

좌상후 말초신경의 조직학적 변화

정소학, 김성대, 권영호, 손정환, 백선용*

고신대학교 의학부 정형외과학교실
부산대학교 의과대학 해부학교실*

Morphological Changes in the Peripheral Nerve after Crush Injury

So Hak Chung, Seong Dae Kim,
Young Ho Kwon, Jung Hwan Son, Sun Yong Baek*

Department of Orthopaedic Surgery, Kosin University College of Medicine, Pusan, Korea

*Department of Anatomy, Pusan National University College of Medicine, Pusan, Korea

Abstract

Background The morphological changes in the peripheral nerve and S-100 immunoreactivity were studied after axotomy. **Methods** Adult Sprague-Dawley rats received crush injury with aneurysmal clip in the sciatic nerve at mid-thigh level. The animals were cardiac perfused with 4% paraformaldehyde for cryostat section and half Karnovsky fixative for semithin section from 6 hours to 4 weeks after crush injury. The immunohistochemistry of Schwann cells was performed. **Results** Degeneration of myelin sheath and endoneurial edema were observed at 6 hours. Macrophages were invaded into the basal lamina tube and phagocytosed the destructed axons and myelin sheath at 3 days. Proliferation of Schwann cells in the basal lamina tube was observed at 5 days group. Thin myelinated nerve fiber and degeneration of myelin sheath were observed at 2 weeks. **Conclusion** These results indicate that after crush injury of the peripheral nerve regeneration of myelin sheath and Schwann cells is partially completed in 1 week.

Key Words: Peripheral nerve, Crush injury.

서론

말초신경은 중추신경계내에 위치하는 신경원의 돌기인 축삭(axon)과 신경 아교세포(neuroglia) 및 결합조직막으로 구성되어 있다. 하나의 축삭과 이를 둘러싸는 말이집(myelin)을 신경섬유라고 하며 말이집에 싸여있지 않은 축삭은 그 자체가 하나의 신경섬유이다. 말이집에 싸여있는 신경섬유를 말이집 신경섬유(myelinated nerve fiber)라고 하며, 말이집에 의해 싸여있지 않는 신경섬유를 민말이집 신경섬유(unmyelinated nerve fiber)라고 한다.¹⁾ 말이집은 신경아교세포의 하나인 신경집 세포(neurilemma, Schwann cell)에 의해 형성된다. 여러개의 말이집 신경섬유와 민말이집 신경

섬유가 모여 신경섬유 다발을 형성하며, 이러한 신경섬유다발이 결합조직막에 의해 싸여 있는 구조가 육안으로 관찰되는 신경이다. 신경집세포는 말초신경계에서 말이집을 형성하는 세포이며, 민말이집 신경섬유도 둘러싸고 있으며, 그 바깥의 신경섬유막과의 사이에는 기저막이 위치한다. 말이집 신경섬유에서 각각의 신경집 세포는 마디사이 분절을 형성하며, 인접한 마디사이의 분절에는 랑비에 마디(node of Ranvier)가 위치한다. 그러므로 신경집 세포는 축삭을 따라 랑비에 마디를 사이에 두고 불연속적으로 위치하지만, 기저막은 그 바깥을 연속적으로 둘러싸고 있다. 민말이집 신경섬유는 인접한 신경집 세포 사이에 틈새없이 연속되고 있고 바깥은 역시 기저막으로 싸여 있다. 그러므로 말초신경계의 모든 신경섬유는 연속적인 기저막관 내에 위치하여 있다.

모든 신경원에서 축삭이 절단되면 그 원위부 즉 축삭종말쪽은 퇴행성 변화를 보이며 이를 월러변성

교신저자 : 정 소 학
TEL. 051-240-6467 · FAX: 051-243-0181
E-mail: csh@ns.kosinmed.or.kr

(Wallerian degeneration) 또는 축삭변성(axonal degeneration)이라고 한다.²⁾ 축삭과 축삭종말에서 필요한 모든 단백질은 신경세포체에서 합성되어 전행성 축삭이동을 통해 전달되기 때문에 축삭이 끊어지면 이러한 전달과정이 중단되므로 축삭종말쪽은 괴사할 수밖에 없다. 축삭이 절단되면 절단 원위부의 축삭에는 부종이 나타나며, 손상 3-5일 후에는 여러개의 작은 조각으로 분절된다. 말이집 역시 축삭과 함께 파괴된다. 말이집은 점차 여러조각으로 나누어지며 처음에는 충판구조를 어느 정도 유지하지만 점차 충판구조가 없는 원형 또는 타원형의 지방방울로 변화한다. 이러한 축삭과 말이집의 잔해들은 대식세포와 신경집세포에 의해 포식, 처리된다. 대식세포는 신경집 세포를 증식시키는 인자를 분비하여 증식을 유도하고 포식능력을 증가시키는 것으로 알려져 있다.³⁾

말초신경이 손상을 받으면, 신경 세포체에서는 표적 장기와의 기능적 접촉을 회복하기 위한 반응이 일어난다. 손상의 원위부가 재생에 적절하다면, 신경 세포체에서는 축삭의 신전에 필요한 반응이 일어나며, 말초신경의 성공적인 재생을 위해서는 손상의 원위부가 중요한 요소로 작용한다. 신경 세포체에서 일어나는 반응은 손상의 종류와 재생의 성공 여부에 따라서 다르게 나타난다.

말초신경이 좌상을 받으면, 말이집과 축삭은 손상을 받지만 기저막관은 그대로 유지되어 말초신경의 재생에 작용한다. 본 실험은 좌상을 받은 말초신경부위의 형태학적 변화를 시간적 추이에 따라 관찰하였다.

재료 및 방법

성체의 숫컷 흰쥐 Sprague-Dawley(체중 200-250 gm)를 pentobarbital sodium(50 mg/kg)으로 복강주사하여 마취시키고, 대퇴의 중간 지점에서 오른쪽 엉덩이 신경을 노출시켰다. 내폐쇄근의 힘줄에서 4 mm 정도 원위부의 좌골신경을 드라이 아이스로 냉각시킨 동맥류용 클립으로 30초간 눌러 주고 30초간 풀어주는 조작을 3회 실시하고 수술부위를 봉합하여 시간 경과에 따라 동물을 희생시켰다. 실험적 조작을 하지 않은 왼쪽을 대조군으로 이용하였다.

손상후 감각신경세포의 변화를 6시간, 12시간, 1일, 5일, 1주, 2주, 3주, 4주에 걸쳐서 관찰하였다. 실험동

물을 100 ml의 0.02 M phosphate buffered saline(PBS)액으로 심장관류를 시켜 혈액을 씻어내고, 광학현미경용 표본은 4% paraformaldehyde를 포함하는 0.1 M phosphate buffer(PB)액으로, 그리고 준초박절편용 표본은 400 ml의 half Karnovsky액(2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer)으로 고정하였다. 양쪽의 엉덩이 신경과 4번과 5번 요추 신경의 후근 신경절을 분리하여 동일 고정액으로 4시간 동안 후고정을 하였다. 광학현미경용 표본은 30% sucrose를 포함하는 0.1 M PB액에 넣어 가라앉은 뒤에 동결절편기를 이용하여 두께 10 μ m의 조직절편을 얻어 젤라

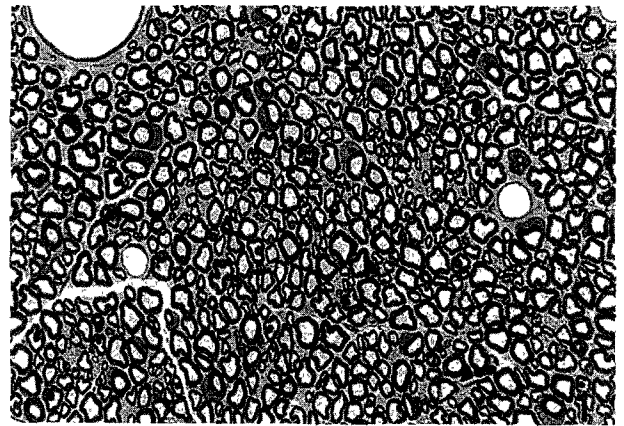


Fig. 1. Photomicrograph of semi-thin section in the control peripheral nerve showing the myelinated nerve fibers with blue colored myelin sheath, Schwann cells, and endoneurium (400 x).

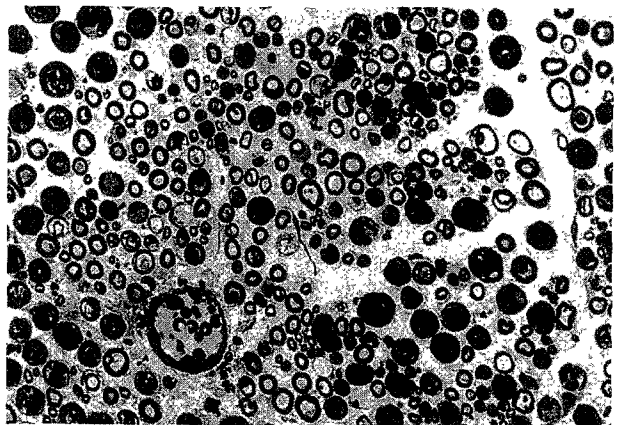


Fig. 2. The degenerated myelin sheath and endoneurial edema were observed at 6 hours (400 x)

틴 처리한 slide glass에 부착시켜 반응전 까지 냉장고에 보관하였다. 준초박 절편용 표본은 다음날 0.1M PB액으로 고정액을 제거하고 1% OsO₄액으로 90분동안 후 고정하였다. 수세과정 이어서 알콜과 propylene oxide를 이용한 탈수와 침투과정을 거쳐 Epon 혼합액에 포매하여 60℃ 배양기에서 3일동안 중합과정을 거쳤다. 중합이 끝난 조직을 초박절편기를 이용하여 두께 1μm의 절편을 얻어 젤라틴 처리한 slide glass에 부착시켜 toluidine blue 염색을 실시하였다.

말초신경에서 신경집 세포의 증식을 알아보기 위하여 신경집 세포의 표식자인 S-100 단백질에 대한 항체를 이용하여 면역조직화화법을 실시하였다. 냉동고에 보관중인 절편을 실온에서 3시간 이상 바람을 이용하여 건조시키고, PBS액에 넣어 고정액을 제거하였다. 비특이적인 반응을 억제하기 위하여 10% 정상 염소혈청으로 1시간 동안 반응시키고, 반응액을 제거한 후, 일차항체 반응을 실시하였다. 일차항체는 시판중인 S-100(Incstar, California, USA)항체를 이용하였다. 항체는 반응액에 1:1000으로 희석하여 실온에서 12시간 혹은 4℃에서 48시간동안 반응시켰다. 반응액은 1% 정상 염소혈청, 1% bovine serum albumin, 0.1% Triton X-100를 포함하는 0.02M PBS액을 이용하였다. 일차항체 반응을 마친 절편을 PBS, 1% Triton X-100를 포함하는 PBS액 이어서 PBS액으로 세척하고 이차항체인 비오틴화 염소 항-토끼 혈청(Incsatr, California, USA)을 반응액에 1:200으로 희석하여 2시간동안 반응하였다. 반응을 마친 절편을 동일한 방법으로 세척한 후에 peroxidase로 표식된 avidin-biotin complex로 반응하였다. 또 다시 세척과정을 거쳐 peroxidase 발색을 위하여 0.05% diaminobenzidine (DAB)-0.01% H₂O₂액으로 반응한 후 세척하여 cresyl violet 염색을 실시하였다.

결과

준초박절편에서 대조군의 엉덩이 신경은 대부분이 말이집 신경섬유로 구성되어 있었다. 말이집은 toluidine blue에 진한 청색으로 나타났으며, 드물게 그 바깥에 위치하는 신경집 세포를 관찰할 수 있었다. 신경섬유사이의 좁은 공간에는 신경내막이 위치하여 있었다(Fig. 1). 시간별 추이에 따른 엉덩이신경의 좌상부위의 형태학적 변화를 광학현미경하에서 관찰하였다. 6

시간 후 말이집은 변성되어 있었으며, 신경내막의 부종으로 신경섬유사이에는 넓은 공간이 존재하였다(Fig. 2). 12시간 후 말이집의 파괴는 진행되고 있었으며, 부종은 감소되었지만, 신경속 혈관(vasa nervorum)에는 혈전증을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 3일 후 말이집내의 부종으로 현저히 파괴되었으며, 그 바깥은 기저막으로 완전히 둘러싸여 있었다(Fig. 4). 신경내막의 결합 조직내에는 대식세포가 위치하였으며 일부는 기저막을 통과하여 기저막관내에서 파괴된 말이집을 포식하는 것도 관찰되었다(Fig. 5). 5일 후 파괴된 말이집은 감소하면서 대식세포에 의하여 제거된 말이집의 공간에서 신경집 세포가 증식하기 시작하였으며, 신경바

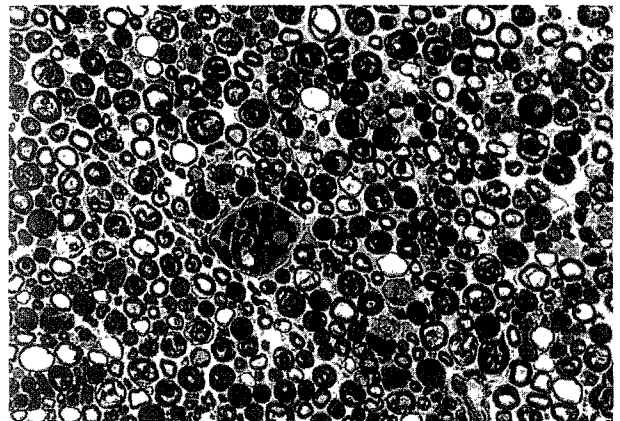


Fig. 3. The myelin sheath degeneration was more advanced and the thrombosis in the vasa nervorum appeared at 12 hours. (400 x).

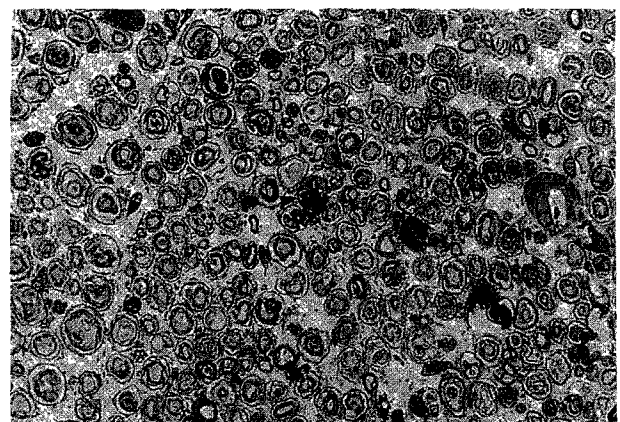


Fig. 4. The intramyelin edema and macrophages in the basal lamina tube (arrowhead) were observed at 3 days. (400 x).

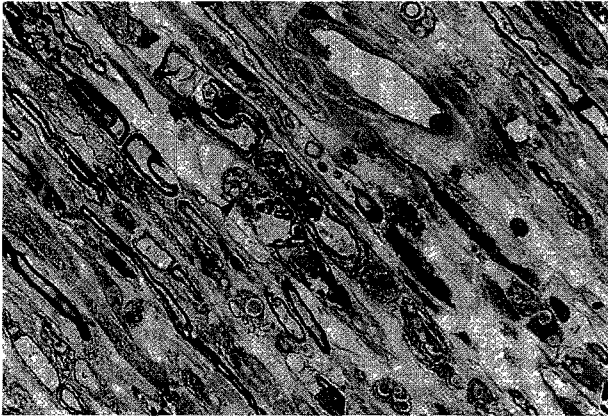


Fig. 5. The macrophages in the basal lamina tube(arrowhead) were observed in the longitudinal section of peripheral nerve at 3 days. (400 x).

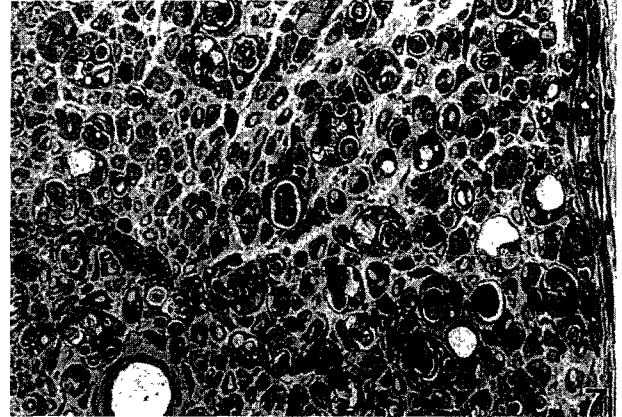


Fig. 7. The myelin sheath generations and Schwann cell proliferations were more advanced at 1 week than 5 days. (400 x).

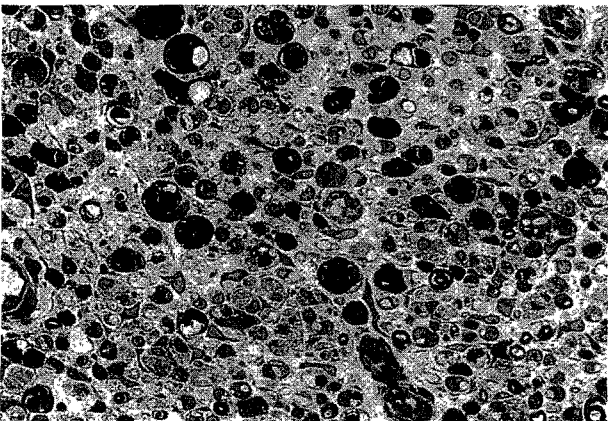


Fig. 6 The proliferation of Schwann cells in the basal lamina tube was observed at 5 days. (400 x).

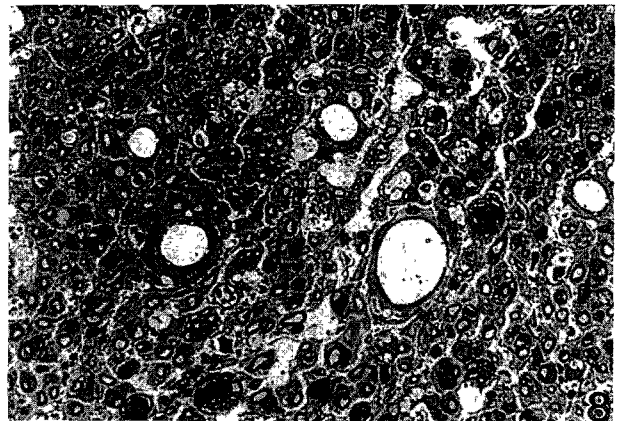


Fig. 8. The thinly myelinated nerve fibers appeared at 2 weeks (400 x).

칼막과 신경다발막의 혈관에서도 혈전증이 관찰되었다(Fig. 6). 1주 후 말미집의 변성과 신경집 세포의 증식이 더욱 더 현저했다(Fig. 7). 2주 후 재생된 축삭 주위에 얇은 말미집이 형성되어 있었으며(Fig. 8), 4주 후 말미집 신경섬유의 직경도 증가하여 있었다(Fig. 9).

재생과정에서 신경집 세포의 반응만을 관찰하기 위해서 신경집 섬유의 표식자로 알려진 S-100 단백질에 대한 항체를 이용하여 면역조직화학법을 실시하였다. 대조군에서 신경섬유의 바깥부분을 반지모양으로 둘러싸는 양상이었지만(Fig. 10), 2주 후 신경집 세포의 증식으로 반응양상이 더 크고 두껍게 관찰되었다(Fig. 11). 후근신경절의 위성세포에서도 S-100 단백질의 반

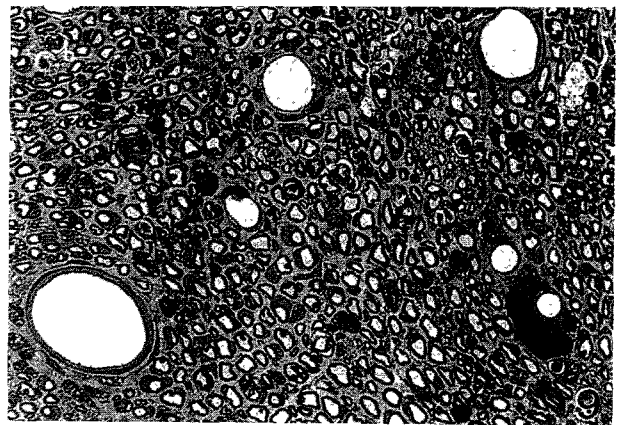


Fig. 9. The number of myelinated nerve fibers and the myelin thickness were increased at 4 weeks. (400 x).

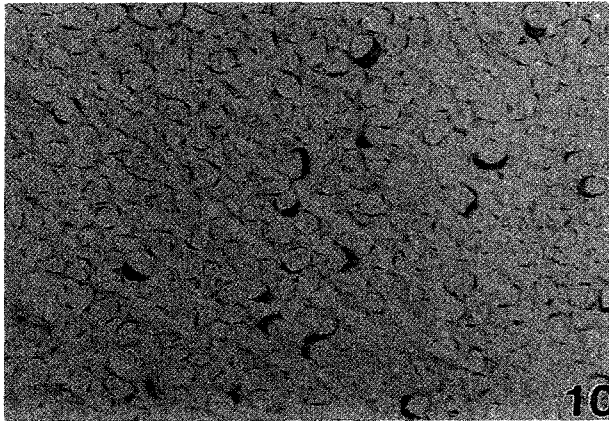


Fig. 10. The S-100 immunoreactive Schwann cells were observed as signet ring shape in the control group. (400 x)

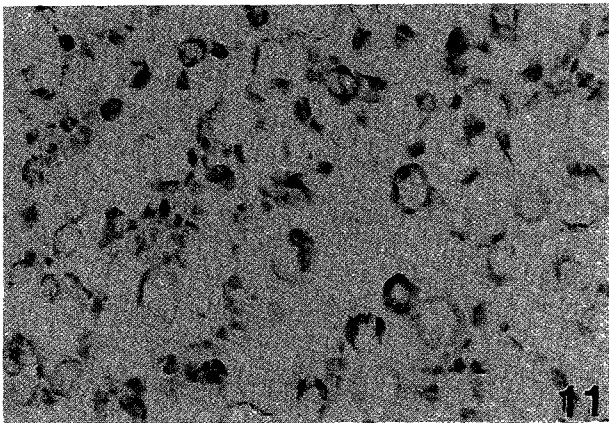


Fig. 11. The S-100 immunoreactive Schwann cells were proliferated at 1 week. (400 x).

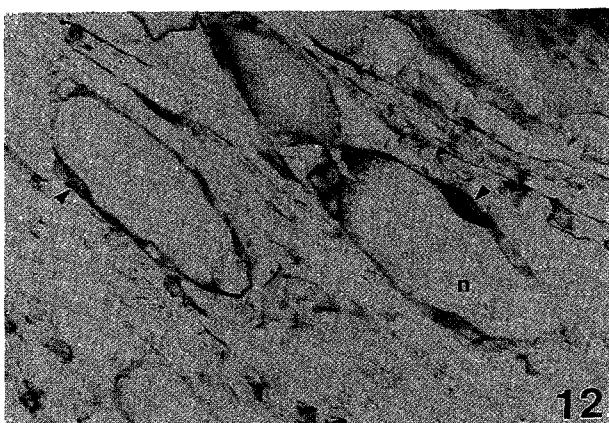


Fig. 12. The S-100 immunoreactive satellite cells(arrowhead) around DRG cells with eccentric nucleus(n) were observed at 1 week. (400 x).

응성의 변화를 관찰하였는데, 좌상 1주군에서 한쪽으로 치우친 핵을 가지는 세포의 위성세포에서 S-100 면역반응성의 증가가 관찰되었다(Fig. 12).

고찰

말초신경의 재생과정을 관찰하기 위하여 엉덩이신경을 드라이아이스로 냉각시킨 동맥류용 클립으로 좌상을 유발시켰다. 그러므로 저온과 좌상에 의하여 축삭과 말이집은 파괴되었지만 기저막은 손상을 받지 않아 재생과정을 확인할 수 있었다. 저온으로 인한 말초신경의 손상은 신경내막의 부종을 야기하는 것으로 알려져 있다.⁴⁾ 이러한 부종은 신경내막에 림프관이 존재하지 않으며⁵⁾, 결합조직의 mast cell에서 분비된 히스타민과 세로토닌과 같은 생체내 아민⁶⁾에 의해서 야기된 신경내혈관의 비정상적인 투과성과 내피세포의 폐쇄연접의 파괴⁷⁾가 원인으로 생각된다. 말이집 내의 부종은 랭비어 마디가 세포의 공간과 직접 접하고 있으므로 이곳을 통하여 액체가 유입된 것으로 추측된다. 신경내막의 부종으로 신경에 분포하는 혈액의 흐름을 저해하여 신경다발막을 통과하는 미세혈관을 수축시킬 것으로 생각된다.^{8,9,10)} 부종상태의 말초신경은 신경내막에서 모세혈관 사이의 거리가 넓어져 있으므로,¹¹⁾ 허혈성 손상을 받기 쉬운 것으로 알려져 있다.¹²⁾

재생하는 축삭은 손상부위에서 가장 인접한 랭비어 마디에서 기시하여 원위부의 신경집 세포 기둥으로 들어가 표적장기까지 도달한다.¹³⁾ 대식세포에 의하여 파괴된 말이집이 제거되면 그 공간에 신경집 세포 기둥이 형성되며 이곳을 통하여 재생되는 축삭이 통과하게 된다. 만약 재생되는 축삭이 이 기둥의 바깥으로 성장하여 결합조직내로 들어가면 곧 성장을 멈추어 재생이 이루어지지 않게 된다. 재생하는 축삭은 신경집 세포의 표면이나 기저막의 내측면을 따라서 뺏어나간다. 이러한 형태학적 특징은 신경집 세포와 기저막이 재생하는 축삭의 지지대로 작용하는 것이다. 기저막은 특수화된 세포의 기질로 상피세포와 신경세포에서 결합조직과의 사이에 위치한다.

정상적인 성체의 말이집과 민말이집 신경섬유의 신경집 세포는 휴지기의 세포이지만, 축삭절단 후에는 절단 원위부에서 축삭의 괴사와 더불어 광범위한 변화를 보인다. 본 실험에서도 신경집 세포의 증식이 손상을

후 5일부터 시작하여 2주경에는 재생하는 축삭 주위에 얇은 말이집을 형성하는 것을 관찰하였다. 신경집 세포 내에서 동글동글하게 부서진 말이집 조각은 기저막을 통과하여 들어온 대식세포로 전달되어 포식된다.¹⁴⁾ 신경집 세포의 증식은 그 특이 항원인 S-100 단백질의 양적인 증가로도 증명하였다. 또한 정상 후근 신경절 세포 주위의 위성세포에서는 S-100 면역반응성이 관찰되지 않지만, 손상으로 인하여 위성세포에서 S-100이 발현되는 사실을 밝혔다. 최근에 위성세포에서 기저막 성분중의 하나인 laminin mRNA가 증명되어¹⁵⁾ 이들과 S-100 단백질과의 관계는 앞으로 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론

성체 흰쥐의 엉덩이신경을 대퇴 중간지점에서 좌상을 주고 손상부위 말초신경의 퇴행과 재생과정의 변화를 6시간에서 4주에 걸쳐서 시간적 추이에 따라 준초박절편과 동결절편을 이용하여 연구하였다.

6시간에서 말이집의 변성과 신경내막의 부종을 관찰하였다. 3일에서는 기저막관대로 대식세포가 침투하여 파괴된 축삭과 말이집을 포식하고 있었으며, 5일에서는 기저막관대에서 신경집 세포의 증식이 관찰되었다. 2주에서는 재생된 축삭 주위에 얇은 말이집이 형성되어있었으며, 4주에서는 말이집 신경섬유의 직경과 숫적인 증가를 관찰하였다.

신경집 세포의 표식자인 S-100 단백질에 대한 항체를 이용한 면역조직화학법에서 좌상 2주군에서 신경집 세포의 증식과 좌상 1주의 후근신경절 세포 주위의 위성세포에서 면역반응성을 관찰하였다.

참고문헌

1. Ross MH, Reith EJ : Histology. Williams & Wilkins. Baltimore, 3rd ed., pp.256-300, 1995

2. Waller A : Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. Philos Trans R Soc London (Biol) 140:423-429, 1850
3. Guenard V, Dinarello CA, Weston PJ, Aebischer P : Peripheral nerve regeneration is impeded by interleukin-1 receptor antagonist released from polymeric guidance channel. J Neurosci Res 29:396-400, 1991
4. Basbaum CB : Induced hypothermia in peripheral nerve : electron microscopic and electrophysiological observations. J Neurocytol 2:171-187, 1973
5. Sunderland S : The connective tissues of peripheral nerves. Brain 88:841-854, 1965
6. Olsson Y : Mast cells in the nervous system. Int Rev Cytol 24:27-70, 1968
7. Nukada H, Polloc M, Allpress S : Experimental cold injury to peripheral nerve. Brain 104:779-811, 1981
8. Beggs J, Peter C, Johnson, M.A., Olafsen A, M.S., Watkins J, Cleary C. : Transperineurial arterioles in human sural nerve. J Neuropathol Exp Neurol 50:704-718, 1991
9. Kalichman MW and Meters RR : Transperineurial vessel constriction in an edematous neuropathy. J Neuropathol Exp Neuro 50:408-418, 1991
10. Meyers RR, Heckman HM, Galbraith, Powell HC : Subperineurial demyelination associated with reduced blood flow and oxygen tension after epineurial vascular stippling. Lab Invest 65:41-50, 1991
11. Low PA, Nukada H, Schmelzer JD, tuck RR, Dyck PJ : Endoneurial oxygen tension and radial topography in nerve edema. Brain Res 341:147-154, 1985
12. Meyers RR, Murakami H, Powell HC : Reduced nerve blood flow in edematous neuropathies: a biomechanical mechanism. Microvasc Res 32:145-151, 1986
13. Ann ES, Mizoguchi A, Okajima S, Ide C : Motor axon terminal regeneration studied by protein gene product 9.5 immunohistochemistry on the rat. Arch Histol Cytol 57:317-330, 1994
14. Williams PL and Hall SM : Chronic Wallerian degeneration. An in vivo and ultrastructural study. J Anat 109:487-503, 1971
15. LeBeau JM, Liuzzi FJ, Depto AS, Vlnik AI : Differential laminin gene expression in dorsal root ganglion neurons and nonneuronal cells. Exp Neurol 127:1-8, 1994