

인회석 박막 피복 도관과 Brain-derived neurotrophic factor 유전자 이입
슈반세포를 이용한 백서 좌골신경 재생에 관한 연구
(Sciatic nerve regeneration using calcium phosphate coated conduit and Brain-derived
neurotrophic factor gene-transfected Schwann cell in rat)

최원재¹, 안강민¹, 황순정¹, 정필훈¹, 김명진¹, 김남열², 장정원², 김현만³, 김종수⁴, 김윤희⁵, 김성민⁶, 오승재⁷,
김성준⁷, 이종호¹

¹서울대학교치과대학구강악안면외과학교실,

²연세대학교의과대학약리학교실,

³서울대학교치과대학조직학교실

⁴서울대학교치과대학생리학교실

⁵경희대학교문리대학생물학과,

⁶강릉대학교치과대학구강악안면외과학교실

⁷서울대학교전기컴퓨터공학부

* 본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호:
02-PJ1-PG1-CH07-0001)

Abstract

Sciatic nerve regeneration using calcium phosphate coated conduit and Brain-derived neurotrophic factor gene-transfected Schwann cell in rat

Won-Jae Choi¹, Kang-Min Ahn¹, Soon-Jeong Hwang¹, Pill-Hoon Choung¹, Myung-Jin Kim¹, Nam-Yeol Kim², Jeong Won Jahng², Hyun-Man Kim³, Joong-Soo Kim⁴, Yun-Hee Kim⁵, Soung-Min Kim⁶, Seung-Jae Oh⁷, Sung-Jun Kim⁷, Jong-Ho Lee¹

¹Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Seoul National University

²Department of Pharmacology, Yonsei Medical School

³Department of Oral anatomy, College of Dentistry, Seoul National University

⁴Department of Oral Physiology, College of Dentistry, Seoul National University

⁵Department of Biology, Kyung-Hee University

⁶Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Kangnung National University

⁷School of Electrical Engineering and Computer Science, Seoul National University

Purpose of Study: Peripheral nerve damage due to cancer surgery or surgical trauma results in detrimental effects. Peripheral nerve regeneration depends on neurotrophism of distal nerve stump, recovery potential of neuron, supporting cell like Schwann cell and neurotrophic factors such as BDNF. Peripheral nerve regeneration can be enhanced by the conduit which connects the both sides of transected nerve. The conduit maintains the effects of neurotrophism and BDNF produced by Schwann cells which can be made by gene therapy. In this study, we tried to enhance the peripheral nerve regeneration by using calcium phosphate coated Millipore conduit and BDNF-Ad infected Schwann cells in sciatic nerve of rats.

Materials and Methods: Microporous filter which permits the tissue fluid essential for nerve regeneration and does not permit infiltration of fibroblasts, was made in 2mm diameter and 17mm length. To improve the Schwann cell adhesion and survival, the Millipore filter was coated with calcium phosphate. The coated filter was evaluated by SEM examination and MTT assay.

For effective allogenic Schwann cell culture, dorsal root ganglia of 1-day old rat were extracted and treated with enzyme and antimetabolic Ara-C.

Human BDNF cDNA was obtained from cDNA library and amplified using PCR. BDNF gene was inserted into adenovirus shuttle vector pAACCMVpARS in which E1 was deleted. We infected the BDNF-Ad into 293 human mammary kidney cell-line and obtained the virus plaque 2 days later. RT-PCR was performed to evaluate the secretion of BDNF in infected Schwann cells. To determine the most optimal m.o.i of BDNF-Ad, we infected the Schwann cells with LacZ adenovirus in 1, 20, 50, 75, 100, 250 m.o.i for 2 hours and stained with β -galactosidase.

Rats(n=24) weighing 300g were used for peripheral nerve regeneration experiment. Total 14mm nerve defect was made and connected with calcium phosphate coated conduits. Schwann cells(1×10^6) and BDNF-Ad infected Schwann cells(1×10^6) were inserted in conduit and media(MEM) was injected in control group. 12 weeks after surgery, we evaluated the state of

nerve regeneration by gait analysis, electrophysiologic measurements and histomorphometric analysis.

Results:

1. Microporous Millipore filter was effective conduit which permitted the adhesion of Schwann cells and inhibited the adhesion of fibroblast. We could enhance the Schwann cell adhesion and survival by coating Millipore filter with calcium phosphate.
2. Schwann cell culture technique using repeated treatment of Ara-C and GDNF was established. The mean number of Schwann cells obtained 1 and 2 weeks after the culture were $1.54 \pm 4.0 \times 10^6$ and $9.66 \pm 9.6 \times 10^6$.
3. The mRNA of BDNF in BDNF-Ad infected Schwann cells was detected using RT-PCR. In Schwann cell 0.69 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of DNA was detected and in BDNF-Adenovirus transfected Schwann cell 0.795 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of DNA was detected. The most effective infection concentration was determined by LacZ Adenovirus and 75 m.o.i was found the most optimal.

Conclusion: BDNF-Ad transfected Schwann cells successfully regenerated the 14mm nerve gap which was connected with calcium phosphate coated Millipore filter. The BDNF-Ad group showed better results compared with Schwann cells only group and control group in aspect to sciatic function index, electrophysiologic measurements and histomorphometric analysis.

Key words: Peripheral nerve regeneration, Calcium phosphate coating, Nerve conduit, Schwann cell, BDNF(Brain-derived Neurotrophic factor), Adenovirus

I. 서론

구강악안면외과 분야에서는 외상, 악성종양 및 악골의 결손 등에 동반하는 지각신경이나 운동신경의 광범위한 결손을 종종 접할 수 있는데, 이러한 경우 대이개 신경이나 비복신경을 채취하여 자가 이식하는 방법을 많이 사용해왔다. 자가 신경이식은 그 성공률이 80%로 보고되고 있지만, 신경 손상의 정도나 손상 기간, 환자의 나이 등 여러 가지 변수에 따라, 수술하기 전의 상태로 완전히 회복되지 않는 경우 역시 많은 것으로 보고되고 있다¹⁾. 이럴 경우 자가 신경이식보다는 손쉽게 구할 수 있는 인공 재료로 신경 결손을 재건하면 더 큰 이점이 있을 뿐 아니라, 수술 범위를 줄일 수 있다. 이러한 이유로 결손신경 재생법을 개발하기 위한 여러 연구들이 진행되어 왔는데, 최근에는 분자생물학의 도입과 신경과학의 발달에 힘입어, 신경질환 및 신경손상의 치료에 새로운 시대가 열리기 시작하였다. 분자 수준에서 신경세포의 구조와 기능이 해명되고, 신경전달 물질과 신경 영양 인자가 속속 밝혀지면서, 이들을 신경 손상을 포함하는 각종 신경계 질환에 이용하는 조직공학적 접근법이 시도되었다. 그 중 말초신경 재생을 위한 노력으로써 신경 유도관의 개발과 신경 재생을 유도하는 세포의 이용이 활발하게 이루어지고 있다²⁾. 신경 유도관의 경우 비흡수성 또는 흡수성의 여러 가지 재료로 개발되었지만³⁾, 원위신경단과 근위신경단의 간격이 10mm 이상이면 신경 재생이 제대로 일어나기 어렵다는 것이 실험적으로 인정되고 있다⁴⁻⁸⁾. 따라서 신경결손 길이가 큰 실제 임상 상황에서는 통상적인 신경 유도관의 사용만을 사용하여 적용하는 것은 한계가 있다. 이에 신경 손상 후 세포부착물질(cell adhesion molecules)을 분비하고, 라미닌(laminin)과 4형 콜라겐(type IV collagen) 등의 기저막(basement membrane)의 구성성분 및 신경성장인자(nerve growth factor; NGF) 등의 향신경성인자를 분비함으로써 근위단에서 축삭이 재생하는 것을 촉진하는 역할을 수행하는 슈반세포를 이용하여 중추신경 및 말초신경 재생을 유도하는 연구들이 진행되고 있다⁹⁻¹⁵⁾. Bunge¹⁶⁾는 슈반세포를 반투과성 신경 유도관에 넣고 재생을 유도한 동물 실험에서 우수한 재생 효과를 나타내었다고 보고하였다. 또한, Xu 등⁸⁾은 유도관 내에 슈반세포를 넣은 후 관찰한 실험에서 절제된 척수의 재생을 보고하였고, Guenard 등¹⁷⁾은 중추 신경계의 세포 중 신경 재생을 촉진하는 기능을 가진 정상세포도 슈반세포와 같은 역할을 할 수 있으며, 슈반세포와 함께 사용하여 좋은 결과를 얻었다는 보고를 한 바 있다. 이와 같은 연구에서 지지세포를 많이 넣을수록 신경재생이 잘 된다는 것이 파악되었는데, 문제는 인간 슈반세포의 배양이나 그 양을 늘리는 것이 쉽지 않다는 점이다. 이러한 점을 극복하기 위해서 슈반세포를 유전자 조작하여 신경성장인자를 다량 생산하게 하거나 슈반세포가 신경도관에 보다 더 잘 부착되고 증식될 수 있게 하는 방법을 모색할 필요가 있다. 신경결손 시 근위단에서 신경 재생이 이루어지게 되는데, 이는 원위단에서 분비되는 향신경성 인자의 자극 효과에 의존한다. 이와 같이 신경 재생에는 원위신경단의 잠재적 향신경성영향(potential neurotrophic influence)과 근위 신경세포의 재생능이 중요한 역할을 한다. 그러므로 원위신경단과 근위신경단을 도관(conduit)으로 연결하여 신경말단의 표적기관의 향신경성영향을 유지시키고, 유전자를 조작하여 신경성장인자를 다량 분비하게 만든 슈반세포를 관내에 추가하여 근위신경단 뉴론의 생존과 재생을 증진시키면 광범위한 신경결손에서도 신경 재생이 이루어질 수 있을 뿐 아니라 재생 속도와 재생율도 증가할 것이라는 가정을 할 수 있다. 이에 본 연구자는 재생되는 신경축삭이 생존하고 자라기에 적합한 다공성 관을 이용하여 도관을 만들고, 관 내면을 칼슘포스페이트로 피복함으로써 축삭이 자라고 슈반세포의 부착 생존 조건을 향상시킨 신경재생관을 제작한 뒤, 신경재생관 내에 신경성장인자를 다량으로 합성 분비하도록 유전자 조작한 동종 슈반세포를 넣은 후 이를 이식하여 말초신경 재생의 정도를 파악, 새로운 인조신경관 개발의 가능성에 대하여 연구하고자 하였다.

본 연구는 크게 다섯 부분으로 구성되어 있는데, 첫째, 섬유세포 등은 유입되지 않으나 조직액이 적절히 관내로 유입되어 뉴론이나 슈반세포에 영양을 공급할 수 있는 미세공의 비흡수성 재료인 밀리포아 (Millipore®) 필터를 이용해 인간의 하치조신경이나 안면신경 분지의 직경과 유사한 백서 좌골신경의 포관에 적절한 직경과 길이를 갖는 도관을 제작하고, 둘째, 이 도관에 다양한 조건의 칼슘포스페이트 박막을 처리하여 신경재생 및 슈반세포 성장과 부착에 가장 좋은 환경을 찾아낸 후, 셋째, 슈반세포의 배양과 그 양을 늘리는 기법을 찾았으며, 넷째 신경성장인자 중 brain-derived neurotrophic factor(BDNF) 유전자를 슈반세포에 이입시켜 다량의 기능적인 신경 성장인자를 생산 분비 할 수 있도록 하였고, 마지막으로, 이렇게 만들어진 인공신경을 백서의 말초신경 결손 재건 모델에 적용하여 조직학적 및 기능 신경생리학적으로 신경의 회복정도를 비교하였다 (Fig. 1).

II. 연구 배경 및 문헌 고찰

슈반세포와 신경축삭 간의 상호작용에 관한 정확한 기전은 완전히 밝혀지지는 않았으나 슈반세포는 신경축삭의 성장에 필수적인 기질을 제공하고 여러 종류의 생물활성 인자를 분비하는 것으로 알려져 있다. 슈반세포는 라미닌, 콜라겐과 같은 세포외기질을 생산하고, L1, N-catherin, γ 1 integrin 및 N-CAM(cell adhesion molecule) 과 같은 세포부착 단백질을 생산하며¹⁸⁾, NGF, BDNF, ciliary neurotrophic factor(CNTF)와 같은 신경영양인자를 분비한다¹⁹⁾. 슈반세포는 신경능(neural crest)세포에서 기원하여 쥐의 경우 태생 15일에서 17일 사이에 그 전구세포로부터 분화하는 것으로 밝혀졌으며^{20,21)}, 이 시기에 전구세포와 구별되는 S-100 단백질, Krox-20의 발현 등의 형질변환을 하는 것²³⁾으로 보고된 바 있다. 또한 이러한 슈반세포의 분화는 발생할 때부터 신경축삭과의 긴밀한 상호 작용을 통해 이루어지는데, 슈반세포의 전구세포와 슈반세포의 생존과 분화에는 성장 및 분화하는 신경축삭에서 분비되는 β -neuregulin(NRG- β)²⁴⁾이 관여하는 것으로 알려져 있다. 이렇게 분화 및 성숙된 슈반세포는 그 전구세포와 달리 신경축삭의 운명과 관계없이 생존에 필요한 영양인자를 스스로 분비하는 방식 (autocrine survival loop)²²⁾으로 축삭과 독립되어 생존할 수 있다. 이는 신경의 손상 시 슈반세포의 생존 및 증식을 통하여 축삭의 재생이 유도된다는 점에서 매우 중요한 의미를 갖는다. 또한 체외 배양할 경우 슈반세포는 생존에 필요한 여러 자가 분비 영양인자를 충분한 농도로 생산할 수 있는 밀도까지 증식할 수 있다.

말초신경의 유지 및 재생에 관여하는 슈반세포의 체외 배양은 Wood 등²⁵⁾에 의한 척수후근절 외식체(explants)에서 채취한 세포의 배양, 또 Brockes 등²⁶⁾에 의한 좌골신경에서 분리한 세포들의 Thy-1 항체를 이용한 면역선택 배양법(immunoselective method) 이후 인간을 포함한 여러 종의 포유류의 말초신경 및 척수후근절로부터 슈반세포를 분리, 배양 하는 기술과 그 수율을 높이기 위한 시도가 많은 연구자들에 의해 이루어졌다. 특히 Morissey 등²⁷⁾은 말초신경손상 시 발현되는 슈반세포의 내재적인 증식능을 극대화시킴과 동시에 증식속도가 상대적으로 빠른 좌골신경 내의 섬유모세포를 감소시키기 위한 방법으로, 백서 성체에서 채취한 좌골신경 외식체를 콜라겐 피복된 배양접시에 순차적으로 이식하여 섬유모세포를 배양접시에 격리한 다음, 외식체를 최초 채취 후 약 15-20일 후 효소 처리함으로써 성체의 슈반세포도 성공적으로 분리 배양할 수 있음을 보고하였다. 이 방법은 향후 슈반세포의 자가이식²⁸⁾을 염두에 두고 시행한 연구로 이 후 여러 연구자들에 의해 성인의 슈반세포를 배양하는 계기가 되었다^{10,11,29-33)}. 이와 함께 슈반세포의 증식에 관여하는 여러 약제 및 인자에 대한 연구도 활발하게 진행되었다. Brockes 등^{34,35)}은 소의

뇌조직과 뇌하수체에서 GGF(glial growth factor)를 분리 정제하여 발표하였는데, 슈반세포와 정상세포(astrocyte)는 이 인자에 대해 강하게 반응하여 세포 증식이 촉진되지만 다형성수상세포(oligodendrocyte)는 별다른 반응을 보이지 않는 것³⁶⁾으로 보고하였다. 이후의 많은 연구를 통하여 GGF는 neuregulin family의 일원이며, 다른 3종류의 단백질, neu differentiation factor(NDF/NRG-β), heregulin, Acetylcholin-receptor-inducing activity(ARIA) 등^{37,38)}과 함께 같은 유전자가 서로 다르게 접합되어 발현되는 것으로 알려졌다. 또한, GGF는 epidermal growth factor(EGF)의 세포막 외측 영역과 상동관계인 것으로 알려졌으며, ErbB 수용기^{39,40)}들을 통해 슈반세포에 비슷한 영향을 미치는 것으로 보고되었다. 이러한 연구들을 통해 얻은 결과를 토대로 위의 영양인자 및 필수적인 영양인자를 첨가한 무혈청 배지^{30,31)}를 이용한 섬유모세포 증식의 억제 및 슈반세포 배양을 시도한 많은 연구결과들이 보고되고 있다. 그 밖에 forskolin, cholera toxin 등³¹⁾이 슈반세포에 대하여 증식인자로 작용한다고 보고된 바 있으며, Verdu 등⁴¹⁾과 Keilhoff 등⁴²⁾은 슈반세포의 체외배양 시 그 증식능을 극대화하기 위해 체내에서 말초신경에 미리 손상을 주어 변성시키는 방법을 보고하기도 하였다.

신경세포의 재생에 위한 슈반세포를 이용하는 것은 중추신경계 질환의 치료에서 먼저 시작되었는데 Kromer와 Cornbrooks⁴³⁾는 3mm의 간격의 인위적 뇌손상을 준 후 배양된 슈반세포를 이식한 결과 신경세포 축삭(cholinergic axons)의 빠른 재생을 관찰하였다고 보고하였다. 이후 Kuhlengel 등^{44,45)}은 신생 백서의 척수에 인위적으로 형성한 2mm의 결손부에 태생 15일된 백서에서 채취 배양한 척수후근절 신경세포와 슈반세포를 이식한 뒤 관찰한 일련의 논문에서 이식체가 직접적으로 corticospinal tract(CST)의 연결(tissue bridge)을 형성하지는 않았으나, 인접 척수의 실질 조직에 영향을 미쳐 인접 CST fiber가 손상부를 넘어 성장할 수 있도록 도와주는 것으로 나타났다고 보고한 바 있다. Xu 등^{8,46)}은 백서 성체의 척수 결손부에 배양된 슈반 세포를 넣은 반투과성의 신경재생관을 이식한 후 관찰한 실험에서 척수 신경세포의 축삭 일부가 재생되었다고 보고하였다. 말초신경 결손부에서의 슈반세포의 실험적 적용 또한 여러 연구자들에 의해 시도되어 성공적인 결과가 보고된 바 있다. Guenard 등⁹⁾은 반투과성 신경재생관에 다양한 밀도의 자가 및 이종 슈반세포를 넣은 후 이식하고 이를 자가 신경이식과 비교한 연구에서 자가 신경이식보다는 못하였지만 자가 세포의 밀도가 가장 높은 재생관 이식군이 가장 좋은 결과를 보였다고 보고하였다. Levi 등⁴⁷⁾ 역시 영장류를 실험대상으로 기능적, 조직학적 결과를 비교한 결과 비슷한 결과를 얻었다고 보고하였다. 그러나 Rodriguez 등⁴⁸⁾은 생쥐를 대상으로 6mm의 좌골신경 결손부를 재건한 결과 자가 슈반세포이식군이 기능적 조직학적 측면에서 자가신경이식군에 필적할 만한 결과를 얻었다고 보고하였다. 또 Guenard 등¹⁶⁾은 중추신경계의 교세포 중 하나인 정상세포(astrocyte)와 슈반세포를 혼합하여 좌골신경 결손부에 이식했을 경우, 정상세포 단독으로 이식한 경우에서 보이는 신경축삭재생의 저해를 부분적으로 역전시키는 것으로 나타났다고 보고하였다.

최근에는 신경재생에 있어서 세포를 이용하는 보다 적극적인 방법으로, 유전자 조작을 통하여 더욱 많은 신경성장인자를 분비하도록 세포를 변형한 다음 이식하는 방법이 시도되고 있다. Rosenberg 등⁴⁹⁾은 섬유모세포에 retrovirus를 이용해 NGF유전자를 이입하여 NGF를 과량분비하도록 만든 다음, 백서의 뇌손상 부위에 이식한 결과 충분한 NGF를 분비하여 콜린성 신경세포의 변성을 막고, 신경축삭이 이식세포로 향하여 성장하는 것을 관찰하였다고 보고하였다. Tuszynsky 등⁵⁰⁾은 성인 및 영장류의 섬유모세포를 유전자 변형하여 영장류의 뇌에 이식한 결과 6개월간 NGF를 발현하였고, 콜린성 신경세포의 변성을 막았다고 보고함으로써, retrovirus를 통한 섬유모세포 유전자 이입은 세포를 공여하는 숙주의 연령과 관계없이 가능하다고 설명하였다.

Nakahara 등⁵¹⁾은 섬유모세포에서 NGF, BDNF, nerotrophin-3(NT-3) 및 basic fibroblast growth factor(bFGF)를 각각 발현하도록 유전자 이입한 다음 손상되지 않은 백서 성체의 척수에 이식한 뒤 신경세포의 반응을 관찰하였는데, 운동신경의 축삭들은 어떠한 인자에도 반응을 나타내지 않았으며, 척수후근절에서 기원한 축삭들은 NGF, NT-3 및 bFGF를 분비하는 세포에 반응을 나타내었으나 BDNF에는 역시 반응을 나타내지 않았다고 보고하였다. 한편, 슈반세포 및 말초신경에 대한 유전자 이입도 시도 되어, Feltri 등⁵²⁾은 SV-40 promotor를 갖고 있으며 LacZ 유전자가 이입된 retrovirus를 이용하여 체외 배양된 슈반세포를 감염시킨 뒤 백서의 좌골신경 결손부에 이식한 결과, 재생되는 축삭을 따라 형태학적으로 정상인 신경수초가 형성되었고, 이는 슈반세포가 인위적으로 증식된 뒤 유전자 변형을 거치더라도 재생하는 신경축삭의 신호에 정상적으로 반응할 수 있음을 보여준다고 보고하였다. Tuszynsky 등⁵³⁾은 retrovirus를 이용해 체외 배양된 슈반세포에 NGF 유전자를 이입시킨 뒤 손상되지 않은 백서의 척수에 이식하여 이식된 슈반세포의 생존과 신경축삭의 성장 및 수초의 형성 등을 관찰하였다. 이 연구에서 이식된 슈반세포는 최장 1년간 생존하였고, 최소 6개월간 NGF 유전자 발현을 하였으며, 감각신경의 축삭들이 이식체 주위로 밀집되어 성장하였으며, 수초형성 역시 정상적으로 이루어졌고, 실험동물의 운동기능 역시 정상적이었다고 보고하였다. Weidner 등⁵⁴⁾ 역시 백서 척수 손상부에 유전자 이입 슈반세포를 이식한 결과 정상 슈반세포에서 발현되는 L1 단백질의 발현 등 특별한 형질 변화 없이 위의 실험결과와 비슷한 결과를 나타냄으로써 말초신경의 지지세포인 슈반세포가 유전자 조작되어 중추신경계의 손상에 이용될 수 있다고 보고하였다. 그러나 위의 연구들은 중추신경계 질환에 초점을 맞추어 지속적인 유전자의 발현을 위하여 retrovirus를 이용하였는데, retrovirus는 숙주의 염색체에 무작위로 삽입되기 때문에 숙주의 유전자가 영구적으로 변형될 수 있고, 정확한 유전자의 발현을 조절할 수 없으며, 유전자의 전달 부위가 분열 중인 세포(dividing cell)를 가진 조직으로 한정되고, 유전자치료에서 요구되는 높은 역가(high titer)로 생산하기 어렵다는 단점이 있어 adenovirus를 이용한 유전자 이입이 연구되기 시작하였다. Shy 등⁵⁵⁾은 CMV promotor의 조절 하에 LacZ 유전자를 발현하는 adenovirus를 체외 배양된 슈반세포 및 백서의 좌골신경에 감염시킨 결과 adenovirus를 통한 슈반세포에의 유전자 이입이 가능하였고, 체외 배양된 슈반세포에서는 최장 2주간, 좌골신경에서는 45일간, LacZ 유전자가 발현되었다고 보고하였다. Sorensen 등⁵⁶⁾은 백서의 좌골신경에 손상을 가한 뒤, LacZ adenovirus를 감염시킨 결과 최장 68일까지 이입된 유전자가 발현되었고, 이 vector 자체가 신경축삭의 재생을 방해하지는 않았다고 보고하였다. 특기할 만한 사실은 cyclosporin A의 주입을 통한 면역억제를 할 경우 슈반세포의 증식은 감소하였으나, LacZ 유전자를 발현하는 슈반세포의 수와 비율은 면역억제를 하지 않은 경우보다 더 높았다고 보고한 것이다. 또, Joung 등⁵⁷⁾은 HiB5 세포주를 이용한 실험에서 adenovirus가 왕성하게 증식하는 신경간세포(neuronal stem cell) 뿐만 아니라, 완전히 분화되어 더 이상 증식하지 않는 세포도 효과적으로 감염시킬 수 있다고 보고하였다. Blits 등⁵⁸⁾은 NT-3 유전자가 삽입된 adenovirus를 늑간신경(intercostal nerve)에 감염시킨 뒤 인위적으로 만든 백서 척수 결손부에 이식한 결과, CST의 신경섬유들이 직접 이식체를 관통하여 성장하지는 않았으나, 대조군에 비해 축삭의 재생이 촉진되었고, 뒷다리의 운동기능 역시 향상 되었다고 보고하였다. 이상에서 살펴본 바와 같이 유전자 변형 세포를 이용한 신경의 재생에 대하여 많은 연구들이 진행되고 있다. 그러나 대부분의 연구들이 중추신경계 질환의 치료를 목적으로 하고 있어 말초 신경 재생을 위한 최적의 조건(신경성장인자의 선택, 유전자 이입 방법 및 그 효율)에 대한 연구는 아직 부족한 실태이다.

III. 연구 재료 및 방법

1. 밀리포아(Millipore®) 필터를 이용한 신경 재생관의 제작

섬유세포는 침투하지 않으나 조직액이 적절히 관내로 유입되어 신경세포나 슈반세포에 영양을 공급할 수 있는 미세공성의 cellulose acetate 밀리포아 필터(Millipore, USA, pore size 0.45 μ m)를 교정용 철사(0.016 inches)를 이용하여, 평균 직경 1.28 mm인 백서 좌골신경과의 미세 접합이 가능하도록 내경이 2 mm가 되는 도관을 형성하였으며, 이음매는 가능한 세공이 많이 막히지 않게 풀(MF cement, Millipore, USA)로 접착하였다.

2. 인회석 박막 피복 및 세포부착도 검사

제작된 도관에 슈반세포의 부착과 생존을 증진시키기 위해 김 등^{59,60}의 방법대로 인회석 박막 피복을 시행하였다. 과포화상태로 안정화된 칼슘 이온 용액과 포스페이트 이온 용액을 낮은 온도에서 혼합하여 칼슘-포스페이트 인회석 결정체를 합성한 후 여과하였다. 여과된 인회석 결정체를 말린 후 0.2 N HCl (1 mg/ml) 에 녹였다. 준안정(metastable)의 칼슘과 포스페이트 이온 용액을 얻기 위해, 이 산성 이온 용액 1ml를 0.2 M의 수산화메틸아미노메탄 용액 1.35 ml와 섞어 4 $^{\circ}$ C에서 칼슘-포스페이트 침전물을 만든 다음, 침전물은 밀리포아 필터(pore size: 0.22 μ m)로 여과하여 준안정의 이온 용액(pH 7.3)을 얻었다. 밀리포아 필터 표면 위에 칼슘-포스페이트의 핵형성을 유도하기 위하여 8 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 준안정의 칼슘-포스페이트 용액에 피복시킬 신경재생관을 담가 두었다. 이후 인회석 결정들의 성장에 의한 저결정 수산화인회석(low-crystalline calcium phosphate apatites; LCAs)의 박막 피복을 형성하기 위해 온도(60 $^{\circ}$ C 까지)를 증가시켜 피복처리를 하였다. 박막 피복 정도를 확인하기 위해 피복된 도관을 종축으로 이등분하고 내강을 잘 편 후 isoamyl acetate에 담갔다가 이산화탄소를 사용한 임계점 건조기로 건조시키고 금을 증착하여 주사전자현미경 (JSM-6000 series, WDS/ EDS system, Japan)으로 관찰하였다.

세포활성도 및 부착도 검사를 위하여 96-well plate(Falcon, USA)의 각 well에 꼭 맞는 크기로 밀리포아 필터와 인회석 박막을 피복한 밀리포아 필터를 적합 시킨 다음 NIH 3T3 세포주와 척수 후근절에서 분리 배양한 슈반세포를 각 well당 1.0×10^4 개씩 분주한 후 48시간 동안 배양하고 세포 활성도를 위해 MTT assay를, 그리고 세포 부착도를 파악하기 위해 주사전자현미경으로 관찰하였다. 대조군으로는 아무런 처리를 하지 않은 96-well plate로 상정하였다. MTT assay를 위해 배양액 500 μ l 당 20 μ l의 MTT reagent (ATCC catalog # 30-1010k, USA)를 넣고 보라색 침전이 보일 때까지 4시간 동안 배양하였다. 그리고 배양액을 따라내고 200 μ l의 isopropanol을 넣고 5-6분간 orbital shaker에 넣고 다시 약 2시간 동안 실온의 암소에 두었다가 570nm 파장으로 흡광도를 읽었다. 주사전자현미경 관찰을 위해 half Karnovsky solution에 2시간 동안 전고정하고, 이후 2% osmic acid에 1시간 후고정한 다음 에탄올의 농도를 상승시켜가며 탈수시켰다. 이 후 isoamyl acetate에 담갔다가 이산화탄소를 사용한 임계점 건조기로 건조시키고 금을 증착하여 주사전자현미경 (JSM-6000 series, WDS/ EDS system, Japan)으로 200배의 배율로 무작위로 3부위를 관찰하여 600 \times 500 μ m 부위에 부착되어 있는 세포수를 산출하였다.

3. 슈만세포의 분리 및 배양

1) 척수후근절 채취

1일령의 백서(Sprague Dawley, 샘타코)를 얼음에 묻어서 마취시킨 후, 70% 냉각 에탄올과 CMF-HBSS(Gibco, USA) 용액에 각각 담가 소독하였다. 등의 피부를 종질개하여 척추를 노출시키고, 척추를 다시 종질개한 다음 척수와 연조직을 제거하고 후근절을 가능하면 많이 채취하였다. 채취한 후 조직은 바로 차가운 CMF-HBSS 용액이나 PBS(Gibco, USA) 용액에 담아서 보관하였다(Fig. 2). 모든 채취는 미세삽자 및 미세가위를 사용하였으며 해부현미경(Olympus SZ-40, Japan) 하에서 시행하였다. 전체 채취 시간은 2시간 이내로 세포분리까지 모두 4시간 이내에 시행하였는데, 대략 10마리에서 척수후근절 채취가 끝나면 작은 칼을 이용하여 채취한 조직을 잘게 잘랐다.

2) 효소처리와 일차배양

잘게 자른 후근절을 15ml 시험관에 넣고 원심분리하여 CMF-HBSS 용액을 천천히 제거하였다. 0.25% collagenase(collagenase type I, Worthington, USA) 1ml와 부가적으로 0.2% DNase(Gibco, USA) 0.1ml를 넣은 후, 37℃에서 70분간 배양하였다. 배양 후 800rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 0.125% trypsin-EDTA(Gibco, USA) 용액 2ml를 넣은 후 다시 5 내지 10분간 37℃에서 처리하였다. 처리 후 혈청을 함유한 배양액 5ml를 첨가하여 충분히 피펫팅한 후, 800rpm 5분간 원심분리해서 상층액을 제거하고, 다시 10ml 정도 배양액을 첨가하여 세포들을 부유시키고 cell strainer(Falcon, USA)를 이용하여 이물질을 제거한 세포와 배양액을 얻었다. 여과된 표본을 1,000rpm, 4℃에서 5분간 원심분리하였는데, 상태에 따라 추가적으로 1,200rpm에서 2분정도 원심분리하였다. 상층액을 조심스럽게 제거한 뒤 배양액 6ml를 첨가하여 배양용기에 옮기고, 여러 방향으로 흔들어 세포를 넓게 퍼뜨렸다.

3) 분열억제제 및 성장인자 처리

일차배양 20시간이 지난 후, cytosine arabinoside(Cytosine-D-Arabino-Furanoside, Ara-C, Sigma, USA)가 5 μ M의 농도로 첨가된 배양액으로 교환하고, 48시간 후에 glial cell line-derived neurotrophic factor(GDNF, Sigma, USA) 0.2 μ g/ml와 Ara-C가 첨가된 배양액으로 교환하였다. 일차배양에서 슈만세포의 성장이 육안으로 확인될 정도로 잘 성장하였을 경우에는 GDNF 처리를 생략하였다. 이후 배양 중에 섬유모세포의 비율이 높아질 경우 Ara-C가 첨가된 배양액으로 2회 정도 교환해 주었다.

4) 면역세포검사 및 세포수 산정

통상적인 헤마톡실린-에오신(H&E) 염색을 시행하였으며, 산성단백질로 발생학적으로 신경외배엽(neuroectoderm)에서 유래한 조직에 분포하는 S-100 단백질에 대한 항체(polyclonal, rabbit, 1:100;Dako, Denmark)를 사용하여 면역세포형광염색을 시행하였다. 간단히 살펴보면 슈만세포를 커버슬립 위에서 24시간 동안 배양 후 pH 7.4의 PBS로 3회 수세한 뒤, 4% paraformaldehyde로 30분간 고정하였다. 다시 PBS로 수세한 뒤 0.2% Triton-X100(in PBS) 용액으로 30분간 처리한 후, 정상 산양 혈청(normal goat serum)으로 비특이적 환경을 없애준 다음, 1차 항체로 45분간 실

온에서 rabbit polyclonal S-100 항체와 반응시켰다. 마지막으로, PBS로 수세 후 2차 항체(Goat anti rabbit Ig-G-Cy3, Jackson Immunoresearch, USA)를 30분간 차광 하에 실온에서 반응시켰다. 배양이 끝난 주 단위로 배양용기 내에서 바로 역광현미경으로 관찰하여 세포수를 계산하였으며, 면역세포검사를 시행한 후에는 필요한 경우 조직 절편을 만들어서 계산하였다. 혈구계산판을 이용하여 동일한 연구자가 최소 5회 이상 계산하여 평균치를 구하였다. 계산한 세포수에 10,000배를 해서 1 ml 안의 세포수를 계산하였다(Student's *t*-test, Mann-Whitney U-test, *p*-value < 0.05).

4. Adenoviral vector를 이용한 BDNF cDNA의 슈반세포로의 이입*

1) 재조합 BDNF-Adenovirus(BDNF-Ad)의 생산

BDNF-Ad shuttle vector와 전체 adenovirus 5의 genome을 가지고 있는 pJM17 plasmid를 293 cell에 co-transfection하여 adenovirus genome sequence간에 homologous recombination이 일어난 replication-incompetent BDNF-Ad를 single plaque로 분리하여 wild-type adenovirus를 제거하였다. 최종 분리한 재조합 virus를 다량의 293 packaging cell-line에 감염시키고, 이틀 후 세포에 독성을 나타낼 때 세포를 채취하여 -80 °C에서 냉동과 해동을 5회 반복하고, 각 단계마다 vortex로 과격히 흔들어주어 virus 혼탁액을 얻었다. 이렇게 얻어진 recombinant adenovirus(Fig. 3)가 E1이 제거된 위치에 BDNF 유전자를 함유하고, 세포를 감염시켜 BDNF의 발현을 증가시키는지 확인하기 위해 1차 배양된 슈반세포에 감염시키고 RT-PCR로 조사하였다.

먼저 BDNF 유전자의 발현 확인을 위한 RT-PCR 방법을 간단히 기술하면, TRISOL LS Reagent(Invitrogen, USA)를 이용하여 배양된 슈반세포와 BDNF-Adenovirus에 50 m.o.i로 감염된 슈반세포에서 RNA를 추출한 다음, UV/Visible spectrophotometer(UltroSpec 3000, Pharmacia Biotech, USA)를 사용하여 RNA 농도를 결정하였다. RQ1 RNase-Free DNase kit(Promega, USA)를 이용하여 RNA 샘플로부터 DNA를 제거한 후, 역전사효소(SuperScriptII RT, Invitrogen, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이후 BDNF cDNA를 복제하기 위해 제작된 Primer(Forward : 5'-AGCCTCCTCTACTCTTTCTG-3', Reverse : 5'-TCCACTATCTTCCCCTTTTA-3')와 1 μ l의 first-strand cDNA 반응액(0.25 μ g)을 사용해 PCR을 수행하였다. Taq DNA polymerase(Labopass, Korea), 각 primer 1pmole, 2.5mM dNTP 3 μ l, cDNA 1 μ l, 반응 buffer를 첨가해 최종부피가 30 μ l가 되도록 하였다. PCR기기(Techgene, Techne, England)를 사용해 denaturation을 위하여 94 °C에서 2분간 실시하였다. denaturation, annealing, extension의 조건으로 각각 94 °C/1분, 56 °C/30초, 72 °C/1분30초의 cycle을 32회 실시하였다. 72 °C에서 5분간 한 번 더 extension하였다. 1.2% agarose gel에서 전기 영동하여 PCR band를 관찰하였다.

2) LacZ Adenovirus의 생산 및 슈반세포 내로의 이입

BDNF-Ad의 슈반세포 이입 전에 가장 효과적인 multiplicity of infection(m.o.i.)을 결정하기 위해 LacZ adenovirus를 이입하였다. E1이 결실된 shuttle vector pACCMV.pLpA(8.8 kb)에 LacZ gene을 복제하고 pJM17(40.3kb) adenoviral plasmid와 재조합하여 얻은 replication-incompetent 재조합 LacZ adenovirus를 293 packaging cell-line에 접종해서 증폭하여 virus-media 혼탁액을 얻었다. 배양한 슈반세포를 24-well plate에 5×10^4 cell을 분주한 뒤 3일간 배양한 뒤, 약 80%의 confluence에 다다르게 하였다. 5×10^9 pfu/ml의 virus stock을 serum free media에 희석하여 각각의 well에 1, 10, 50, 75, 100, 250, m.o.i. 가 되게 2시간 동안 LacZ adenovirus를 감염시켰다. 감염 3일 후 각각의 세포에서 LacZ의 발현정도 및 독성도를 알기 위해 β -gal 염색을 시행하였다.

*: 본 연구에서 사용한 BDNF-Adenovirus와 LacZ-Adenovirus는 경희대학교 이과대학 생물학과 신경발생학 실험실(교수: 김윤희)에서 제작하였음

5. 동물 실험 및 평가

: 인회석 박막 피복 도관과 BDNF 유전자 이입 슈만세포를 이용한 말초신경 재생

유전자 조작 슈만세포와 인회석 박막 피복 도관을 이용한 말초신경 결손부 재건 시 신경재생효과 파악을 위한 본 연구의 최종 연구목표를 위해 앞서 제작한 한 신경재생관과 BDNF-Ad를 이입한 슈만세포를 생후 8주된 300g 내외의 백서(Sprague Dawley, 샘타코; 최소 실험 7일 전부터 12시간 주기로 자유롭게 물과 먹이를 주면서 서울대학교 치과대학의 동물실험 지침에 따라 사육과 실험을 진행하였음.)에 이식하였다. (실험 I군, n=8, BDNF-Sch군) 그리고 BDNF-Ad를 이입시키지 않은 슈만세포와 인회석 박막 피복 도관 이용군(n=8, Sch군)을 실험 II군으로, 인회석 박막 피복도관에 단지 media만 넣은 것(MEM 군)을 대조군으로 삼았다. 2주간 증식시킨 슈만세포에 75 moi의 BDNF-Ad를 넣은 후 2시간이 지난 뒤 세포수가 1×10^6 개/ $40 \mu\text{l}$ 가 되게 농축하였다. 염산케타민(Ketara[®], 50mg/ml, 유한양행, 한국)과 림폰(Rompun[®], 5mg/ml, 한국 바이엘, 한국) 각테일(3:1 혼합액)로 마취 후 약 4 cm 길이의 좌골 신경을 노출시킨 다음 10mm의 좌골 신경 결손을 형성하고 17mm 길이의 인회석 박막 피복 신경재생관을 신경 절단부에 대고 신경 결손 간격이 14mm가 되게 양쪽 신경단이 관내로 1.5 mm씩 들어가게 10-0 나일론(Ethicon, GB)으로 미세봉합을 시행하였으며, fibrin sealant(Greenplast[®], 녹십자)로 신경과 신경재생관의 원위 연결부를 먼저 밀봉하고 Hamilton syringe를 이용하여 신경재생관 내에 BDNF-Ad에 감염된 슈만세포, 감염되지 않은 슈만세포 및 MEM 만을 각각 $40 \mu\text{l}$ 씩 주입하였으며 술 후 면역억제를 위해 cyclosporine A(Sandoz, Swiss)를 올리브유에 섞어 20mg/kg/day로 위장관 투여하였다(Table 1).

Table 1. Animal grouping for rat sciatic nerve regeneration

Experimental Group	Nerve repair Modality
I(n=8)	BDNF-Sch
II(n=8)	Sch
Control(n=8)	MEM

BDNF-Sch: The groups grafted with Ca-P coated Millipore conduit that filled with BDNF-Schwann cells.

Sch: The groups grafted with Ca-P coated Millipore conduit that filled with Schwann cells.

MEM: The groups grafted with Ca-P coated Millipore conduit that filled with media(MEM) only.

1) 좌골신경 기능지수(Sciatic Function Index ; SFI)

술 후 12주째에 좌골신경의 손상 정도를 파악하기 위하여 Bain-Mackinnon-Hunter(BMH) sciatic function index⁶¹⁾를 조사하였다. 우선 백서의 뒷다리 족저에 잉크를 바른 뒤 암실로 이루어진 직선의 주행로(8×50cm)를 여러 차례 지나가게 하여 족적을 검사하였다. 검사항목은 PL(print length), TS(toe spread), IT(intermediary toe spread)이며 각각 PLF(PL Factor), TSF(TS Factor), ITF(IT Factor)를 다음의 공식에 대입하여 수치를 구하였다. 정상은 0이며 -100의 수치는 좌골신경이 완전 절단된 상태로 판단하였다(Fig 4).

$$SFI = -38.3(EPL - NPL/NPL) + 109.5(ETS - NTS/NTS) + 13.3(EIT - NIT/NIT) - 8.8$$

EPL; experimental paw length

NPL; unoperated normal paw length

ETS; distance between the first and fifth toes of operated experimental foot

NTS; distance between the first and fifth toes of unoperated experimental foot

EIT; distance between the second and forth toes of operated experimental foot

NIT; distance between the second and forth toes of unoperated experimental foot

2) 전기생리학적 검사

술 후 12주 짜 염산케타민 (Ketara[®], 50mg/ml, 유한양행, 한국)과 롬퐀(Rompun[®], 5mg/ml, 한국 바이엘, 한국) 각테일(3:1 혼합액)을 복강내 주사하여(0.15ml/100g 체중) 마취시키고 좌골신경 재건 부를 노출 시킨 후 전기 자극을 주기 위한 고리 모양의 쌍극 백극 전극(bipolar electrode)을 좌골 신경 근위단 근처의 신경간에 걸고 약 25-30 mm 정도 떨어진 원위부의 좌골신경에 기록 전극(recording electrode)을 그리고 ground plate를 적당한 곳에 위치시켰다. 전기자극기(WPI model 1835-A, World Precision Instruments, USA)를 이용하여 자극기간 1ms, 자극강도 100 μ A에서 전기 자극을 시작하여 반응이 있을 때까지 증가 시킨 후 이 전기신호(signal)를 amplifier(DAM-80, World Precision Instruments, USA)를 거쳐 oscilloscope(TDS 2014, Tektronix, USA)와 audio monitor(GRASS AM 8 audiomonitor, Grass Medical Instruments, USA)로 잠복기(latent period)를 측정하여 각 실험군 및 대조군, 그리고 반대 측 정상신경의 역치와 신경전도속도(nerve conduction velocity)를 구하였으며, 각 군 간의 역치 및 신경전도속도를 Kruskal-Wallis Test ($p < 0.05$)후 Duncan's Multiple Comparison으로 사후검정 하였다.

3) 조직 및 조직형태학적 검사

각 실험군 및 대조군을 위의 신경생리학적 검사를 시행한 후 17mm의 이식체를 포함한 좌골신경을 박리하여 채취한 후 2% glutaraldehyde에 고정하고, 2% osmium tetroxide에 후고정을 시행하였다. 각 신경을 100% Epon에 포매시킨 다음 신경재생관 내에서 신경재생관의 중앙부에서 1 μ m 두께의 절편을 만든 후, toluidine blue에 염색한 후 일부를 컴퓨터 화상분석(Scion Image beta 4.02, NIH, USA)을 시행하여 전체 신경속(fascicle)의 면적(mm^2), 축삭 밀도(axon/ mm^2) 및 신경수초의 두께를 측정 비교하였다. 또한, 일부의 조직은 슈반세포 표지인자로 알려진 S-100 단백질의 존재를 확인하기 위하여 1차 항체로 S-100(polyclonal rabbit anti-cow, N 1573, Dako, Denmark) 항체와 Avidin-Biotin enzyme complex를 이용한 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 조직을 채취한 뒤 10% 포르말린에 24시간 고정하였으며 탈수과정을 거친 후 파라핀 블록을 제작 하였다. 4 μ m의 두께로 절편을 제작한 후 폴리라이신(poly-D-lysine, Sigma, USA) 피복 슬라이드에 옮겼다. 절편을 탈 파라핀하고 수화한 후 0.01N 염산에 포함된 0.4% 펩신을 이용하여 처리하였다. 내재성의 peroxidase는 메탄올에 포함된 0.3% 과산화수소로 처리하여 추가적인 작용을 방지하였다. 절편은 토끼 혈청을 이용하여 1:1,000으로 희석된 1차 항체와 4 $^{\circ}$ C에서 18시간 동안 배양하였다. 2차 항체로 biotinylated affinity-purified Swine anti-rabbit Ig을 이용하였고, 배경염색으로 Mayer's hematoxyline을 사용하였다. 모든 염색은 Large volume DAKO LSAB[®] Kit, peroxidase 지침서에 따라 시행하였다.

IV. 연구 결과

1. 신경재생관 제작

신경재생관은 Fig. 5에서와 같이 제작하였으며 주사전자현미경 상 밀리포아 막 자체는 다공성의 조면을 가지고 있었으며, 인회석 박막을 피복하여도 다공성의 형태를 잘 유지하였다(Fig. 6).

2. 섬유모세포 및 슈만세포의 세포 활성화

1) 섬유모세포 및 슈만세포의 세포활성도

섬유모세포를 이용한 세포활성도에서 인회석 박막 피복군의 흡광도(파장: 570nm)는 0.85 ± 0.055 , 비처리군은 0.59 ± 0.085 로 인회석 박막 피복군은 대조군의 78.9%, 비처리군은 대조군의 54.8%의 흡광도를 나타냈다 (Table 2).

Table 2. Viability of fibroblast and Schwann cell on the calcium phosphate(Ca-P) coated Millipore membrane assessed with MTT Assay

	Control	Uncoated	Coated
Fibroblast (3T3 cell line)	$1.07 \pm 0.053^*$	0.59 ± 0.085	$0.85 \pm 0.055^{**}$
Schwann cell	0.27 ± 0.025	0.36 ± 0.046	$0.45 \pm 0.042^{**}$

(values represent optical density at 570nm, mean \pm SD)

Control: Non-treated 96-well culture plate

Uncoated: Millipore membrane that fitted at 96-well culture plate

Coated: Ca-P coated Millipore membrane that fitted at 96-well culture plate

*: statistically significant relative to coated and uncoated group(Mann-Whitney U-test, $p < 0.0001$)

** : statistically significant relative to uncoated group(Mann-Whitney U-test, $p < 0.0001$)

또한 각 군을 Mann-Whitney U-test ($p < 0.05$)를 이용하여 비교한 결과 처리군이 비처리군에 비해 우수하였으나($p < 0.0001$), 두군 공히 대조군에 비해서는 열등하였다($p < 0.0001$). 슈만세포의 활성화도 조사에서 피복군과 비피복군에서 흡광도를 측정된 결과 각 실험군은 모두 대조군에 비해 훨씬 높은 활성도를 보여 더 많은 세포들이 부착하여 생존한 것으로 나타났으며, 인회석 박막 피복군 (0.45 ± 0.042)이 비피복군(0.36 ± 0.046)에 비해 생존도가 더 높았다($p < 0.0001$).

2) 섬유모세포 및 슈만세포의 세포부착도

위에서 시행한 바와 같이 각 세포군을 2.5% glutaraldehyde로 10분간 고정시킨 후 주사전자현미경으로 관찰한 결과 슈만세포는 인회석 박막 피복군에서는 38.21 ± 10.05 , 그리고 비피복군은 24.36 ± 5.55 개로 피복군에서 더 나은 세포부착을 보였다(Table 3). 섬유모세포는 대조군보다는 열등하였으나, 피복군이 비피복군보다 양호한 결과를 나타냈다 (Fig. 7).

Table 3. Cellular adhesion fibroblast and Schwann cell on the calcium phosphate(Ca-P) coated Millipore membrane assessed with SEM

	Control	Uncoated	Coated
Fibroblast (3T3 cell line)	85.38±23.53	23.29±7.24	52.54±14.35
Schwann cell	22.38±14.24	24.36±5.55	38.21±7.05

(values represent cell number/600 x 500 μm, mean±SD)

Control: Non-treated 96-well culture plate

Uncoated: Millipore membrane that fitted at 96-well culture plate

Coated: Ca-P coated Millipore membrane that fitted at 96-well culture plate

3. 슈만세포의 분리 및 배양

생후 1일령 백서의 척수후근질을 효소 처리하여 부유세포를 배양한 다음 DNA 합성 억제제를 이용하여 섬유아세포를 제거하고 슈만세포 증식 촉진제로써 슈만세포의 증식을 유도하는 방법을 사용하여 많은 양의 슈만세포를 배양할 수 있었다(Fig. 8). 배양 2주째 평균 95×10^5 개의 세포수를 보였으며, 섬유모세포와는 달리 방추형의 양극성(bipolar) 세포가 관찰되었다. 위의 세포를 3주 배양하여 S-100 염색할 경우 작은 방추형(spindle-shape)으로 보이고 세포체(soma)와 분지하는 여러 돌기들이 관찰되었으며, 세포돌기들이 나란히 배열되는 특징적인 모습(parallel orientation)을 볼 수 있었다(Fig. 9). 세포수를 살펴보면, 배양 1일 째에는 섬유모세포가 $4.28 \pm 6.7 \times 10^5$ 개, 슈만세포가 $0.044 \pm 0.02 \times 10^5$ 개였으며, 1주째에는 섬유모세포가 $12 \pm 2.7 \times 10^5$ 개, 슈만세포가 $15.2 \pm 4 \times 10^5$ 개, 2주째에는 섬유모세포가 $5.5 \pm 1.8 \times 10^5$ 개, 슈만세포가 $96.6 \pm 9.6 \times 10^5$ 개로 되고 3주째에는 섬유모세포가 $2.75 \pm 1.8 \times 10^5$ 개, 슈만세포가 $82 \pm 9.2 \times 10^5$ 개였다(Fig. 10).

4. BDNF 유전자의 발현 및 LacZ Adenovirus의 슈만세포 내로 이입

1) RT-PCR을 통한 BDNF 유전자 발현 확인

배양된 슈만세포와 BDNF-Adenovirus에 50 m.o.i로 감염된 슈만세포에서 RNA를 추출한 다음, PCR을 수행한 결과 423bp의 위치에서 PCR band가 관찰되었다(Fig. 11). PCR band의 밝기는 BDNF-Adenovirus에 감염된 슈만세포에서 훨씬 선명하였다. 또한 PCR band에서 검출된 DNA의 농도는 슈만세포에서 $0.69 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, BDNF-Adenovirus에 감염된 슈만세포에서 $0.795 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이었다.

2) LacZ Adenovirus의 슈만세포 내로 이입

화상분석 결과 m.o.i가 증가할수록 감염된 세포가 늘어났으며, 50 m.o.i부터 거의 모든 세포가 청색으로 발현되기 시작하여 75 m.o.i에서 가장 세포독성이 없이 LacZ 유전자를 발현하였다. 이들 슈만세포들은 매우 밀집된 소용돌이의 형상으로 배열되어 있었으며, 정상적인 슈만세포와 형태학적으로 차이가 없었다. 그러나 100 m.o.i부터는 세포에 손상이 일어나기 시작하였으며, 250 m.o.i.

에서는 대부분의 세포들이 사멸하였고, 살아남은 세포의 경우에도 청색발현을 하더라도 형태학적으로 이상을 보이는 경우가 많았다 (Fig. 12).

5. 인회석박막 피복 도관과 BDNF 유전자 이입 슈만세포를 이용한 신경재생 동물실험 및 평가

1) 좌골신경 기능지수

술 후 12주째에 walking tract를 이용하여 보행을 두 번 측정 한 다음 이를 바탕으로 각 실험군 및 대조군에서 좌골신경 기능 지수를 계산하였는데, BDNF-Sch 군에서 -65.26 ± 29.63 , 그 다음이 Sch군에서 -75.02 ± 19.43 , 그리고 MEM군에서는 -81.76 ± 33.65 의 순으로 BDNF-Sch 군에서 가장 좋은 기능을 보여 주었으며 육안으로 확인한 실제 주행모습도 이와 유사하였다. 그러나 세 군 모두 정상치인 0에는 크게 못 미치는 결과를 보였다 (Table 4).

Table 4. Sciatic function index of each group at post-operative 12 weeks

SFI	MEM (n=8)	Sch (n=8)	BDNF-Sch (n=8)
Mean±S.D.	-81.76 ± 33.65	-75.02 ± 19.43	-65.26 ± 29.63
Range	$-62.39 \sim -128.10$	$-70.62 \sim -89.22$	$-44.54 \sim -90.21$

BDNF-Sch: The groups grafted with Ca-P coated Millipore conduit that filled with BDNF-Schwann cells.

Sch: The groups grafted with Ca-P coated Millipore conduit that filled with Schwann cells.

MEM: The groups grafted with Ca-P coated Millipore conduit that filled with media(MEM) only.

2) 전기 생리학적 검사

BDNF-Sch 군에서 신경 역치가 $1,960 \pm 2,833 \mu A$ 로 가장 낮았으며, 다음이 Sch군, 그 다음이 MEM 군이었다. 신경전도 속도는 BDNF-Sch 군이 29.98 ± 7.71 m/sec, Sch군이 20.91 ± 6.03 m/sec, MEM군이 17.22 ± 6.92 m/sec으로 BDNF-Sch 군에서 가장 좋은 결과를 보였다. 그러나 신경역치와 전도속도 모두 정상신경과는 큰 차이를 보여 기능적으로 정상신경에는 미치지 못하였던 좌골신경기능지수의 결과를 다시 한 번 확인할 수 있었다. Kruskal-Wallis Test ($p < 0.05$)를 시행 한 후 Duncan's Multiple Comparison으로 사후 검정한 결과 전도속도에서 BDNF-Sch군과 MEM군 간에 p-value는 0.0018로 의미 있는 차이를 보였으나 Sch군과는 차이가 없는 것으로 나타났다 (Table 5).

Table 5. Threshold and conduction velocity(CV) of each group at post-operative 12 weeks

	Normal (n=46)	MEM (n=8)	Sch (n=8)	BDNF-Sch (n=8)
Threshold(μ A) (mean)	84.09 \pm 48.11	3,312 \pm 2,905	2,950 \pm 3,681	1,960 \pm 2,833
CV(m/sec) (mean)	45.29 \pm 20.81	17.22 \pm 6.92	20.91 \pm 6.03	29.98 \pm 7.71*

(values represent mean \pm SD)

BDNF-Sch: The groups grafted with Ca-P coated Millipore conduit that filled with BDNF-Schwann cells.

Sch: The groups grafted with Ca-P coated Millipore conduit that filled with Schwann cells.

MEM: The groups grafted with Ca-P coated Millipore conduit that filled with media(MEM) only.

*: statistically significant relative to MEM group (p=0.0018, Kruskal-Wallis Test)

3) 조직 및 조직형태학적 검사

각 실험군 및 대조군을 위의 신경생리학적 검사를 시행한 후 신경 결손부에 이식된 도관을 채취하여 도관을 제거하여 재생된 신경을 관찰하였을 때, BDNF-Sch 군에서 재생된 신경이 가장 굵었으며, 다음이 Sch 군, 그 다음이 MEM 군이었다(Fig. 13). 각 신경을 100% Epon에 포매시킨 다음 신경재생관 내에서 신경재생관의 중앙부에서 1 μ m 두께의 절편을 만들어 toluidine blue에 염색한 다음 컴퓨터 화상분석을 시행하여 전체 신경속(fascicle) 면적(mm²), 축삭 밀도(axon/mm²) 및 신경수초 두께를 측정 비교하였다(Table 6). 신경속의 단면적은 정상군이 0.47 \pm 0.092 mm²로 가장 넓었고, BDNF-Sch 군이 0.22 \pm 0.057 mm², Sch 군이 0.18 \pm 0.074 mm², MEM 군이 0.15 \pm 0.111 mm²으로 정상군을 제외하고는 각 군 간에 유의할 만한 차이를 보이지 않았다(Fig. 14). 축삭의 밀도는 BDNF-Sch 군이 29,516 \pm 5,827 axon/mm²로 제일 높았다. Sch 군이 21,009 \pm 2,971 axon/mm², 정상군이 20,289 \pm 2,486 axon/mm², MEM 군은 19,482 \pm 5,805 axon/mm²로 제일 밀도가 낮았다. Kruskal-Wallis Test 결과 BDNF-Sch 군과 정상군, MEM 군, Sch 군 간에는 매우 의미 있는 차이(p<0.0001)가 있었으나 나머지 군 간에는 차이가 없었다(Fig. 15). 신경수초 두께의 경우 정상군이 1.73 \pm 0.117 μ m 로 가장 두꺼워 Kruskal-Wallis Test (Nonparametric ANOVA) 결과 MEM 군 및 Sch 군과의 비교에서 매우 의미 있는 차이(p<0.0001)가 있었으며, BDNF-Sch 군은 1.20 \pm 0.262 μ m로 Sch 군과의 비교에서 매우 의미 있는 차이(p<0.0001)를 보였다(Fig. 16, 17).

그리고 신경을 종으로 그리고 이식 중앙부에서 단면으로 잘라 S-100으로 면역화학적 염색을 하였을 때에도 BDNF-Sch 군에서 신경 재생이 제일 많이 관찰되었으며(Fig. 18), 그 다음이 Sch 군이었다(Fig. 19). MEM 군에서는 신경 연속성이 이루어지지 않은 경우도 많았다(Fig. 20).

Table 6. Fascicle area, axon density and myelin thickness of each group at post-operative 12 weeks

	Normal (n=25)	MEM (n=8)	Sch (n=8)	BDNF-Sch (n=8)
Fascicle area(mm ²)	0.47±0.092	0.15±0.111	0.18±0.074	0.22±0.057
Axon Density (axon/mm ²)	20,289±2,486	19,482±5,805	21,009±2,971	29,516±5,827*
Myelin Thickness (μm)	1.73±0.117**	1.16±0.184	1.13±0.225	1.20±0.262***

(values represent mean±SD)

BDNF-Sch: The groups grafted with Ca-P coated Millipore conduit that filled with BDNF-Schwann cells.

Sch: The groups grafted with Ca-P coated Millipore conduit that filled with Schwann cells.

MEM: The groups grafted with Ca-P coated Millipore conduit that filled with media(MEM) only.

*: statistically extremely significant relative to Normal, Sch and MEM group (p<0.0001, Kruskal-Wallis Test)

** : statistically extremely significant relative to Sch and MEM group (p<0.0001, Kruskal-Wallis Test)

***: statistically extremely significant relative to Sch group (p<0.0001, Kruskal-Wallis Test)

IV. 고찰

현재까지 신경결손복원술로는 자가 신경이식이 가장 많이 사용되고 있지만 공여부의 감각이상이나 제한된 신경공여 길이 그리고 통증을 수반하는 신경종(neuroma)의 발생 등의 합병증이 발생하는 등 여러 가지의 문제점을 안고 있어 이를 극복하기 위하여 이종신경이식의 연구와 함께 많은 조직공학적인 방법이 연구되어 왔다. 이러한 말초신경 재생에 가장 많이 연구되는 재료는 천연재료와 합성재료로 나눌 수 있는데, 천연재료는 생체 친화성이 높고 독성이 적으며, 슈반세포와 같은 지지세포의 이동을 촉진 시키고 대부분 생분해되어 2차 수술이 필요 없다는 장점이 있다. 주로 사용된 천연재료로는 근육⁶²⁾, 정맥, 인대⁶³⁾, 신경외막(epineural sheath)과 지방막(fat sheath) 등이 있다. 최근에는 이종이식재의 처리가 발달함에 따라 무세포성 이종이식재⁶⁴⁾를 신경재생의 유도체로 이용한 여러 연구들이 진행되고 있다. 하지만 천연재료는 면역반응을 일으킬 수 있고, 대량생산의 어려움 등의 단점이 있다. 이러한 단점으로 인해 여러 가지 생체적합 고분자 재료의 발달과 함께 동종이나 이종생체재료는 합성물질로 대체되고 있으며, 비록 자가 신경이식보다 나은 효과를 보이지는 않았지만 조직공학적 기법의 발전으로 점차 향상된 재료가 개발되고 있다.

신경재생관을 사용한 최근의 연구에 따르면 사용된 폴리머 시스템에 따라 신경재생이 영향을 받음이 알려 졌으며, 과거에 생각된 것처럼 단순한 도관의 역할뿐 아니라 능동적인 역할을 수행함이 밝혀졌다⁶⁵⁾. 특히 관의 물질 투과성과 관의 표면 구조, 전기 부하^{66,67)}, 그리고 관내에 함유된 기질(matrix)의 성질 등에 따라 신경 재생이 영향을 받음이 알려져 이러한 것을 적절히 조절함으로써 신경 재생을 최적화시키고자 하는 연구가 진행되고 있다^{68,69)}. 신경섬유가 성장하기 위해서는 슈반세포의 유도가 중요한 것으로 알려져 있는데, 현재까지 개발되어 있는 신경재생촉진용 재료표면은 대개 소수성이기 때문에 슈반세포의 부착이 어려워 신경섬유 재생 유도에 어려움이 있다. 따라서 신경재생 촉진용 재료는 신경재생에 유리한 내면의 형태와 슈반세포 등 지지세포들의 부착 성장을 돕도록 도관의 내면을 변화시켜야 할 필요가 있다.

본 연구에서 사용한 밀리포아 필터는 미세공성이어서 주위조직으로부터 영양공급이 가능하고, 때

우 저렴하며, 다양한 굵기로 제조할 수 있었다. Salonen 등⁷⁰⁾은 치은 상피세포를 이용하여 밀리포아 필터 및 차폐막으로 사용되는 여러 다른 종류의 재료들의 세포 부착성 및 이동성을 관찰한 결과 밀리포아 필터에서 치은 상피세포의 이동성과 증식능이 가장 높았으며 그 이유로 밀리포아 필터의 조성이 cellulose acetate의 에스테르 혼합물로 세포부착에 중요한 역할을 하는 당단백질이 잘 부착되기 때문이라고 보고하였고, Takata 등⁷¹⁾은 다른 여러 종류의 차폐막 보다 조골세포의 부착도가 높다고 보고하였다.

본 연구에서 박막 피복재로 사용한 인회석은 친수성 재료로서 치아, 뼈 등의 성분으로 조골세포, 섬유모세포 및 치주인대세포 등과 생체적합성이 있는 것으로 알려져 있다. 김 등⁶⁰⁾은 저온에서 흡수성 봉합사 (Vicryl, Ethicon, UK) 표면에 저결정성 수산화인회석(low-crystalline apatite, LCA) 박막을 입히고 L929 섬유모세포와 MC 3T3 조골세포를 배양하였을 경우 세포가 부착이 잘 되고 증식되는 것을 관찰하였다. 이는 결정도가 낮은 인회석 결정 표면에 비결정 형태로 존재하는 것으로 추정되는 CO_3^{2-} , PO_4^{3-} 및 HPO_4^{2-} 등의 반응성이 매우 높은 이온들이 세포부착을 촉진하는 것 때문인 것으로 알려져 있다. 또한 안 등⁷²⁾은 인회석 박막의 성숙온도를 달리하여 불안정 이온의 양을 달리한 다음 세포 부착 및 증식을 관찰한 연구에서 불안정 이온의 양이 많을수록 L929 세포의 부착이 늘어났다고 보고하였다. 이 점에 본 연구자는 비록 뼈나 경조직 유래 세포는 아니지만 슈만세포 역시 인회석 결정 표면에 존재하는 불안정이온에서 방출하는 전하로 인하여 세포부착 및 세포활동(cellular behaviour)에 유리할 것이라 생각하였으며, 결과적으로 신경 축삭의 재생에 도움이 될 수 있을 것이라고 생각하였다. 본 연구에서도 섬유모세포와 슈만세포의 성장과 부착에 인회석 박막이 더 좋은 환경을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 특히 밀리포아 필터는 배양접시보다도 더 나은 슈만세포 부착과 성장 조건을 가지고 있으며, 섬유모세포에는 그 반대의 결과를 보이는 흥미로운 점이 관찰되었다. 이것의 의미는 신경도관으로 신경 결손부를 재건하고자 할 경우 도관 내에 재생되는 뉴런 외에 반흔 조직으로 도관 내강이 줄어들게 되면 신경 재생에 장애가 되게 되는데, 밀리포아 도관은 이러한 점에서 섬유모세포의 증식을 억제하여 섬유성조직 형성을 낮추어 재생관의 역할에 좀 더 도움이 될 것으로 생각되었다.

신경도관 내의 미세구조(microgeometry)는 신경조직의 성장(outgrowth)에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있는데, 본 연구의 인회석 박막 피복 도관은 표면이 아주 거칠며 또한 세공성이어서 신경섬유속(fascicle)의 확산(spread)에 양호한 조건을 부여할 것으로 생각되었으며, 인회석 박막 도관은 하치조신경과 같이 빠르게 둘러싸인 신경 결손 재건에서 생체적합성이나 도관 주위로의 뼈 재생 측면에서 일반 도관보다 훨씬 양호할 것으로 추측되었다. 그리고 인회석 박막을 피복하였을 경우 전반적으로 밀리포아 관이 딱딱해져 기계적 물성이 증가하여 도관의 내강 유지 면에서도 유리하였으며, 잘 부스러지는 필터를 견고히 하여 신경 말단과 봉합을 할 경우에도 찢어지거나 부서지는 단점을 보완할 수 있었다. 인회석 박막 형성 시 박막의 두께는 2-100nm 정도로 세공의 크기를 크게 변화시키지 않았다. 그러나 피복 방법 및 상태에 따라 박막 두께가 2-3 μm 까지 증가할 경우 밀리포아 관의 세공을 막는 결과가 초래되므로 이를 보완할 방법이 모색되어야 할 것으로 사료되었다.

본 연구에서 처음에는 백서 성체의 좌골 신경을 채취한 후 외식체를 여러 차례 콜라겐을 피복한 배양용기로 옮김으로써 섬유모세포를 순차적으로 제거하여 슈만세포를 순수 분리 배양하는 Morrissey 등의 방법을 사용하였으나, 그 수율이 낮고 시간이 오래 걸려, 태생 15일 또는 생후 1일째의 백서의 척수후근절을 효소 처리하여 분리된 세포를 배양한 다음 DNA 합성 억제제를 이용하여 섬유모세포를 제거하고 슈만세포 증식 촉진제로써 슈만세포의 증식을 유도하는 방법을 사용하여 많은 양의 슈만세포를 배양할 수 있었다. 초기 배양 후 Arc-C와 같은 성장억제제 처리를 시행하지 않고 배양하였을 경우 대부분 슈만세포가 아닌 다른 세포들로 분화하여 증식한 것을 확인할 수 있었다. 척수후근절의 세포는 슈만세포, 교세포 및 성인 다형성 수상세포 등과 같이 다양한

신경 관련 세포 등으로 분화되는데, 이처럼 초기 분화력이 뛰어난 후근절 세포들을 초기 1주내에 어떤 처리를 하느냐에 따라 주로 분포하는 세포수의 현격한 차이를 보이게 된다. 특히, 성장억제제의 처리 방법 및 순서 그리고 양에 따라 여러 다른 결과를 보이게 되어 향후 계속적인 연구가 필요한 부분으로 생각되었다. 5-FU와 같이 성장억제제로 알려져 있는 Ara-C는 섬유모세포와 같이 빠르게 증식하는 세포를 효과적으로 제거하였으며, 우리들의 실험에서도 처리 전 70% 미만이던 수율이 Ara-C 처리 후 95%까지 증가되었다. 그러나 배양 시 너무 장기적으로 Ara-C를 사용하게 되면 슈반세포에 독성을 나타내는 부작용이 있을 수 있으므로 Ara-C의 적용 횟수에 대한 기준이 연구자마다 다를 수 있다고 생각되었다. 본 연구에서는 섬유모세포의 수율을 관찰해가며 매 2일마다 처리했으며, 계대배양후 1회까지만 첨가해 주었다. 우리는 슈반세포에 대한 신경영양인자(neurotrophic factors)로 GDNF 4 μ l를 첨가해주었는데, GDNF는 도파민 수용기(dopaminergic receptor)에 결합하는 TGF-superfamily의 일원이다⁷³). 현재까지 밝혀진 GDNF family는 모두 4가지인데 GDNF, neurturin(NTN), persephin(PSP) 및 artemin (ART)이며⁷⁴), 모두 Ret tyrosine kinase receptor와 GFR α 와 특이적으로 결합한다. GDNF는 특히 신경교세포(glial cells)의 일차배양이나 교세포주(glial cell line)를 만들 때 도파민친화성 세포들의 성장을 도와주게 되는데, 신경돌기의 성장을 촉진시키고 세포체(soma) 크기도 커지게 한다. 자율신경의 발생과 성장에 관여하고 운동신경의 targeting과 branching에 필수적인 인자로 성장하는 neuromuscular junction의 synapse 형성을 촉진시키고⁷⁵), 수초성 운동신경섬유의 성장과 축삭 손상이 오래된 운동신경의 축삭의 재생을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. Hoke 등⁷⁶)은 백서에게 과량의 GDNF를 투여한 결과 슈반세포의 증식과 비수초성 신경섬유의 수초형성을 촉진시켰다고 보고하였다. GDNF는 또한 신경이 손상 받았을 때 슈반세포에서 분비되는 여러 신경성장인자중의 하나인데 이런 인자들은 모두 장차 축삭돌기를 성장시켜 재생시키는데 필수적인 성분들이다. 그 중에서도 GDNF를 배양에 추가시킨 것은 본 배양기술자체가 척추후근절에서 세포를 채취해서 바로 배양시키는 방법이기 때문에 신경교(glia)와 관련된 인자를 고려했으며, 실제로 이 GDNF를 추가하지 않은 방법에 비해 많은 수의 세포들을 얻을 수 있었다.

현재까지 슈반세포의 배양에 관한 연구와 함께 슈반세포의 증식에 관여하는 여러 약제 및 인자에 대한 연구가 활발하게 진행되었다. Brockes^{34,35}) 등은 소의 뇌조직과 뇌하수체에서 glial growth factor(GGF)를 분리 정제하여 발표하였는데, 슈반세포와 정상세포(astrocyte)는 이 인자에 대해 강하게 반응하여 세포 증식이 촉진되지만 다형성수상세포(oligodendrocyte)는 별다른 반응을 보이지 않는 것³⁶)으로 보고하였다. 이후의 많은 연구를 통하여 GGF는 neuregulin family의 일원이며, 다른 3종류의 단백질, Acetylcholine-receptor-inducing activity(ARIA), neu differentiation factor(NDF/NRG- β 등^{37,38})과 함께 같은 유전자가 서로 다르게 접합되어 발현되는 것으로 알려졌다. 또한, GGF는 epidermal growth factor(EGF)의 세포막 외측 영역과 상동관계인 것으로 알려졌으며, ErbB 수용기^{39,40})들을 통해 슈반세포에 비슷한 영향을 미치는 것으로 보고되었다. 이러한 연구들을 통해 얻은 결과를 토대로 위의 영양인자 및 필수적인 영양인자를 첨가한 무혈청 배지^{30,31})를 이용한 섬유모세포 증식의 억제 및 슈반세포 배양을 시도한 많은 연구결과들이 보고되고 있으며, Chen 등⁷⁷)과 Mohanna 등⁷⁸)은 rhGGF2를 각각 말초신경 압박손상부와 결손부에 주입한 결과 슈반세포의 증식을 통한 신경축삭의 재생을 관찰하였다고 보고하였다. 그 밖에 forskolin, cholera toxin 등³¹)이 슈반세포에 대하여 증식인자로 작용한다고 보고된 바 있으며, Verdu 등⁴¹)과 Keilhoff 등⁴²)은 슈반세포의 체외배양 시 그 증식능을 극대화하기 위해 체내에서 말초신경에 미리 손상을 주어 변성시키는 방법을 보고하기도 하였다.

슈반세포와 신경축삭간의 상호작용에 관한 정확한 기전은 완전히 밝혀지지 않았으나 슈반세포

는 신경축삭의 성장에 필수적인 기질을 제공하고 여러 종류의 생물활성 인자를 분비하는 것으로 알려져 있다. 슈만세포는 라미닌, 콜라겐, 같은 세포의 기질을 생산하고, L1, N-catherin, α integrin 및 N-CAM(cell adhesion molecule) 과 같은 세포부착 단백질을 생산하며¹⁸⁾, NGF, BDNF, ciliary neurotrophic factor(CNTF)와 같은 신경영양인자를 분비한다¹⁹⁾. 슈만세포는 신경능(neural crest)세포에서 기원하여 쥐의 경우 태생 15일에서 17일 사이에 그 전구세포로부터 분화하는 것으로 밝혀졌으며^{20,21)}, 이 시기에 전구세포와 구별되는 S-100 단백질, Krox-20의 발현²²⁾ 등의 형질변환을 하는 것²³⁾으로 보고된 바 있다. 또한 이러한 슈만 세포의 분화는 발생할 때부터 신경축삭과의 긴밀한 상호 작용을 통해 이루어지는데, 슈만세포의 전구세포와 슈만세포의 생존과 분화에는 성장 및 분화하는 신경축삭에서 분비되는 β -neuregulin(NRG- β)²⁴⁾이 관여하는 것으로 알려져 있다. 이렇게 분화 및 성숙된 슈만세포는 그 전구세포와 달리 신경축삭의 운명과 관계없이 생존에 필요한 영양인자를 스스로 분비하는 방식(autoocrine survival loop)²²⁾으로 축삭과 독립되어 생존할 수 있다. 이는 신경의 손상 시 슈만세포의 생존 및 증식을 통하여 축삭의 재생이 유도된다는 점에서 매우 중요한 의미를 갖는다. 또한 체외 배양할 경우 슈만세포는 생존에 필요한 여러 자가 분비 영양인자를 충분한 농도로 생산할 수 있는 밀도까지 증식할 수 있다.

본 연구에서 사용한 신경성장인자인 BDNF는 NGF와 구조적으로 유사하며, 특히 50% 이상의 amino acid sequence homology를 갖는 단백질로 신경계 내의 여러 종류의 신경세포(특히 medium-fiber sensory neuron, motoneuron 등)의 생존과 분화에 관여 한다⁷⁹⁾. BDNF는 NT-4/5와 함께 TrkB receptor에 특이적으로 결합하며 p75 low affinity neurotrophin receptor에도 작용한다. 결국 BDNF는 TrkB receptor가 분포하는 신경조직에 작용을 하는데, TrkB receptor는 안면신경 및 좌골신경에도 많이 분포하는 것으로 보고되고 있다^{80,81)}. 하지만 말초신경재생에서 BDNF의 역할에 대하여서는 실험하는 디자인에 따라서 다양한 결론으로 논란의 여지가 많았다. Utley 등⁸²⁾은 BDNF와 콜라겐 도관을 이용한 말초신경재생 실험에서 신경의 기능 회복이 증가 된다고 하였으나 일부 저자들은 국소적이고 일시적인 BDNF의 투여는 말초 신경재생에 영향을 주지 않는다고 하였다⁸³⁾. 이러한 결과들은 BDNF를 전달하는 방법의 차이에 의해 발생하는 것으로 국소적으로 고농도 주입을 하여야 신경재생에 영향을 준다고 보고된 바 있다⁸⁴⁾. 반대로 Boyd 등은 말초신경 재생에 있어서의 BDNF의 역할은 용량에 따라 달라지는데 고농도로 일 경우 p75 수용기와 결합함으로써 축삭재생을 저해한다고 보고하였다⁸⁵⁾. 이러한 여러 연구 결과를 토대로 살펴볼 때 말초신경재생 시 여러 가지 영양인자 및 세포부착 물질들이 서로 길항 또는 상승작용을 하고 농도, 위치, 발현되는 시기에 따라 다양하므로 여러 가지 인자들의 시간적, 공간적 작용에 관한 연구와 여러 종류의 유전자를 전달할 수 있는 방법의 개발이 필요할 것으로 생각되었다.

유전자치료에 있어서 지금까지 시도되고 있는 생물학적 유전자 전달 방법은 크게 간접적인 생체외(ex vivo)법과 직접적인 생체 내(in vivo)법으로 나눌 수 있다. 간접적 방법은 전달하려는 유전자를 생산할 수 있는 세포를 원하는 부위에 이식 하는 방법이고 생체 내법은 DNA를 직접 투여하거나 어떤 운반체(vector)에 연결하여 원하는 부위에 전달하는 방법인데, 이 때 운반체로 virus를 이용하여 유전자를 virus표면에 붙이거나 그 안에 넣어 전달 할 수 있다. Virus를 이용한 유전자치료에 주로 사용되고 있는 retrovirus는 감염된 후 viral DNA가 분열하고 있는 세포의 염색체 안으로 끼어 들어간 다음 증폭하는 성장주기를 갖는다. 이러한 특성상 retrovirus는 투입된 유전자를 장기간 지속적으로 발현시켜야 하는 선천성 유전병의 치료에 적당하나 유전자의 전달 부위가 분열 중인 세포(dividing cell)를 가진 조직으로 한정 된다^{48,86,87)}. 이 때 투입된 유전자는 염색체에 무작위로 삽입되기 때문에 정확한 유전자의 발현을 조절할 수 없고 또한 retrovirus는 유전자치료에서 요구되는 높은 역가(high titer)로 virus를 생산하기 어렵다는 단점이 있다. 따라서 retrovirus

에 의한 유전자 전달 방법은 세포분열이 끝난 신경세포(post-mitotic neuron)에는 적합하지 않다. 이런 retrovirus vector의 한계를 극복하기 위한 대안으로 adenovirus를 이용한 유전자 전달 방법을 사용하게 되었다^{54,57}). 기도상피세포(airway epithelium)를 자연적 숙주로 하는 adenovirus는 분열 중인 세포뿐만 아니라 신경세포와 같이 최종 분화된 비분열 세포(non-dividing cell)에도 감염할 수 있는 폭 넓은 숙주 범위를 갖고 있으며 안정성 면에서 고려할 때 adenovirus는 숙주의 염색체에 삽입되지 않고 경미한 호흡기 질환을 유발할 뿐이고, virus의 분리와 높은 역가로의 농축이 쉬운 장점이 있다. 또한 재조합 adenoviral vector는 숙주의 유전자에 영구적으로 이입되지 않으므로 세포의 성질을 변화시키지 않으며, 37kb에 이르는 높은 transgene capacity를 가지며, 현재까지 연구된 바에 의하면 5-6주간의 기간 동안 안정적으로 발현하는 것으로 보고되고 있어 말초 신경 재생을 위한 충분한 기간 동안 신경성장인자의 발현을 기대할 수 있다^{55,88}).

본 연구에서는 BDNF-Ad shuttle vector와 전체 adenovirus 5의 genome을 가지고 있는 pJM17 plasmid를 293 세포에 동시에 감염(co-transfection)시켜 adenovirus genome sequence간에 상동성 재조합(homologous recombination)이 일어난 replication-incompetent BDNF-Ad를 사용하였다. 재조합 adenovirus는 viral genome 내에 BDNF sequence가 들어있는지 PCR을 이용해 확인하였고 BDNF-Ad를 single plaque로 분리하여 wild-type adenovirus를 제거 하였다. 최종 분리한 재조합 virus는 다량의 293 세포에 감염시키고 이를 후 세포가 독성을 나타낼 때 세포를 채취하고 -80 °C에서 냉동과 해동을 5회 반복하고 각 단계마다 vortex로 과격히 흔들어 주어 virus 혼탁액을 얻었으며, 이렇게 하여 얻어진 recombinant adenovirus가 E1 유전자 위치에 BDNF 유전자를 함유하고, 세포를 감염시켜 BDNF mRNA의 발현을 증가시키는 것을 RT-PCR을 통해 확인할 수 있었다. 배양된 슈반세포와 BDNF-Adenovirus에 50 m.o.i로 감염된 슈반세포에서 RNA를 추출한 다음, PCR을 수행한 결과 423bp의 위치에서 PCR band가 관찰되었다. PCR band의 밝기는 BDNF-Adenovirus에 감염된 슈반세포에서 훨씬 선명하였다. 또한 정량적으로 비교할 수는 없으나 PCR band에서 검출된 DNA의 농도는 슈반세포에서 0.69 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, BDNF-Adenovirus에 감염된 슈반세포에서 0.795 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 으로 감염된 슈반세포에서 높게 검출되었다. 그러나 이는 단지 유전자의 발현을 측정한 것으로 실질적인 BDNF 단백질의 분비를 측정하기 위해서 현재 ELISA를 통한 BDNF의 분비량을 측정하는 연구가 진행 중이다.

신경의 재생은 많은 수의 축삭이 신경재생의 목표지점까지 빨리 도달할 때 가장 효과적으로 이루어진다고 할 수 있다. 우리는 백서 좌골신경을 14mm 길이로 길게 결손부를 만든 다음, 이것의 재생 방법으로 먼저 미세공성 도관인 밀리포아 도관과 구멍이 없는 실리콘 튜브를 이용한 재생실험을 하였다. 연구 결과 밀리포아 필터와 슈반세포를 이용하여 제작한 도관을 사용하였을 경우 비록 그 결과가 자가이식 군에는 미치지 못했지만 다른 군보다는 우수한 것으로 나타났다. 이는 도관을 이용하여 근위단에서 원위단으로의 신경재생에 통로 역할을 할 뿐만 아니라, 0.45 μm pore size의 투과성 있는 관을 이용하여 조직액의 투과를 허용함으로써, 뉴런이나 슈반세포에 영양을 계속적으로 공급할 수 있게 하고, 향신경성 인자를 분비하는 슈반세포를 첨가한 결과라고 할 수 있을 것이다. 투과성이 없는 실리콘 관을 사용하였을 때는 14mm의 신경결손간격을 연결할 수 있을 만큼 재생이 이루어지지 않아 단순 포관술이 신경결손 간격이 길 때는 한계가 있다는 사실을 보여 주었다. 여기서 실험을 한 단계 나아가 미세공성 도관을 인회석 박막으로 피복하였을 경우에는 피복하지 않았을 뿐 아니라, 박막을 일정하게 피복하는데 아직 기술이 따르지는 못하였지만, 수차례의 실험을 반복한 결과 우리는 확실히 인회석 박막 피복 도관이 신경재생관으로 사용하기에 한결 낫다고 생각이 되었다. 인회석 박막 피복 도관과 BDNF-Ad를 감염시킨 슈반세포를 이용한 신경재생법은 우리가 적용하였던 어떠한 재생방법보다 신경 기능이나 조직형태학적으로 양호한 결과를 보여 주었다. 하지만 이렇게 향상된 결과에도 정상 신경과는 기능 형태적으로 다소 거리가 있었는데, 동종 슈반세포 사용의 문제점이나 슈반세포의 삼차원적인 배양 및 이식, 흡수성 재료인

PGA(poly-glycolic acid), PLLA(poly-L-lactic acid) 등을 이용한 신경도관의 개발, 여러 종류의 신경영양인자의 상호작용에 대한 연구, 면역반응을 최소화하고 안정적인 유전자 발현을 보장하는 vector의 개발 등 아직 많은 연구가 필요하다 사료되었다.

V. 결 론

본 연구에서는 재생되는 신경축삭이 생존하고 자라기에 적합한 미세공성 밀리포아 필터로 내경 2mm, 길이 17mm의 신경재생관을 만들고, 관 내면을 슈반세포의 부착과 생존을 증진시키기 위해 준안정의 칼슘-포스페이트 용액으로 인회석 박막 피복처리를 하였다. 동종 슈반세포의 효과적인 분리 및 증식을 위하여 기존의 슈반세포 배양법을 개선하여 태생 1일 백서의 척수후근절을 효소 처리 및 DNA 합성 억제제를 이용하여 배양한 다음, hBDNF cDNA를 복제하여 제작한 BDNF-Adenovirus를 배양된 슈반세포에 감염시켰다. 감염된 슈반세포를 인회석 박막 피복된 다공성의 신경재생관에 넣은 후 인위적으로 형성한 백서 좌골신경 결손부에 이식한 뒤 좌골신경 재생의 정도를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 다공성의 밀리포아 필터는 말초신경재생에서 필수적인 역할을 수행하는 슈반세포의 부착을 증진시켜 신경재생관으로서의 효용을 증가시킬 수 있었으며, 또한 인회석 박막을 피복함으로써 슈반세포의 부착과 활성을 더욱 향상시킬 수 있었다.

2. 태생 1일의 백서 척수후근절에서 Ara-C의 반복적 처리와 GDNF의 적절한 투여로 효과적인 슈반세포 배양법을 확립하였다

3. Replication-defective adenoviral vector와 293 세포를 이용하여 제작한 BDNF-Adenovirus를 1차 배양된 슈반세포에 감염시킨 후 BDNF 유전자의 발현 정도를 RT-PCR 을 통해 파악한 바 PCR band의 밝기는 BDNF-Adenovirus에 감염된 슈반세포에서 훨씬 선명하였으며, PCR band에서 검출된 DNA의 농도는 슈반세포에서 $0.69 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, BDNF-Adenovirus에 감염된 슈반세포에서 $0.795 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이었다. LacZ adenovirus를 이용한 슈반세포에 대한 바이러스 감염효율과 세포독성 조사에서 50 m.o.i.부터 모든 세포에서 LacZ 유전자가 발현되었고, 75 m.o.i.에서 최대로 발현되었으며, 100 m.o.i.부터 세포손상이 일어나기 시작하였다.

위의 연구 결과를 토대로 생후 8주된 백서 좌골신경에 14mm의 신경결손부를 형성하고, BDNF-Adenovirus 이입 슈반세포(1.0×10^6 개)를 채운 인회석 박막 피복 신경재생관으로 재건하여 술 후 12주 제 보행, 신경생리학적 및 조직형태학적으로 신경재생 정도를 평가한 결과, 유전자를 조작하지 않은 슈반세포군과 배양액(MEM)만 넣은 군 보다 모든 평가 항목에서 BDNF-Adenovirus를 이입한 슈반세포군이 효과적이었으며, 더 우수한 신경재생능을 갖고 있다고 판단되었다.

VI. 참고 문헌

1. Hausamen JE, Samii M, Schmidseeder R: Repair of the mandibular nerve by means of autologous nerve grafting after resection of the jaw. *J Maxillofac Surg* 1973;1:74-78.
2. Evans GR: Challenges to nerve regeneration. *Semin Surg Oncol* 2000;19:312-318.
3. Madison RD, da Silva C, Dikkes P, Sidman RL, Chiu TH: Peripheral nerve regeneration with entubulation repair: comparison of biodegradable nerve guides versus polyethylene tubes and the effects of a laminin-containing gel. *Exp Neurol* 1987;95:378-390.
4. 박광, 김현태, 이종호: 가토하치조신경 재생에 있어 Nerve growth factor의 효과. *대한악안면성형재건외과학회지* 1996;18:261-268.
5. 이승호, 이종호: 백서의 좌골신경결손 수복에 있어 혈관화신경이식과 비혈관화신경이식의 비교. *대한구강악안면외과학회지* 1996;22:267-277.
6. Madison RD, daSilva CF, Dikkes P: Entubulization repair with protein additives increases the maximum nerve gap distance successfully bridged with tubular prostheses. *Brain Res* 1988;447:325-334.
7. Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, Hansson HA, Johannesson A, Longo FM, Varon S: Nerve regeneration across an extended gap: a neurobiologic view of nerve repair and the possible involvement of neuronotrophic factors. *J Hand Surg[Am]* 1982;7:580-587.
8. Seckel BR, Chiu TH, Nyilas E, Sidman RL: Nerve regeneration through synthetic biodegradable nerve guides: regulation by the target organ. *Plast Reconstr Surg* 1984;74:173-181.
9. Xu XM, Guenard V, Kleitman N, Bunge MB: Axonal regeneration into Schwann cell-seeded guidance channels grafted into transected adult rat spinal cord. *J Comp Neurol* 1995;351:145-160.
10. Guenard V, Kleitman N, Morrissey TK, Bunge RP, Aebischer P: Syngeneic Schwann cells derived from adult nerves seeded in semipermeable guidance channels enhance peripheral nerve regeneration. *J Neurosci* 1992;12:3310-3320.
11. Morrissey TK, Bunge RP, Kleitman N: Human Schwann cells in vitro. I. Failure to differentiate and support neuronal health under co-culture conditions that promote full function of rodent cells. *J Neurobiol* 1995;28:171-189.
12. Morrissey TK, Kleitman N, Bunge RP: Human Schwann cells in vitro. II. Myelination of sensory axons following extensive purification and heregulin-induced expansion. *J Neurobiol* 1995;28:190-201.
13. Varon S, Skaper S, Manthorpe M: Trophic activities for dorsal root and sympathetic ganglionic neurons in media conditioned by Schwann and other peripheral cells. *Dev Brain Res* 1981;1:73-87.
14. Ide C, Tohyama K, Yokota R, Nitatori T, Onodera S: Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. *Brain Res* 1983;288:61-75.
15. Khouri RK, Chiu DT, Feinberg J, Tark KC, Harper A, Spielholz N: Effects of nerve-promoting factors in rat sciatic nerve regeneration. *Microsurgery* 1989;10:206-209.
16. Bunge RP: Expanding roles for the Schwann cell: ensheathment, myelination, trophism and regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 1993;3:805-809.
17. Guenard V, Aebischer P, Bunge RP: The astrocyte inhibition of peripheral nerve regeneration

- is reversed by Schwann cells. *Exp Neurol* 1994;126:44-60.
18. Martini R: Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerve. *J Neurocytol* 1994;23:1-28.
 19. Tonge DA, Golding JP: Regeneration and repair of the peripheral nervous system. *Semin Neurosci* 1993;5:385-390.
 20. Jessen KR, and Mirsky R: Schwann cells: Early lineage, regulation of proliferation and control of myelin formation. *Curr Opin Neurobiol* 1992;2:575-581.
 21. Jessen, KR, Brennan A, Morgan L, Mirsky R, Kent A, Hashimoto Y, Gavrilovic J: The Schwann cell precursor and its fate: A study of cell death and differentiation during gliogenesis in rat embryonic nerves. *Neuron* 1994;12:509-527.
 22. Topilko P, Schneider MS, Levi G, Evercooren A, Chennoufi ABY, Seitanidou T, Babinet C, Charney P: Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* 1994;371:796-799.
 23. Jessen KR, Mirsky R: Origin and early development of Schwann cells. *Microsc Res Tech* 1998;41:393-402.
 24. Dong Z, Brennan A, Liu N, Yarden Y, Lefkowitz G, Mirsky R, Jessen KR: NDF is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat Schwann cell precursors. *Neuron*. 1995;15:585-596.
 25. Wood PM: Separation of Schwann cells and neurons from normal peripheral nerve tissue. *Brain Res* 1976;293:201-211.
 26. Brockes JP, Feilds KL, Raff MC: Studies on cultured rat schwann cell. I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve. *Brain Res* 1979;309:105-118.
 27. Morrissey TK, Kleitman N, Bunge RP: Isolation and functional characterization of Schwann cells derived from adult peripheral nerve. *J Neurosci* 1991;11:2433-2442.
 28. Levi AD, Guenard V, Aebischer P, Bunge RP: The functional characteristics of Schwann cells cultured from human peripheral nerve after transplantation into a gap within the rat sciatic nerve. *J Neurosci* 1994;14:1309-1319.
 29. Kim SU, Yong VW, Watabe K, Shin DH: Human fetal Schwann cells in culture: phenotypic expressions and proliferative capability. *J Neurosci Res* 1989;22:50-59.
 30. Li RH, Sliwowski MX, Lo J, Mather JP: Establishment of Schwann cell lines from normal adult and embryonic rat dorsal root ganglia. *J Neurosci Methods* 1996;67:57-69.
 31. Lopez TJ, De Vries GH: Isolation and serum-free culture of primary Schwann cells from human fetal peripheral nerve. *Exp Neurol* 1999;158:1-8.
 32. Casella GT, Bunge RP, Wood PM: Improved method for harvesting human Schwann cells from mature peripheral nerve and expansion in vitro. *Glia* 1996;17:327-338.
 33. Levi AD: Characterization of the technique involved in isolating Schwann cells from adult human peripheral nerve. *J Neurosci Methods* 1996;68:21-26.
 34. Lemke GE, Brockes JP: Identification and purification of glial growth factor. *J Neurosci* 1984;4:75-83.
 35. Brockes JP: Assay and isolation of glial growth factor from the bovine pituitary. *Methods Enzymol* 1987;147:217-225.
 36. Brockes JP, Lemke GE, Balzer DR Jr: Purification and preliminary characterization of a glial

- growth factor from the bovine pituitary. *J Biol Chem* 1980;255:8374-8377.
37. Morrissey TK, Levi AD, Nuijens A, Sliwkowski MX, Bunge RP: Axon-induced mitogenesis of human Schwann cells involves heregulin and p185^{erbB2}. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1431-1435.
 38. Levi AD, Bunge RP, Lofgren JA, Meima L, Hefti F, Nikolics K, Sliwkowski MX: The influence of heregulins on human Schwann cell proliferation. *J Neurosci* 1995;15:1329-1340.
 39. Kwon YK, Bhattacharyya A, Alberta JA, Giannobile WV, Cheon K, Stiles CD, Pomeroy SL: Activation of ErbB2 during wallerian degeneration of sciatic nerve. *J Neurosci* 1997;17:8293-8299.
 40. Schroering A, Carey DJ: Sensory and motor neuron-derived factor is a transmembrane heregulin that is expressed on the plasma membrane with the active domain exposed to the extracellular environment. *J Biol Chem* 1998;273:30643-30650.
 41. Verdu E, Rodriguez FJ, Gudino-Cabrera G, Nieto-Sampedro M, Navarro X: Expansion of adult Schwann cells from mouse predegenerated peripheral nerves. *J Neurosci Methods* 2000;99:111-117.
 42. Keilhoff G, Fansa H, Schneider W, Wolf G: In vivo predegeneration of peripheral nerves: an effective technique to obtain activated Schwann cells for nerve conduits. *J Neurosci Methods* 1999;89:17-24.
 43. Kromer LF, Cornbrooks CJ: Transplants of Schwann cell cultures promote axonal regeneration in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:6330-6334.
 44. Kuhlengel KR, Bunge MP, Bunge RP: Implantation of cultured sensory neurons and Schwann cells into lesioned neonatal rat spinal cord. I. Implant characteristics and examination of corticospinal tract growth. *J Comp Neurol* 1990;293:63-74.
 45. Kuhlengel KR, Bunge MP, Bunge RP, Burton H: Implantation of cultured sensory neurons and Schwann cells into lesioned neonatal rat spinal cord. II. Implant characteristics and examination of corticospinal tract growth. *J Comp Neurol* 1990;293:74-91.
 46. Xu XM, Chen A, Guenard V, Kleitman N, Bunge MB: Bridging Schwann cell transplants promote axonal regeneration from both the rostral and caudal stumps of transected adult rat spinal cord. *J Neurocytol* 1997;26:1-16.
 47. Levi AD, Sonntag VK, Dickman C, Mather J, Li RH, Cordova SC, Bichard B, Berens M: The role of Schwann cell grafts in the repair of gaps within the peripheral nervous systems of primates. *Exp Neurol* 1997;143:25-36.
 48. Rodriguez FJ, Verdu E, Ceballos D, Navaro X: Nerve guides seeded with autologous Schwann cells improve nerve regeneration. *Exp Neurol* 2000;161:571-584.
 49. Rosenberg MB, Friedmann T, Robertson RC, Tuszynski M, Wolff JA, Breakefield XO, Gage FH: Grafting genetically modified cells to the damaged brain: restorative effects of NGF expression. *Science* 1988;242:1575-1578.
 50. Tuszynski MH, Senut MC, Ray J, Roberts J: Somatic gene transfer to the adult primate central nervous system: in vitro and in vivo characterization of cells genetically modified to secrete nerve growth factor. *Neurobiol Dis* 1994;1:67-78.
 51. Nakahara Y, Gage FH, Tuszynski MH: Grafts of fibroblasts genetically modified to secrete NGF, BDNF, NT-3, or basic FGF elicit differential responses in the adult spinal cord. *Cell Transplant* 1996;5:191-204.

52. Feltri ML, Scherer SS, Wrabetz L, Kamholtz J, Shy ME: Mitogen-expanded Schwann cells retain the capacity to myelinate regenerating axons after transplantation into rat sciatic nerve. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:8827-8831.
53. Tuszynski MH, Weidner N, McCormack M, Miller I, Powell H, Conner J: Grafts of genetically modified Schwann cells to the spinal cord: survival, axon growth, and myelination. *Cell Transplant* 1998;7:187-196.
54. Weidner N, Blesch A, Grill RJ, Tuszynski MH: Nerve growth factor-hypersecreting Schwann cell grafts augment and guide spinal cord axonal growth and remyelinate central nervous system axons in a phenotypically appropriate manner that correlates with expression of L1. *J Comp Neurol* 1999;413:495-506.
55. Shy ME, Tani M, Shi YJ, Whyatt SA, Chibhi T, Scherer SS, Kamholz J: An adenoviral vector can transfect lacZ expression into Schwann cells in culture and in sciatic nerve. *Ann Neurol* 1995;38:429-436.
56. Sorensen J, Haase G, Krarup C, Gilgenkrantz H, Kahn A, Schmalbruch H: Gene transfer to Schwann cells after peripheral nerve injury: a delivery system for therapeutic agents. *Ann Neurol* 1998;43:205-211.
57. Jung I, Kim HS, Hong JS, Kwon H, YH Kim Kwon: Effective gene transfer into regenerating sciatic nerves by adenoviral vectors: potentials for gene therapy of peripheral nerve injury. *Mol cells* 2000;10:540-545.
58. Blits B, Dijkhuizen PA, Boer GJ, Verhaagen J: Intercostal nerve implants transduced with an adenoviral vector encoding neurotrophin-3 promote regrowth of injured rat corticospinal tract fibers and improve hindlimb function. *Exp Neurol* 2000;164:25-37.
59. 김현만, 김윤지, 박수진, 고재승: 고농도 칼슘포스페이트 과포화 용액의 제조 및 이를 이용한 칼슘포스페이트 결정 박막 형성 방법. 대한민국 출원번호 98-38553 (1998. 9. 17.)
60. Kim HM, Kim Y, Park SJ, Rey C, Lee HM, Glimcher MJ, Ko JS: Thin film of low-crystalline calcium phosphate apatite formed at low temperature. *Biomaterials* 2000;21:1129-1134.
61. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA: Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1989;83:129-36.
62. Battiston B, Tos P, Cushway TR, Geuna S: Nerve repair by means of vein filled with muscle grafts I. Clinical results. *Microsurgery* 2000;20:32-36.
63. Brandt J, Dahlin LB, Lundborg G: Autologous tendons used as grafts for bridging peripheral nerve defects. *J Hand Surg [Br]* 1999;24(3):284-90.
64. Kim BS, Yoo JJ, Atala A: Peripheral nerve regeneration using acellular nerve grafts. *J Biomed Mater Res* 2004;68:201-9.
- 65) Aebischer P, Guenard V, Valentini RF: The morphology of regenerating peripheral nerves is modulated by the surface microgeometry of polymeric guidance channels. *Brain Res* 1990;531:211-218.
66. Zhao Q, Drott J, Laurell T, Wallman L, Lindstrom K, Bjursten LM, Lundborg G, Montelius L, Danielsen N: Rat sciatic nerve regeneration through a micromachined silicon chip. *Biomaterials* 1997;18:75-80.
67. Wallman L, Zhang Y, Laurell T, Danielsen N: The geometric design of micromachined silicon sieve electrodes influences functional nerve regeneration. *Biomaterials* 2001;22:1187-1193.

68. Aebischer P, Valentini RF, Winn SR, et al.: The use of a semi-permeable tube as a guidance channel for a transected rabbit optic nerve. *Prog Brain Res* 1988;78:599-603.
69. Valentini RF, Aebischer P, Winn SR, Galletti PM: Collagen- and laminin-containing gels impede peripheral nerve regeneration through semipermeable nerve guidance channels. *Exp Neurol* 1987;98:350-356.
70. Salonen JI, Kautsky MB, Dale BA: Changes in cell phenotype during regeneration of junctional epithelium of human gingiva in vitro. *Periodontal Res* 1989;24:370-377.
71. Takata T, Wang HL, Miyauchi M: Migration of osteoblastic cells on various guided bone regeneration membranes. *Clin Oral Implants Res* 2001;12:332-338.
72. 안정연, 박수진, 고재승 등: 합성 인회석 결정 박막에서 단백질 부착과 섬유모세포 부착 및 증식. *대한구강해부학회지* 1997;21:243-259.
73. Watabe K, Ohashi T, Sakamoto T, Kawazoe Y, Takeshima T, Oyanagi K, Inoue K, Eto Y, Kim SU: Rescue of lesioned adult rat spinal motoneurons by adenoviral gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci Res* 2000;60:511-519.
74. Saarma M and Sariola H: Other neurotrophic factors: Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). *Microsc Res Tech* 1999;45:292-302.
75. Nguyen QT, Paradanian AS, Snider WD, Lichtman JW: Hyperinnervation of neuromuscular junctions cause by GDNF overexpression in muscle. *Science* 1998; 279:1725-1729.
76. Hoke A, Ho T, Crawford TO, LeBel C, Hilt D, Griffin JW: Glial cell line-derived neurotrophic factor alters axon schwann cell units and promotes myelination in unmyelinated nerve fibers. *J Neurosci* 2003;23:561-567.
77. Chen LE, Liu K, Seaber AV, Katragadda S, Kirk C, Urbaniak JR: Recombinant human glial growth factor 2 (rhGGF2) improves functional recovery of crushed peripheral nerve (a double-blind study). *Neurochem Int* 1998;33:341-351.
78. Mohanna PN, Young RC, Wiberg M, Terenghi G: A composite poly-hydroxybutyrate-glial growth factor conduit for long nerve gap repairs. *J Anat* 2003;203:553-565.
79. Boyd JG, Gordon T: Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Mol Neurobiol* 2003;27:277-324.
80. Apfel SC. Clinical applications of neurotrophic factors. Philadelphia. Lippincott-Raven. 1997.
81. Markus A, Patel TD, Snider WD: Neurotrophic factors and axonal growth. *Curr Opin Neurobiol* 2002;12:523-531.
82. Utley DS, Lewin SL, Cheng ET, Verity AN, Sierra D, Terris DJ: Brain-derived neurotrophic factor and collagen tubulization enhance functional recovery after peripheral nerve transection and repair. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996;122:407-413.
83. Shirley DM, Williams SA, Santos PM: Brain-derived neurotrophic factor and peripheral nerve regeneration: a functional evaluation. *Laryngoscope* 1996;106:629-632.
84. Jones LL OM, Bunge MB, Tuszynski MH: Neurotrophic factors, cellular bridges and gene therapy for spinal cord injury. *J Physiol* 2001;533:83-89.
85. Boyd JG, Gordon T: A dose-dependent facilitation and inhibition of peripheral nerve regeneration by brain-derived neurotrophic factor. *Eur J Neurosci* 2002;15:613-626.
86. Kawaja MD, Rosenberg MB, Yoshida K, Gage FH: Somatic gene transfer of nerve growth factor promotes the survival of axotomized septal neurons and the regeneration of their axons in adult rats. *J Neurosci* 1992;12:2849-2864.

87. Nakahara Y, Gage FH, Tuszynski MH: Grafts of fibroblasts genetically modified to secrete NGF, BDNF, NT-3, or basic FGF elicit differential responses in the adult spinal cord. *Cell Transplant* 1996;5:191-204.
88. Blits B, Dijkhuizen PA, Carlstedt TP, Poldervaart H, Schiemanck S, Boer GJ, Verhaagen J: Adenoviral vector-mediated expression of a foreign gene in peripheral nerve tissue bridges implanted in the injured peripheral and central nervous system. *Exp Neurol* 1999;160:256-267.

Appendix: Legends and Figures

Legends

Fig. 1. Schematic drawing of the experiment.

Fig. 2. Dissected spine for DRG harvesting from 1-day old rat.

(Black arrowheads: dorsal root ganglia)

Fig. 3. BDNF-Adenovirus that we constructed.

BDNF gene was inserted at E1 deleted region.

Fig. 4. Normal rat foot print and Sciatic Function Index.

Fig. 5. Nerve Conduit made of Millipore® membrane.

(internal diameter 2mm and length 20mm)

Fig. 6. Scanning electron photomicrograph of Millipore® membrane(A) and Ca-P coated Millipore® membrane(B). Arrows indicate 0.45 μ m sized pore and there was no change in pore size after Ca-P coating.(SEM, \times 5000)

Fig. 7. Scanning electron photomicrograph of NIH 3T3 cells(A) and Schwann cells(B) on coated Millipore® membrane. Schwann cells show long cellular processes(arrows) but NIH 3T3 cells do not. (SEM, \times 1000)

Fig. 8. Photomicrograph of cultured Schwann cells, after 2 weeks.(phase-contrast, \times 100)

Fig. 9. Photomicrograph of S-100 immunoflorescent staining of cultured Schwann cells. The cells show parallel oriented cellular processes and positively stained cytoplasm.(\times 200)

Fig. 10. Change of cell number of Schwann cell & fibroblast population through the time course after primary culture.

Fig. 11. In vitro characterization of infected Schwann cells with RT-PCR. Prominent PCR band at 423bp level was detected in BDNF-Ad infected Schwann cells compared with non-infected Schwann cells.

Fig. 12. Cultured Schwann cells were transfected with LacZ adenovirus to determine transfection efficiency and β -gal stained. β -gal expression was minimal with 10 m.o.i. of infection(A), β -gal was expressed in most of cells with 50 m.o.i.(B), and cells-toxicity was shown at 100 m.o.i.(C). There were no viable cells with 250 m.o.i.(D).(photomicrographs, \times 100)

Fig. 13. Regenerated sciatic nerves 12 weeks after surgery

(Lt; BDNF-Sch, Center; Sch., Rt.; MEM)

Fig. 14. Fascicle area of regenerated sciatic nerves 12weeks after surgery

Fig. 15. Axon density of regenerated sciatic nerves 12weeks after surgery

Fig. 16. Myelin thickness of regenerated sciatic nerves 12weeks after surgery

Fig. 17. Cross sectional photomicrograph of regenerated nerve in groups grafted with Ca-P coated Millipore conduit that filled with BDNF-Ad infected Schwann cells. Arrowheads indicate Millipore conduit that surrounds regenerated axons(A, Toluidine blue, \times 40), and arrows indicate myelinated axons(B, Toluidine blue, \times 100).

Fig. 18. Cross sectional(A) and longitudinal(B) photomicrographs of regenerated nerve in groups grafted with Ca-P coated Millipore conduit that filled with BDNF-Schwann cells. (S-100 immunohistochemical stain, \times 40)

Fig. 19. Cross sectional(**A**) and longitudinal(**B**) photomicrographs of regenerated nerve in groups grafted with Ca-P coated Millipore conduit that filled with Schwann cells. (S-100 immunohistochemical stain, ×40)

Fig. 20. Cross sectional(**A**) and longitudinal(**B**) photomicrographs of regenerated nerve in groups grafted with Ca-P coated Millipore conduit that filled with media(MEM) only. In longitudinal section, discontinuity of nerve fiber can be seen between the two segments. (S-100 immunohistochemical stain, ×40)

Figures

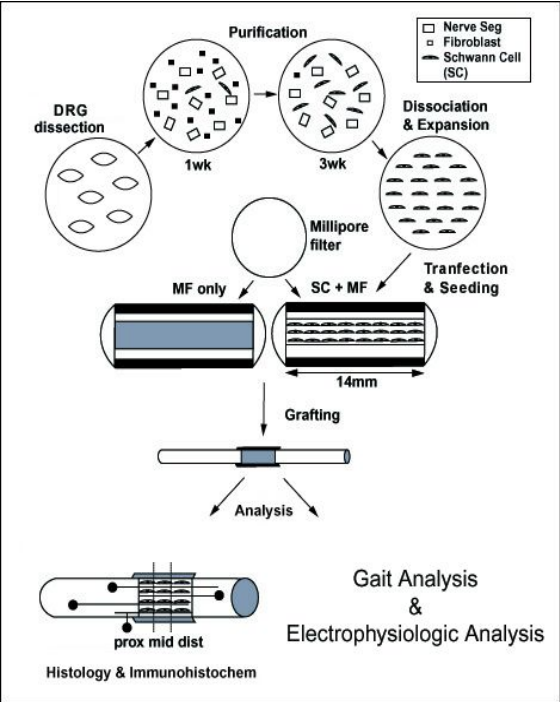


Fig. 1.

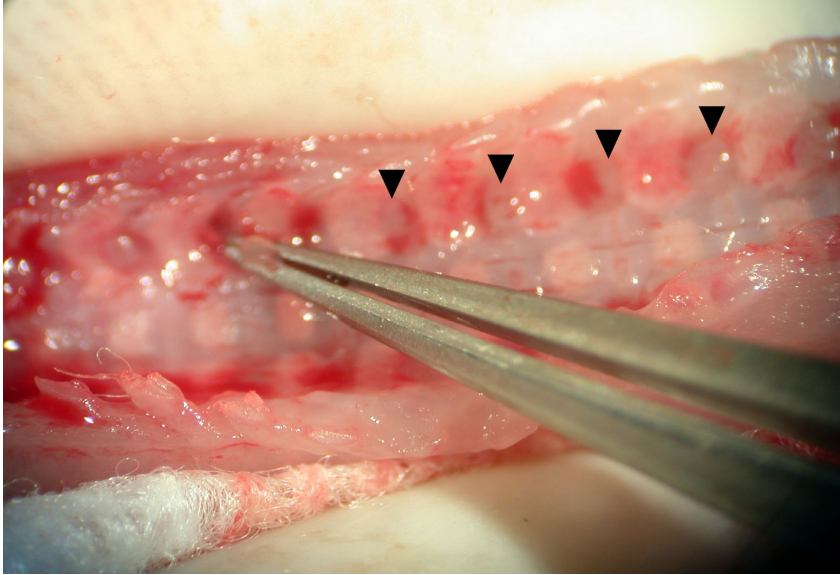


Fig. 2.

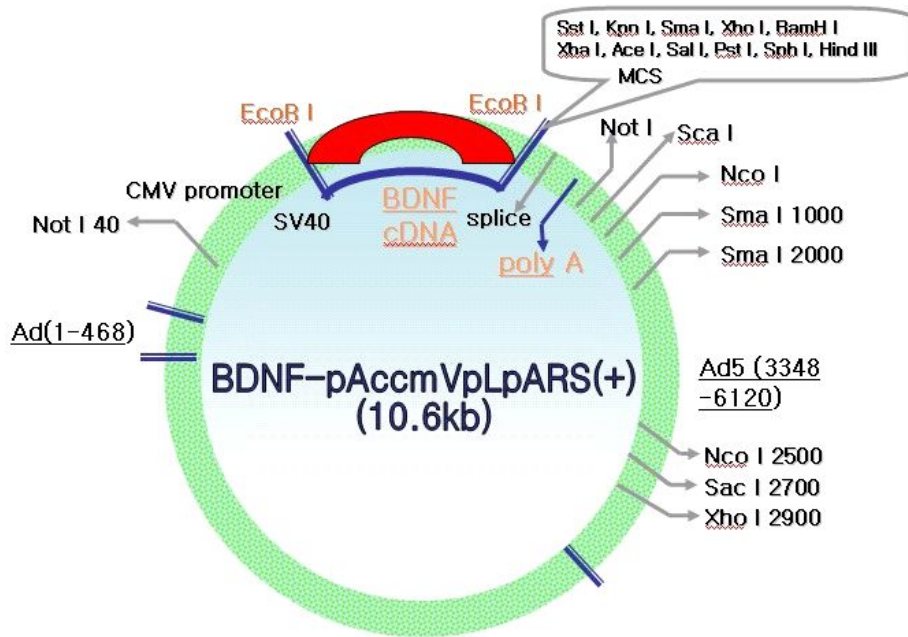
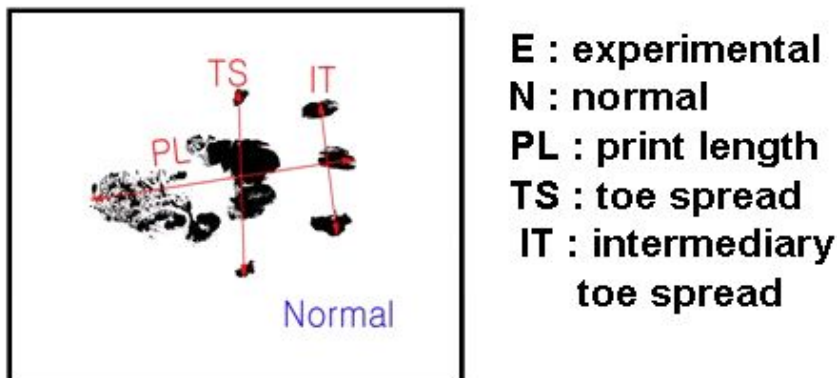


Fig. 3.



BMH	TSF	ITF	PLF	SFI
SFI	(ETS-NTS)/ NTS	(EIT-NIT)/ NIT	(EPL-NPL)/ NPL	$(-38.3 \times \text{PLF}) + (109.5 \times \text{TSF}) + (13.3 \times \text{ITF}) - 8.8$

Fig. 4.



Fig. 5.

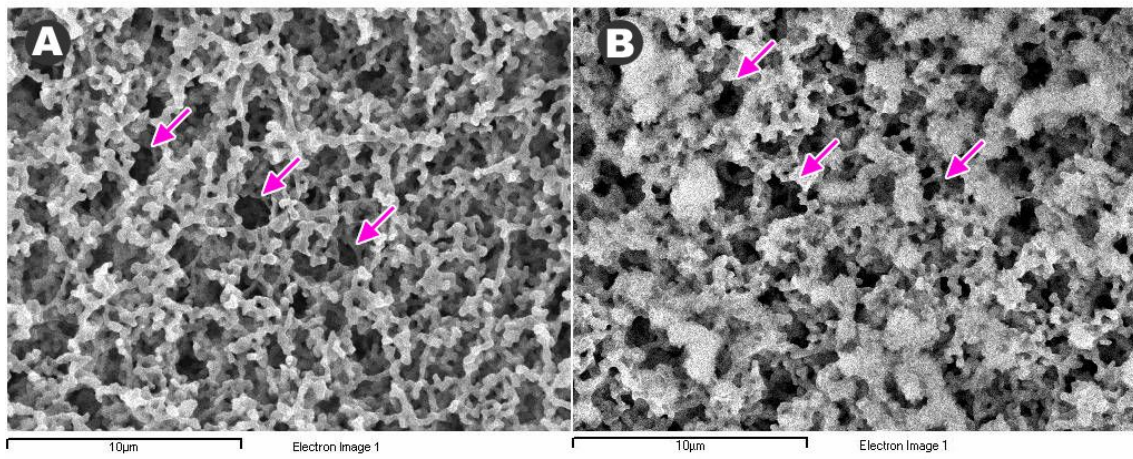


Fig. 6.

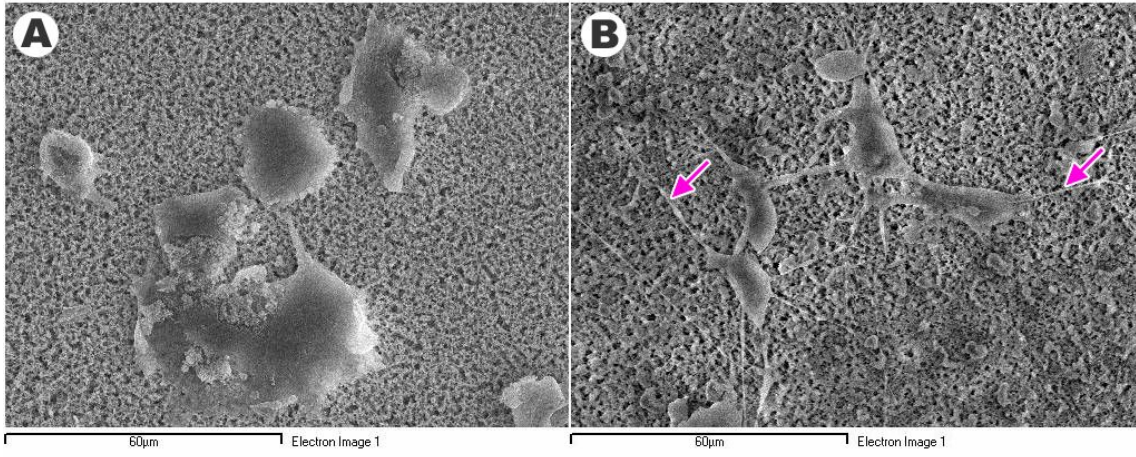


Fig. 7.

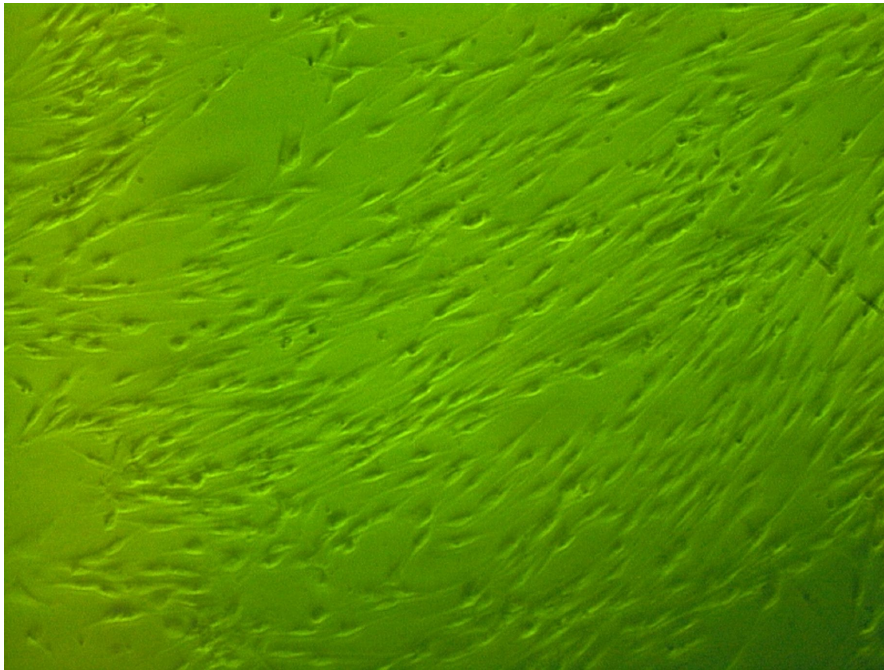


Fig. 8.

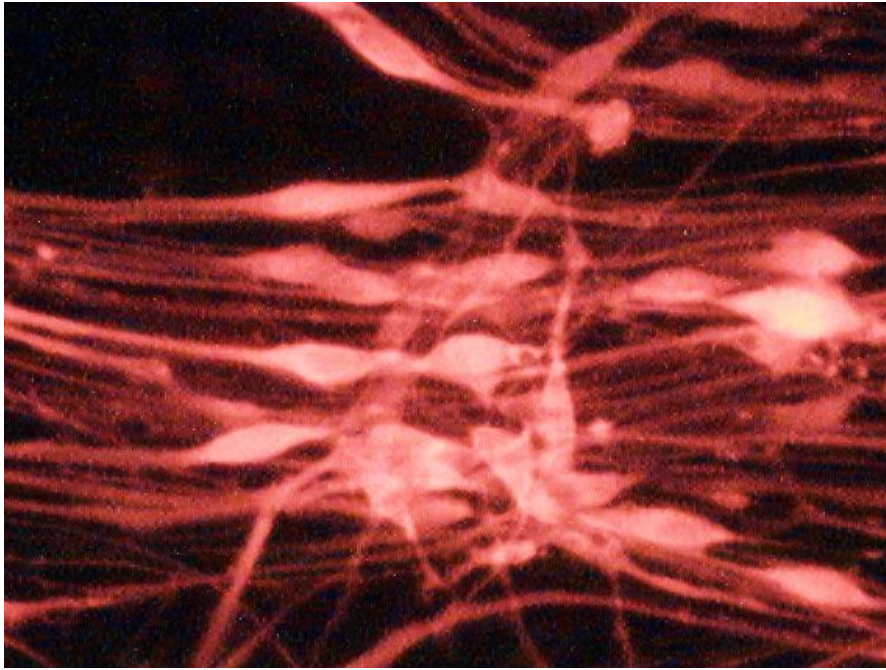


Fig. 9.

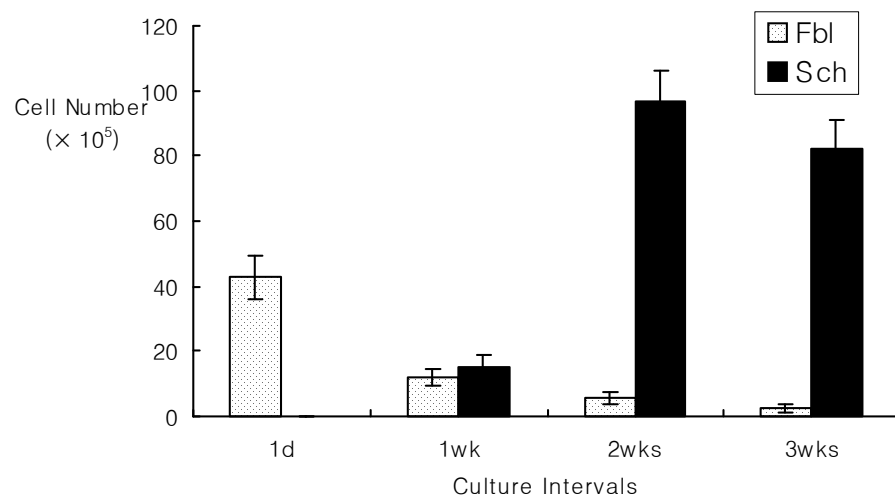


Fig. 10.

BDNF RT-PCR result

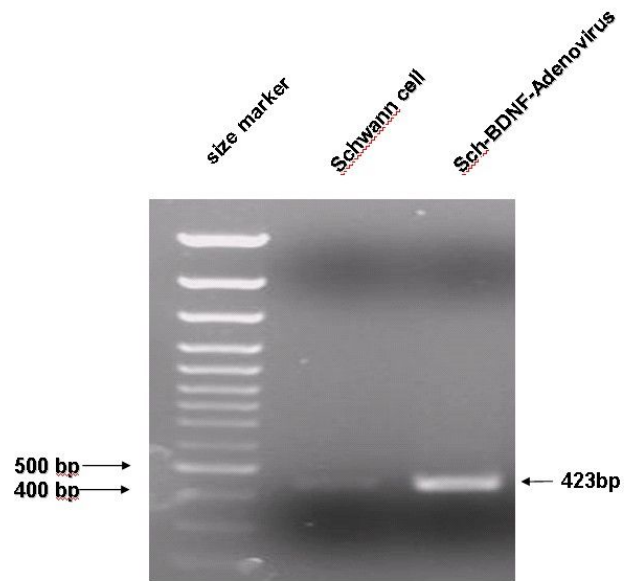


Fig. 11.

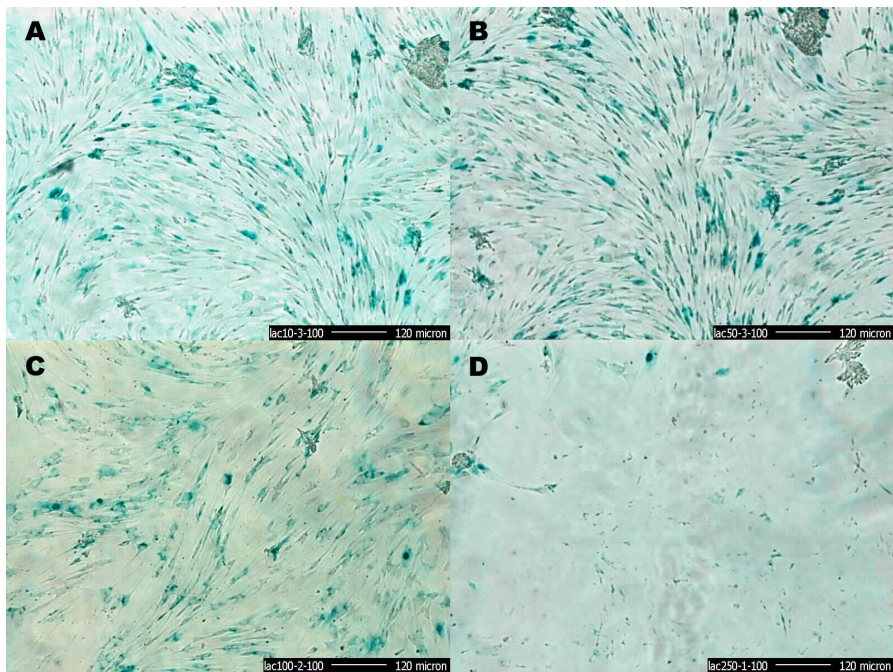


Fig. 12.



Fig. 13.

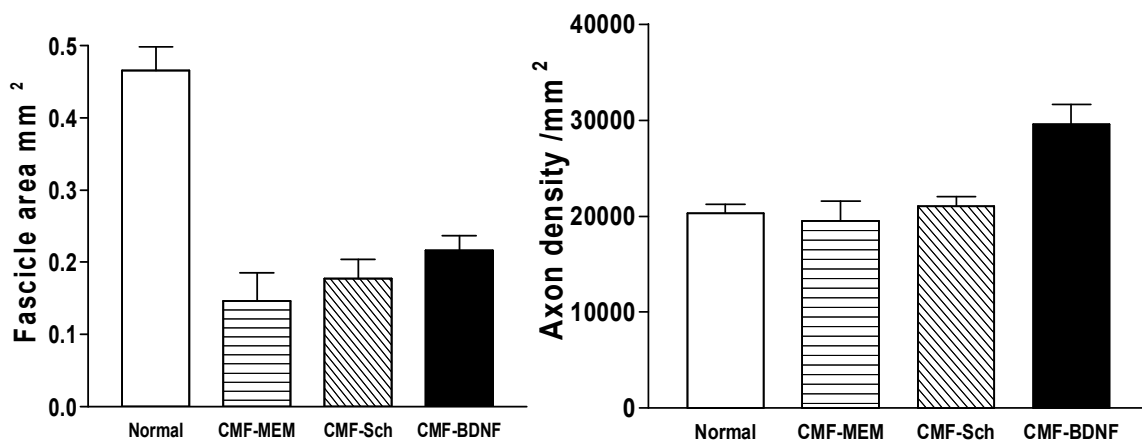


Fig. 14.

Fig. 15.

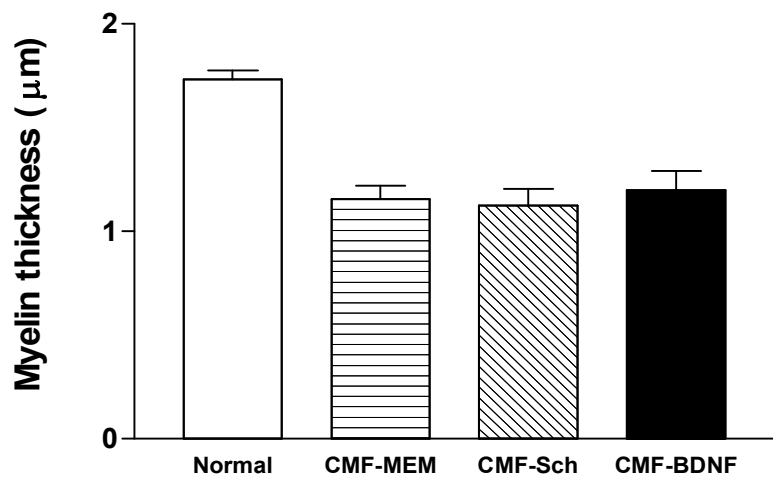


Fig. 16.

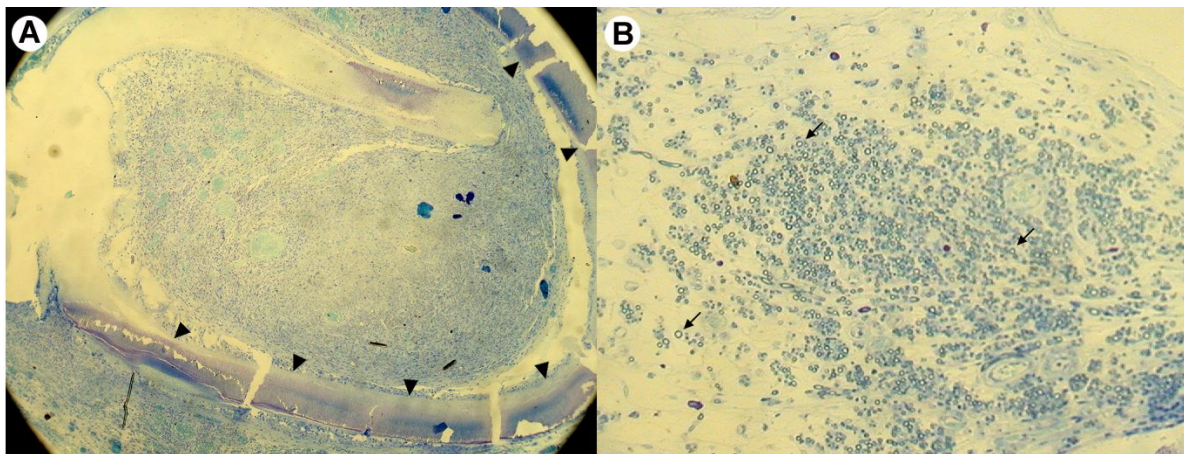


Fig. 17.

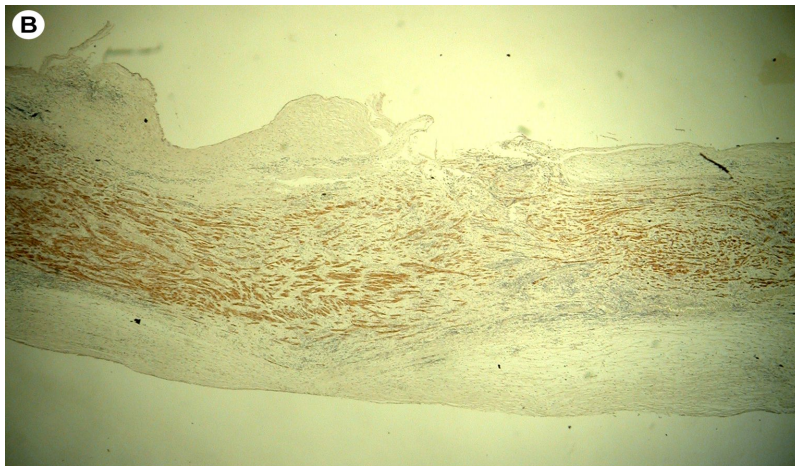
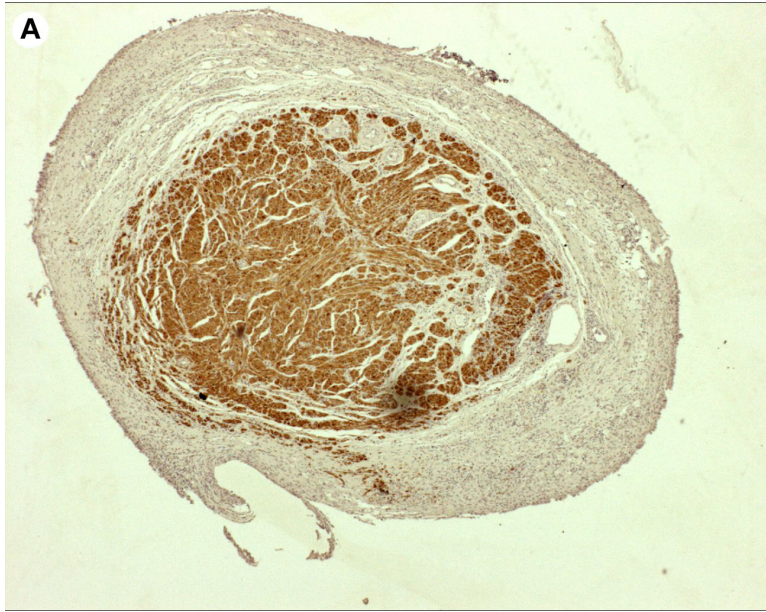


Fig. 18.

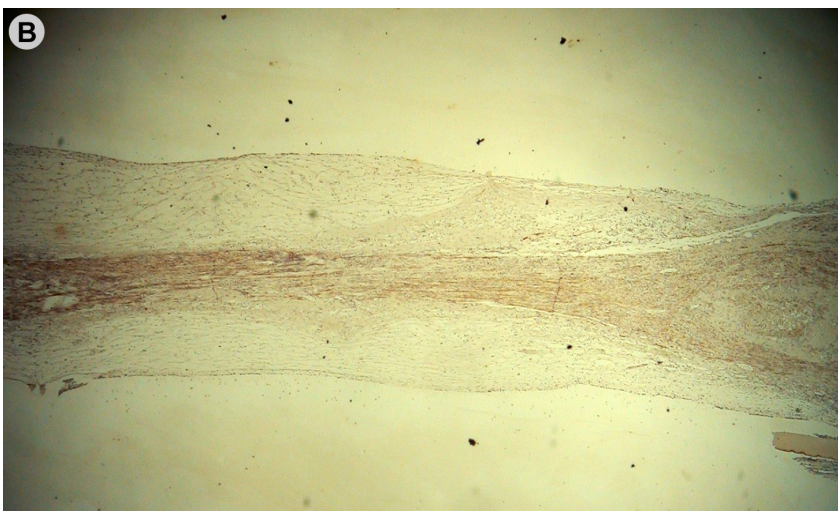
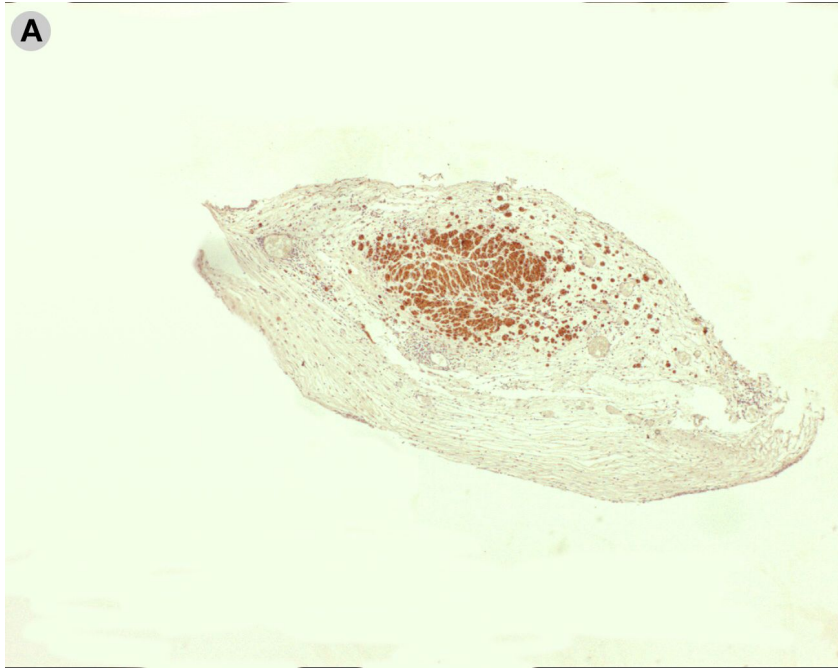


Fig. 19.

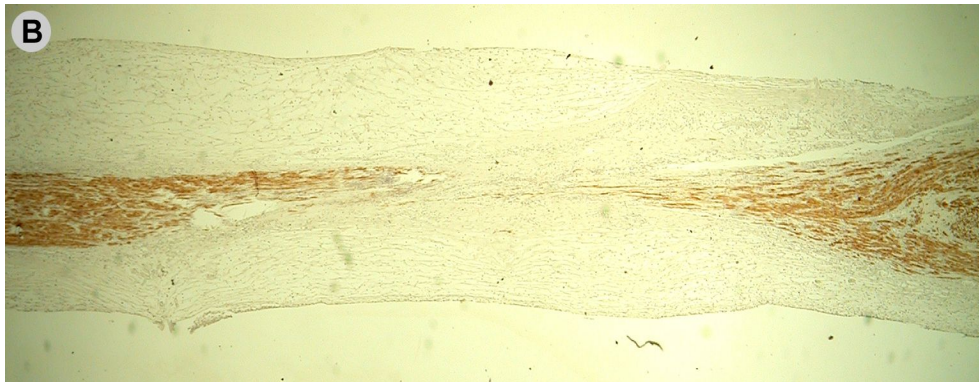


Fig. 20.

