구 중에서 좌골신경을 묶고 자르는 실험모델(ipsilateral sciatic nerve transaction)에서는 주로 핵질의 변화가 동반되는 세포자멸사(apoptosis)의 소견을 보였다(Pierucci & de Oliveira, 2006). 배양 척수신경절세포를 대상으로 Ox-LDL이란 독성물질로 처리할 경우에는 전형적이지는 않지만 괴사(secondary necrosis) 소견을 보였으며(Papassotiropoulos et al., 1996), 갓 태어난 랫드에게 통증자극물질을 투여하는 통증모델(neonatal capsaicin treatment)에서는 사립체의 부중이 오랜기간 지속되

는, 소위 long-lasting mitochondrial swelling 소견이 흔히 관찰된다(Chard et al., 1995; Szoke et al., 2002). 이러한 과거 연구자들의 결과를 통해 말초신경의 자극 및 손상 후에 초래되는 신경절세포의 변성은 다양한 형태학적 변화를 동반하며, 단순한 사멸기전으로는 설명이 어렵다는 것을 알 수 있다.

본 연구의 결과를 요약하면, 척수신경 결찰 후 초기 실험군에서 작은 신경절세포의 심한 세포변성이 관찰되었으며, 미토콘드리아의 부종과 세포질이 검게 응축되는 암적화변성(dark degeneration)의 특징을 보였다. 반면에 큰 신경절세포의 경우 소수의 세포에서 미약한 변성소견만을 보였다. 이는 작은 신경절세포가 통증의 발달, 유지, 회복기전에서 척수신경절 내 다른 신경절세포와는 상이한 기능을 영위한다는 사실을 뒷받침하는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Besson JM: The neurobiology of pain. *Lancet* 353 : 1610-1615, 1999.
- Chard PS, Bleakman D, Savidge JR, Miller RJ: Capsaicin-induced neurotoxicity in cultured dorsal root ganglion neurons: involvement of calcium-activated proteases. *Neuroscience* 65 : 1099-1108, 1995.
- Dykes RW: Parallel processing of somatosensory information: a theory. *Brain Res Rev* 6 : 47-116, 1983.
- Furst S: Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res Bull* 48 : 129-141, 1999.
- Goff JR, Burkey AR, Goff DJ, Jasmin L: Reorganization of the spinal dorsal horn in models of chronic pain: correlation with behaviour. *Neurosci* 82 : 559-574, 1998.
- Gould HJ 3rd, England JD, Soignier RD, Nolan P, Minor LD, Liu ZP, Levinson SR, Paul D: Ibuprofen blocks changes in Na^v 1.7 and 1.8 sodium channels associated with complete Freund's adjuvant-induced inflammation in rat. *J Pain* 5 : 270-280, 2004.
- Henken DB, Goldstein ME, Martin JR: Herpes simplex virus type-2 infection by a footpad route results in neuronal death in mouse spinal ganglia. *J Neurol Sci* 115 : 177-183, 1993.
- Inglis JJ, Nissim A, Lees DM, Hunt SP, Chernajovsky Y, Kidd BL: The differential contribution of tumour necrosis factor to thermal and mechanical hyperalgesia during chronic inflammation. *Arthritis Res Ther* 7 : R807-816, 2005.
- Ji RR, Zhang X, Wiesenfeld-Hallin Z, Hokfelt T: Expression of neuropeptide Y and neuropeptide Y (Y1) receptor mRNA in rat spinal cord and dorsal root ganglia following peripheral tissue inflammation. *J Neurosci* 14 : 6423-6434, 1994.
- Jo SM, Danscher G, Schroder HD, Suh SW: Depletion of vesicular zinc in dorsal horn of spinal cord causes increased neuropathic pain in mice. *Biomaterials* (in press), 2007.
- Jo SM, Nam SA, Yoon SS, Ko BM, Choi CD, Choi WB, Chun M:

- Indoleamine-accumulating cell death and endogenous glial cell reaction induced by 5,7-dihydroxytryptamine in the the cat retina. *J Korean Med Sci* 13 : 414-422, 1998.
- Kato N, Nemoto K, Arino H, Fujikawa K: Influence of peripheral inflammation on growth-associated phosphoprotein (GAP-43) expression in dorsal root ganglia and on nerve recovery after crush injury. *Neurosci Res* 45 : 297-303, 2003.
- Kim SJ, Choi YH, Yu YC, Lee B, Jo SM: Decrease in zinc concentration in the rat spinal gray matter induced by peripheral nerve ligation, and its relation with increased pain threshold. *Korean J Anat* 37(4) : 369-375, 2004. (Korean)
- Klein CM, Guillanmondegui O, krenck CD, La Forte RA, Coggeshall RE: Do neuropeptides in the dorsal horn changes if the dorsal root ganglion cell death that normally accompanies peripheral nerve transection is prevented. *Brain Res* 552(2) : 273-282, 1991.
- Lee B, Jun G, Kim YS, Lee B, Lee YI, Kim DJ, Jo SM: Alteration of ionic zinc distribution in rat spinal ganglion by inflammatory pain stimuli: Autometallography. *Korean J Anat* 38(6) : 561-566, 2005.
- Lee SE, Shen H, Taglialatela G, Chung JM, Chung KS : Expression of nerve growth factor in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury. *Brain Res* 796 : 99-106, 1998.
- Lekan HA, Chung K, Yoon YW, Chung JM, Coggeshall RE: Loss of dorsal root ganglion cells concomitant with dorsal horn root axon sprouting following segmental nerve lesions. *Neurosci* 81 : 527-534, 1997.
- Mapp PI, Terenghi G, Walsh DA, Chen ST, Cruwys, Garrett N, Kidd BL, Polak JM, Blake DR: Monoarthritis in the rat knee induces bilateral and time-dependent changes in substance p and calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord. *Neurosci* 57 : 1091-1096, 1993.
- Papassotiropoulos A, Ludwig M, Naib-Majani W, Rao GS: Induction of apoptosis and secondary necrosis in rat dorsal root ganglion cell cultures by oxidized low density lipoprotein. *Neurosci Lett* 3 : 33-36, 1996.
- Pérez-Castejón MC, Vera-Gil A, Lahoz M, Aisa J, Recreo MP, Pes N, Serrano P, Barral MJ: Location of Zinc and ⁶⁵Zn in spinal ganglia of the rat. *Histol Histopathol* 17 : 799-903, 2002.
- Pierucci A, de Oliveira AL: Increased sensory neuron apoptotic death 2 weeks after peripheral axotomy in C57BL/6J mice compared to A/J mice. *Neurosci Lett* 27 : 127-131, 2006.
- Ren K, Dubner R: NMDA receptor antagonists attenuate mechanical hyperalgesia in rat with unilateral inflammation of the hind-paw. *Neurosci Lett* 163 : 22-26, 1993.
- Sluka KA, Westlund KN: Behavioral and immunohistochemical changes in an experimental arthritis model in rats. *Pain* 55 : 367-377, 1993.
- Szoke E, Seress L, Szolcsanyi J: Neonatal capsaicin treatment result in prolonged mitochondrial damage and delayed cell death of B cells in the rat trigeminal ganglia. *Neuroscience* 113 : 925-937, 2002.
- Takeda M, Tanimoto T, Nasu M, Ikeda M, Kadoi J, Matsumoto S: Activation of NK1 receptor of trigeminal root ganglion via substance P paracrine mechanism contributes to the mechanical allodynia in the temporomandibular joint inflammation in rats. *Pain* 116 : 375-85, 2005.
- Velazquez RA, Cai YJ, Shi Q, Larson AA: The distribution of zinc selenite and expression of metallothionein III mRNA in the spinal cord and dorsal root ganglia of the rat suggest a role for zinc in sensory transmission. *J Neurosci* 19 : 2288-2300, 1999.
- Wang H, Zhang RX, Wang R, Qiao JT: Decreased expression of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in rat dorsal root ganglion following complete Freund's adjuvant-induced inflammation: an immunocytochemical study for NMDA NR1 subunit. *Neurosci Lett* 23 : 195-198, 1999.
- Zimmermann M: Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 19 : 23-37, 2001.

< 국문초록 >

본 연구는 잘 알려진 통증모델을 대상으로 척수신경절세포의 변성과정을 경시적으로 관찰하고자 하였다. 10주령된 Sprague-Dawley 계통의 랫드를 실험동물로 사용하였고, pentobarbital (50 mg/kg)로 마취상태에서 다섯째 허리신경 (L5)의 앞가지를 결찰한 후 1일, 3일, 7일 실험군으로 구분하였다.

실험 1일과 3일군에서 작은 신경절세포에서 퇴행성변화가 먼저 관찰되었고, 중간 및 큰 신경절세포에서는 그 변화가 미약했다. 7일 실험군에서는 작은 신경절세포의 수가 크게 감소하였던 반면, 중간 및 큰 신경절세포에서는 큰 변화가 없었다. 전자현미경 소견으로는 작은 신경절세포의 경우 초기 1일 및 3일군에서 미토콘드리아의 능선의 변형과 부종이 관찰되었으며, 세포질은 검게 변성되었다. 반면 큰 신경절세포의 경우 모든 실험군에서 변형된 세포가 관찰되지 않았으며, 소기관들도 잘 보존되었다.

이상의 결과를 요약하면, 척수신경 결찰에 의한 통증자극으로 랫드 척수신경절 내 작은 신경절세포는 다른 신경절세포에 비해 퇴행성변화가 빠르게 나타났으며, 미토콘드리아 등 세포질소기관의 부종을 동반한 암적화변성 (dark degeneration)을 통해 사멸되었다.