Polymer(Korea), Vol. 32, No. 1, pp 49-55, 2008

슈반세포와 SIS 스폰지의 이식이 손상된 말초 신경 재생에 미치는 영향

김초민 · 김순희 · 김수미 · 박상욱 · 이일우* · 김문석** · 이종문 · 강길선† · 이해방**
전북대학교 고분자 BIN 융합 연구팀, *가톨릭대학교 신경외과, **한국화학연구원 나노생체재료연구실
(2007년 9월 6일 접수, 2007년 11월 14일 채택)

The Effect of Transplantation of Schwann Cell and SIS Sponge on the Injured Peripheral Nerve Regeneration

Cho Min Kim, Soon Hee Kim, Su Mi Kim, Sang Wook Park, Il Woo Lee*, Moon Suk Kim, John M. Rhee, Gilson Khang†, and Hai Bang Lee****
BK-21 Polymer BIN Fusion Research Team, Chonbuk National University, 664-14 Dukjin, Jeonju 561-756, Korea
**Department of Neurosurgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea, 520-2 Daeheung 2dong, Jung ku, Daejeon 301-723, Korea*
***Nanobiomaterials Lab, Korea Research Institute of Chemical Technology, P.O.Box 107, Yuseong, Daejeon 305-600, Korea*
(Received September 6, 2007; Accepted November 14, 2007)

초록 : 슈반세포는 강력한 말초신경 재생 효과를 가지고 있다. 그리고 신경 유도관으로 사용된 소장점막하조직(small intestinal submucosa, SIS)은 세포활성을 촉진하는 여러 가지 성장인자를 다량 함유하고 있고 이종이식의 면역 거부반응이 없는 생체물질로서 널리 사용되고 있다. 슈반세포는 Fischer 쥐의 좌골신경으로부터 분리하였고, 순수 배양된 슈반세포를 2×10^6 세포로 계산하여 SIS 스폰지에 파종하였다. 그리고 Fischer 쥐의 좌골신경 5 mm를 제거하여 신경과 제조된 스폰지를 연결하는 신경 외막 봉합을 실시하였다. 그런 후 1, 2주 및 4주 후 재생된 신경을 적출 한 후, H & E 염색과 S-100, GFAP 및 NF 면역조직화학염색을 실시하였다. 그 결과, SIS 스폰지와 슈반세포를 함께 이식한 군(Group II)은 아무것도 이식하지 않은 군(Control II)과 SIS 스폰지만 이식한 군(Group I) 보다 뚜렷한 양성반응을 보였고 손상을 받지 않은 군(Control I)과 별차이가 없는 양상을 보여주었다. 이는 SIS 스폰지와 슈반세포를 함께 이식했을 때 손상된 조직공학적 말초 신경 재생에 중요한 역할을 한 것으로 사료된다.

Abstract : It is recognized that Schwann cells(SC) are essential for peripheral nerve development and regeneration. SIS (small intestinal submucosa) consists of some growth factors which can stimulate cell activity without immune rejection responges. SCs were harvested from the femurs and tibias of female Fischer rat and then suspended with 2×10^6 cell/sponge in SIS sponge. Fischer rat received an implant consisting of the SCs and the SIS sponge at the place of a 5 mm gap created by the sciatic nerve resection. Thin sections were stained with H&E staining and immunostaining of S-100, GFAP and NF after 1, 2, and 4 weeks. It was observed that the effects of the SIS sponge with SCs on neuroinduction(Group II, with scaffold & cell) are strong as much as uninjured model(Control I), and significantly stronger than SIS sponge model(Group I, with scaffold only) and blank model(Control II). In conclusion, these results suggest that SIS sponge filled with SCs may have an important role for peripheral nerve regeneration of tissue engineering.

Keywords : schwann cells(SC), small intestinal submucosa(SIS) sponge, peripheral nerve regeneration, tissue engineering.

서 론

신경이 절단되었을 때 절단된 부위의 간격이 너무 멀리 떨어져 있거나 오랜 시간이 지나면 신경 섬유에는 여러 가지의 퇴행성 변화와 함께 재생을 위한 조직반응이 나타난다고 한다. 절단된 말초 신경은 재생과정을 겪는 동안에는 축삭수송을 통해 신경세포체에 손상에 대한 정보와 재생의 과정을 알려주고, 신경세포체는 다시 말초신경에 적절한 대상성 반응이 나타나도록 유도한다고 알려져 있다. 또한 말초신경의 재생에는 신경절의 감각신경원에 작용하는 신경영양인자-

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: gskhang@chonbuk.ac.kr

3(NT-3), 신경교세포에 작용하는 신경교세포 성장인자(GGF), 중추신경계에 작용하는 뇌추출 신경영양인자(BDNF), 말초신경계의 성장에 관여하는 신경성장인자(NGF) 등 여러 가지 신경영양인자들이 관여한다.[1-15]

신경교세포는 중추신경계의 조직을 지지하는 세포로, 뇌와 척수의 내부에서 신경세포에 필요한 물질을 공급하고 신경세포의 활동에 적합한 화학적 환경을 조성하는 기능을 하는 세포이다. 신경교세포에는 중추신경계의 핍지세포와 성상세포, 소교세포 등과 말초신경계의 유일한 신경교세포인 슈반세포가 있다. 신경의 축삭을 싸고 있는 슈반세포는 신경세포를 지지하는 역할을 할 뿐 아니라 신경의 재생에도 중요한 역할을 담당하고 있다. 신경의 재생에 관여하는 슈반세포의 역할을 열거하여 보면 다음과 같다. 첫째 신경 절단 후 원위부에서 축삭이 재생되어 올 때를 대비하여 번지 다발(bands of bungner)이라는 컬럼을 형성한다. 둘째 라미닌, 콜라겐 IV 등 신경축삭의 성장을 촉진시키는 역할을 하는 기저층을 분비한다. 셋째 NGF를 포함하여 여러 종류의 신경 영양인자들을 분비한다. 넷째 NGF 수용체가 표현된다. 위와 같은 기능을 가진 슈반세포는 우수한 재생 효과를 나타내고, 인체에 적용할 경우 비복신경 등 인체 기능에 큰 문제를 초래하지 않기 때문에 말초 신경 손상 시 재생을 위한 중요한 기능을 가지고 있다.[4-6,16-20]

신경 유도관으로의 흥미로운 연구대상으로 신경재생 촉진 물질을 함유한 천연재료로 창자를 구성하는 조직의 일부인 소장점막하조직(small intestinal submucosa, SIS) 이용은 말초 신경의 재생을 촉진하고 있다. 소장은 이미 알려진 바와 같이 우리 몸에서 뇌, 척수 다음으로 신경세포가 많이 존재하는 장기로 이곳에는 각종 신경 영양물질 또는 신경 성장물질이 존재하는 장기이다. 소장점막하조직은 세포가 없는 세포외기질로만 구성되어 생체 조직에 이식할때 세포면역에 의한 거부 반응이 거의 일어나지 않으며 또한 생체 내에 이식되었을 때 스스로 분해되는 성질을 가지고 있어 생체조직공학에 필요한 요소를 두루 갖추고 있다고 할 수 있다. 이는 말초 신경의 재생에 있어 다른 인공재료에 비하여 월등히 우수한 재료라 할 수 있다.[21-29]

본 연구에서는 신경재생에 중요한 역할을 하는 슈반세포를 순수분리하고 천연유래 고분자인 소장점막하조직을 사용하여 슈반세포를 파종한 조직공학적 지지체를 절단된 말초 신경에 이식하여 시간이 경과하면서 신경축삭이 연결되어 말초 신경으로의 역할을 복원하는 것이 목적이다.

실 험

슈반세포의 분리 및 배양. 슈반세포의 배양 방법 중 안전하고 쉬우면서 순수한 세포 분리가 가능한 Morrissey의 방법을 이용하였다. 먼저 Fischer 쥐의 대퇴부에서 좌골신경을 분리하여 PBS가 담겨있는 페트리디쉬에 담그고 상피를 벗겨내었다. 신경은 약 1 mm로 잘게 잘라서 배양액이 담겨있는 페트리 용기에 옮겨 놓았다. 3일에 한 번씩 배양액을 교체하고 7일에 한 번씩 새로운 용기로 신경조직을 옮겨주면서 5주 동안 배양하였다. 세포 배양액으로는 10% 우태아혈청(FBS, Gibco BRL, USA) 및 항생제(100 unit/mL 페니실린과 100 μg/mL 스트렙토마이신, Gibco BRL, USA)를 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, 고농도 글루코오스, Gibco BRL, USA)을 사용하였다. 이러한 방법으로 섬유아세포가 일차적으로 제거되면 신경조직을 수거하여 1.25 unit/mL 디스파제(Boehringer Mannheim, Germany)와 0.05% 콜라게나아제를 넣고 인큐베이터에서 6~10시간 동안 방치한 후, 파스퇴르 피펫을 이용해서 신경의 기질을 제거하고 단일세포로 분리하였다. 이 과정에서 얻어낸 슈반세포를 새로운 용기에 옮긴 후 섬유아세포의 수를 감소시키는 역할을 하는 포스콜린(Sigma Chem. Co., USA)을 배양액에 2 μM의 농도로 첨가하여 슈반세포의 순도를 높였으며, 성장 영양인자인 소 뇌하수체 추출물(Gibco BRL)을 20 μg/mL의 농도로 첨가하여 슈반세포의 증식을 높이고자 하였다.[17,19]

세포의 증식 양상 관찰 및 면역세포화학 염색. 배양된 슈반세포를 6웰에 분주한 3일 후에 세포증식양상을 육안관찰하기 위하여 위상차 현미경(Nikon TE-2000, Japan)으로 관찰하였다. 웰에 배양한 세포를 0.05% 트립신-EDTA(Gibco, BRL)으로 떼어낸 후, 배양슬라이드에 세포를 각각 2×10^4 cells씩 분주하여 상기의 배양액으로 배양한 후, PBS로 세척하고 10% 포르말린으로 세포를 고정하여 4 ℃에서 하루동안 보관하였다. 그리고 슈반세포의 여부를 알아보기 위해 슈반세포의 마커의 일종인 1 : 2000으로 희석한 rabbit anti-S-100 항체(Sigma Chem Co.)와 1 : 500으로 희석한 rabbit anti-GFAP(glial fibrillary acidic protein) 항체(DAKO Cytomation, Denmark)를 각각 처리하여 AEC 방법을 통하여 면역세포화학염색을 수행하였으며 상온에서 1시간 방치한 후, anti-rabbit immunoglobulin 항체를 첨가하여 다시 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 그 후 아비딘-바이오틴-퍼록시데이즈 복합체를 첨가하여 다시 상온에서 30분 방치하고 크로모젠으로 발색 여부를 판단하였다.[2,5,16,18]

SIS 분리 및 스폰지 제조. SIS를 분리하기 위하여 돼지의 공장에 있는 지방조직을 우선 제거하고, 물로 깨끗이 공장 안과 밖을 세척한 다음, 공장을 대략 10 cm 정도의 길이로 잘라서 식염수에 넣고 세척하였다. 잘라낸 공장을 집게와 손을 이용하여 물리적 힘을 가해서 바깥층에 있는 치밀층을 제거하고 다시 뒤집어서 점막 근육층을 제거하여 SIS 층만을 분리하였다. 이렇게 얻은 SIS를 마지막으로 다시 식염수로 세척하고, -80 ℃ 극저온 냉각기에 보관하였다. -80 ℃에서 보관한 SIS를 동결 건조한 뒤, 믹서기로 분쇄한 SIS를 동결 분쇄기를 이용하여 대략 20 μm 크기의 고운 분말로 만들었다. 제조된 SIS 분말을 3% 아세트산에 0.1% 펩신(Sigma Chem. Co.)을 함유한 용액에 1 및 2 wt% 첨가시켜 상온에서 48시간 동안 방치한 후 직경 30 mm의 자체 제작된 원형 몰드에 담고 이를 급랭 후 동결 건조시켜 스폰지 형태의 SIS를 얻었다. 제조된 SIS 스폰지는 각각 95% 에탄올(탈이온수 : 에탄올=5 : 95)에 EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide hydrochloride, Sigma Chem. Co.) 용액으로 24시간 동안 세척하고 경화와 세척이 끝난 SIS 스폰지는 급랭 후 재동결 건조하여 최종적으로 경화된 SIS 스폰지를 얻었다(Figure 1).[21-24,27]

SIS 스폰지에 슈반세포 부착도 실험. 세포 부착률은 MTT 분석법을 이용하여 관찰하였다. 제조된 SIS 스폰지에 슈반세포를 1×10^5개로 계산하여 파종 후, 3, 5, 7 및 14일째 MTT(3-[4,5-

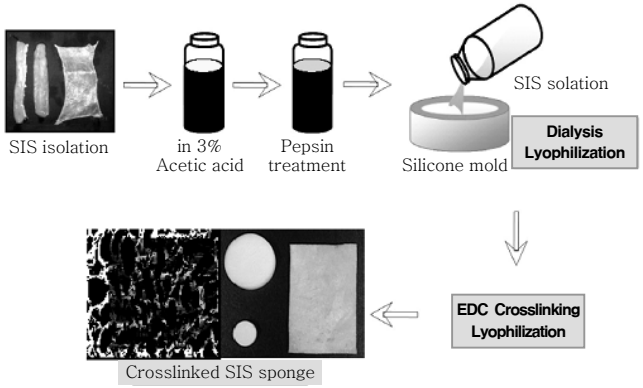


Figure 1. Schematic diagram of fabrication process of SIS sponge.[22,24]

dimethylthiazol−2yl] −2,5−diphenyltetrazolium bromide, Sigma Co.) 용액(50 μg/mL)을 100 μL씩 넣고 4 시간 동안 37 ℃ 인큐베이터에서 배양한다. 보라색 결정이 생성되면 PBS로 결정이 떨어지지 않게 3번 행구고 디메틸설폭사이드(Sigma Co.) 용액을 1 mL 넣어 결정이 완전히 녹을 때까지 교반하였다. 96웰 플라스크에 샘플을 100 μL씩 분주하고 ELISA 플레이트 리더(E−max, Molecular Device, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.[21,22]

이식재료의 제조. 제조된 SIS 스폰지는 에틸렌옥사이드 가스로 멸균하여, 튜브형태로 직경 5 mm, 두께 2.5 mm로 잘랐다. 실험군은 4개의 그룹으로 나누어 동일한 평가방법을 통하여 실험을 진행하였다. 대조군으로 손상되지 않은 말초 신경 모델(Control I, n=2)과 손상된 말초 신경에 SIS 스폰지와 슈반세포를 넣지 않은 모델(Control II, n=9)을 만들었으며, 실험군으로 SIS 스폰지만 넣은 모델 (Group I, n=9)과 SIS 스폰지와 슈반세포를 넣은 모델(Group II, n=9)을 제조하였다. 본 연구에서 사용한 슈반세포는 2대 계대 배양 후 3 계대째의 세포를 2×10^6 세포로 계산하여 SIS 스폰지에 파종하였다.

수술 절차. 말초 신경 손상 모델로 사용된 29마리의 F 344 Fischer 쥐는 동종간의 면역반응이 없어 세포치료 연구에 매우 유용한 동물로, 말초 신경 재생 연구에 사용된다. 5주된 암컷 Fischer 쥐를 케타민과 럼푼을 1 : 1로 혼합한 마취제로 마취시켰다. 그런 후 대퇴부의 피부를 절개한 후 근육 분리 절개를 하여 좌골신경을 드러내어(Figure 2(a)), 드러난 좌골신경 5 mm를 제거한다(Figure 2(b)). 그리고, Group I과 Group II는 몸쪽과 말단의 제거된 신경 사이에 5 mm의 제조된 SIS 스폰지를 넣고, 4−0 Dexon 봉합사를 이용하여 신경과 스폰지를 연결하는 신경 외막 봉합을 한다(Figure 2(c)). Control II는 제거된 신경 사이에 아무런 처리를 하지 않고 근막 봉합을 실시하였다. 근막 봉합은 신경 외막 봉합사와 동일한 봉합사를 이용하였고, 피부는 Nylon 5−0 Dermalon 단사로 봉합하였다. 말초 신경 손상을 입은 쥐는 각별한 주의와 관리가 필요하기 때문에 수술 후에는 깨끗한 케이지와 새 베딩으로 옮기고 바닥을 따뜻하게 해주거나 열을 발산하는 적외선 광원으로 따뜻하게 해 주었다.[6,8,14,15,30]

조직학적 평가. 각각의 그룹은 수술 1, 2주 및 4주 후 희생시켜 재생된 신경을 적출한다. 적출된 신경은 24시간 동안 10% 포르말린에 고정시키고, 고정된 지지체를 파라핀 블록으로 제작한 후에 3 μm

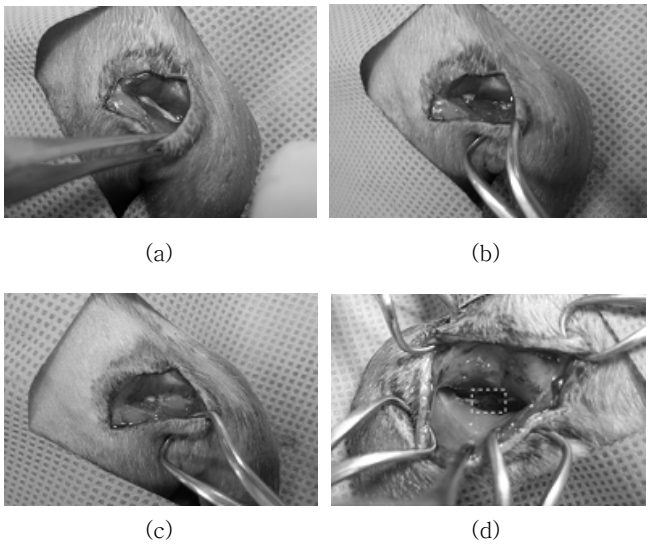


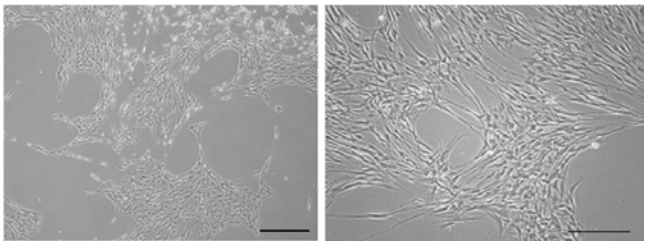
Figure 2. (a) The untreated contralateral sciatic nerve, (b) the sciatic nerve was exposed, and a 5 mm nerve segment was completely removed, (c) the proximal and distal nerve stumps were inserted 5 mm into the SIS sponge and held in place, with two epineurial sutures using 4−0 Dexon, and (d) after 4 weeks of implantation, the SIS sponge were almost completely degraded, and exposed the regenerated nerve inside.

로 자른 후 슬라이드 글라스에 고정한다. 조직학적 평가를 하기 위한 가장 기본적인 염색법인 H&E 염색은 세포의 핵에 특이적으로 염색이 되는 hematoxylin과 세포질에 염색이 되는 eosin을 이용한 염색법으로 핵과 세포질의 성상을 파악할 수 있게 하여 전체적인 형태를 관찰하였다.[1,3,7,9] 그리고 신경 세포를 관찰하기 위해 신경 아교 세포에 특이적으로 발현하는 1 : 2000으로 희석한 rabbit anti−S−100 항체(Sigma Chem Co.,)와 1 : 500으로 희석한 rabbit anti−GFAP 항체(DAKO, USA)로 처리하여 확인할 수 있었다. 뉴런은 1 : 50으로 희석한 mouse anti−Neurofilaments 항체(NF, Seytek, USA)를 조직 처리하여 확인할 수 있었다. 조직학적 평가를 위한 염색 방법도 면역 세포 화학적 염색과 동일한 방법인 AEC 방법을 통하여 발현 여부를 확인하였다.[5,18]

결과 및 토론

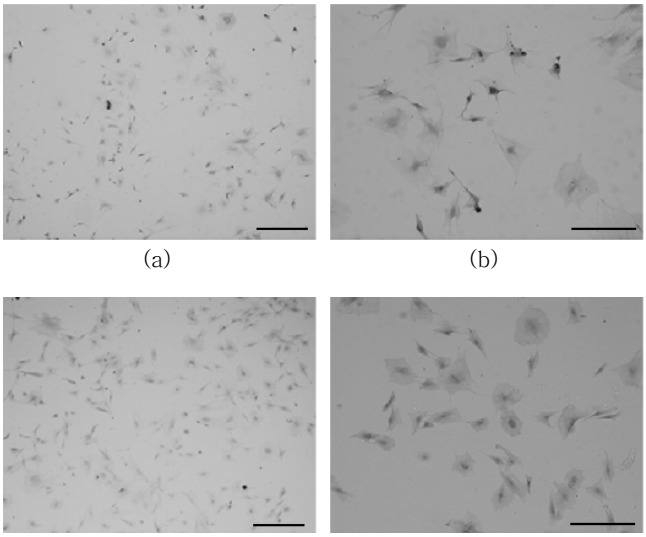
슈반세포의 육안적 증식 양상 관찰. 전술한 세포 분리의 방법을 이용하여 순수한 슈반세포를 얻을 수 있었다. 세포 분리의 각 단계를 거치면서 섬유아세포를 제거하여 배양한 결과 95% 이상의 순도를 확인하였다. 이렇게 순수 배양된 슈반세포의 성장 형태를 알아보고자 3일 동안 6웰에 배양하여 위상차 현미경으로 세포의 증식을 확인한 결과, 배양된 슈반세포는 방추형 모양의 형태를 보였다(Figure 3).

슈반세포의 면역세포화학염색 관찰. 슈반세포를 확인하기 위하여 슈반세포에서 발현되는 특정 단백질인 S−100 단백질과 GFAP 단백질로 면역세포화학염색을 실시한 결과, 섬유아세포에서는 단백질이 발현되지 않았고(Figure 4), 슈반세포는 S−100 단백질과 GFAP 단백질이 붉은 색으로 강하게 발현됨을 확인하였다. 그리고 슈반세포



(a) (b)

Figure 3. Phase-contrast micrograph demonstrating a spindle-shaped morphology of Schwann cells *in vitro* (Scale bar (a) 500 μm, (b) 250 μm).



(a) (b)

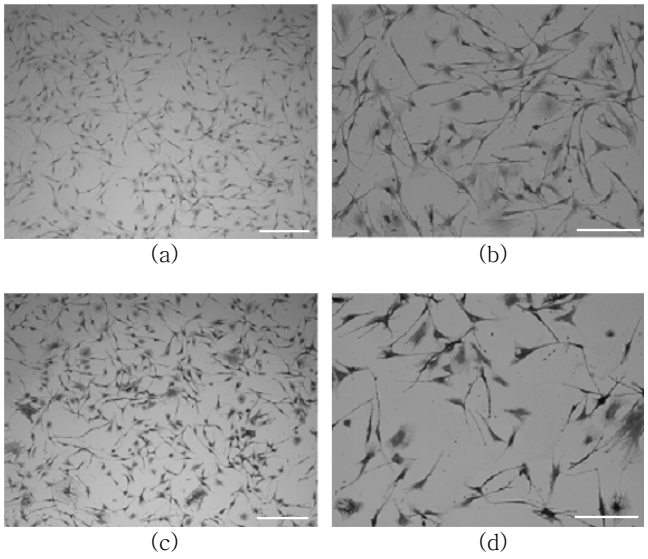
(c) (d)

Figure 4. Microphotographs of immunostaining of fibroblast with anti-GFAP protein antibody(a, b) and anti-S-100 protein antibody(c, d). Fibroblast were uniformly negative for GFAP and S-100 as compared with Schwann cell(Scale bar (a, c) 500 μm, (b, d) 250 μm).

들은 규칙적으로 배열되어 있고, 긴 타원형의 더욱 짙게 염색된 슈반세포의 핵도 관찰되었다(Figure 5).

SIS 스폰지에 슈반세포 부착도. Figure 6은 SIS 스폰지에 대한 슈반세포의 반응을 살펴보고자 3, 7, 14 및 21일의 세포부착도 및 증식도를 알아본 것이다. 부착도와 증식도의 정성적인 분석은 세포가 시료와 접촉한 특성 시간 후에 세포에 대한 MTT 분석을 수행함으로써 이루어 졌다. 슈반세포의 성장도를 보면, 3일 배양 후 측정한 MTT 결과, 시간이 지남에 따라 세포수가 점차적으로 증가함을 확인할 수 있었으며, 7일에서 14일로 지남에 따라 세포 분화가 이루어지면서 세포 성장률이 조금 지체되었지만 14일 이후에는 성장이 급격한 속도로 증가함을 알 수 있었다. 이 결과로부터 SIS 스폰지 내에서 슈반세포가 잘 성장하고 생존함을 확인할 수 있었다.

조직화학염색 평가. Figure 7은 SIS 스폰지가 조직공학적 말초신경 재생에 도움을 주는지를 관찰하기 위해 이식한지 4주가 지난 후 조직 형성 정도를 H & E 염색을 실시하여 관찰한 결과로, 슈반세포를 포함한 Group II(d)에서는 Control I(a)와 유사한 모습으로



(a) (b)

(c) (d)

Figure 5. Microphotographs of immunostaining of Schwann cells with specific anti-GFAP protein antibody(a, b) and anti-S-100 protein antibody(c, d). Cells exhibit stain brightly for GFAP and S-100 (Scale bar(a, c) 500 μm, (b, d) 250 μm).

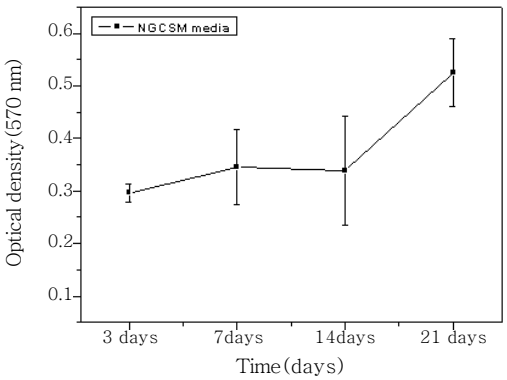
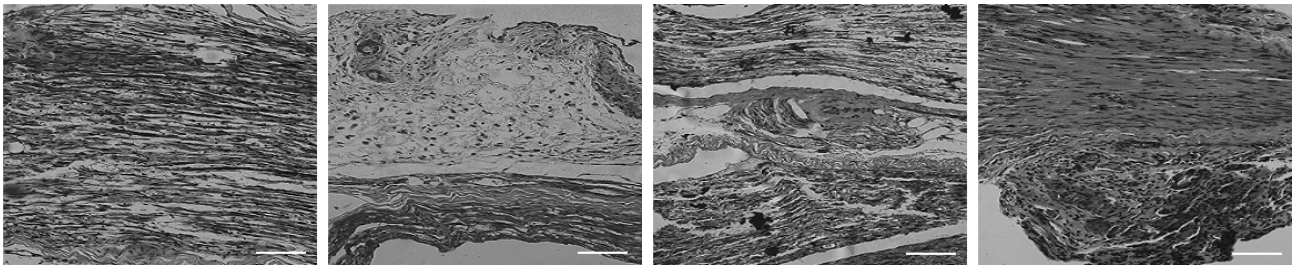


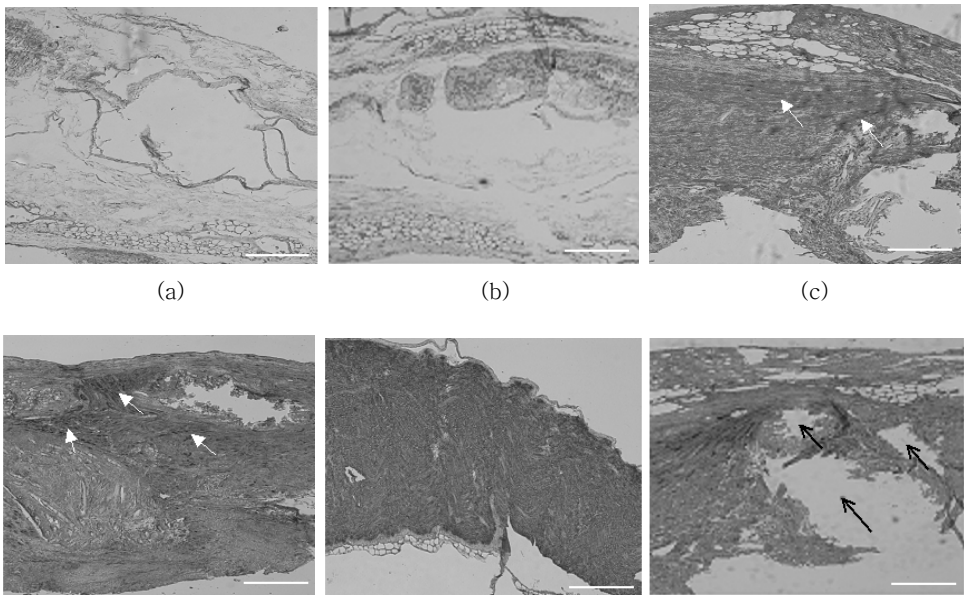
Figure 6. Schwann cells adhered on SIS sponge by MTT assay (n=3).

Control II와 Group I 보다 많은 신경 재생이 관찰되었고, 네트워크를 형성하고 있었다. 이는 슈반세포에서 분비된 사이토카인이나 여타의 분자들의 자극에 의해서 말초 신경 재생에 영향을 준 것으로 사료된다. 말초 신경 손상 1주 후, Group I과 Group II에서 신경외막의 재생과 소수의 작은 미세소관과 그물상의 가는 신경 미세 섬유들이 관찰되었고 신경 외막을 따라 S-100 단백질이 양성반응을 나타내었다(Figure 8(a),(b)). 수술 2주 후, NF 반응 결과 신경섬유의 재생과 정상상태의 신경조직들이 많이 관찰되었으나 아직도 완전히 회복된 상태는 아니었다(Figure 10(a),(b)). 하지만 4주 후, S-100, GFAP 및 NF 면역조직화학염색 결과, 손상된 말초 신경이 1주, 2주보다 더욱 많이 재생되었음을 육안으로도 확인할 수 있었고, Control II(Figure 8(f), 9(b), 10(f))는 손상된 부위에 재생이 완전히 이루어지지 않아 빈 공간을 많이 발견할 수 있었지만, Group I(Figures 8(c), 9(c), 10(c))과 Group II(Figures 8(d), 9(d), 10(d))는 주변 조직과의 융합이 우수함을 확인할 수 있었다. 이는 생체내에 이식한 SIS



(a) (b) (c) (d)

Figure 7. Photographs of histochemical staining for H&E (after 4weeks): (a) Control I (uninjured model), (b) Control II (blank model), (c) Group I (with scaffold only model), and (d) Group II (with scaffold and cell model) showing many regenerating clusters consisting of myelinated(arrows) nerve fibers. The axoplasm and myelin sheaths are well preserved (Scale bar 100 μm).



(a) (b) (c)

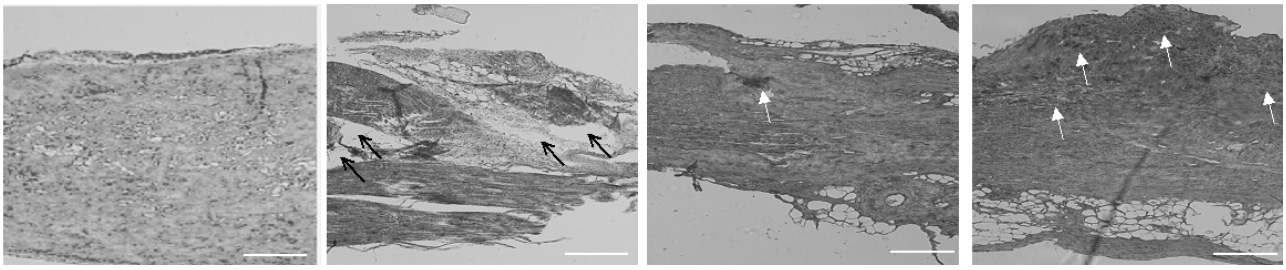
(d) (e) (f)

Figure 8. Immunostaining for anti-S-100 protein antibody on the parts of regenerating nerve at the midline of the conduit. At 1 weeks post-operatively, (a) Group I (with scaffold only model), (b) Group II (with scaffold and cell model). At 4 weeks post-operatively, (c) Group I (with scaffold only model), (d) Group II (with scaffold and cell model), (e) Control I (uninjured model), and (f) Control II (blank model). White arrows show the positive response and black arrows show the damaged cavity (Scale bar 250 μm).

스폰지가 신경 유도관으로의 적절한 역할을 수행하고, 세포들이 SIS 스폰지의 다공안으로 이동하여 SIS 스폰지에 들어있는 각종 신경 영양물질 또는 신경 성장물질이 신경섬유를 형성하는 것에 도움을 주는 것으로 사료된다. 그리고 Group II는 Group I과 Control II에 비해 Control I(Figures 8(e), 9(a), 10(e))과 유사하게 정상에 가까운 신경섬유 단면구조와 심경섬유를 형성하고 있는 것을 관찰되었다. 신경섬유는 주위의 신경외막에 의해 둘러싸이면서 규칙적인 다발을 형성하고 있는 것이 관찰되었고, 신경섬유 주위에 모여 있는 분화한 슈반세포의 핵으로 보이는 부분의 세포질 위에 뚜렷한 양성반응을 보이는 세포들이 다수 나타났으며 작은 신경섬유 주위의 슈반세포의 핵에도 반응이 나타났다. 정상적인 상태로 회복속도가 빠른 결과를 보인 것은 시간이 경과함에 따라 슈반세포가 신경재생에 관여하여 신경재생과정에 필요한 신경 영양 인자 자극에 영향을 끼친 것으로 사료된다.[5,6,16] 즉, 이식한 슈반세포는 근위부로부터 축삭을 따라 손상된 부위로 이주해 와서 슈반세포의 세포질 돌기가 기저막으로 자라 슈반세포의 세포주를 형성하여 진행되면서 재생 축삭은 개개의 신경섬유로 분리되어 축삭의 유수화가 진행된 것으로 보인다. 그래서 신경 영양성 인자 발현에 관여하여 새롭게 형성되는 여러 가지 세포와 함께 새로운 전구세포를 형성시켜 손상된 말초 신경의 기능회복을 촉진시키는 것으로 사료된다.

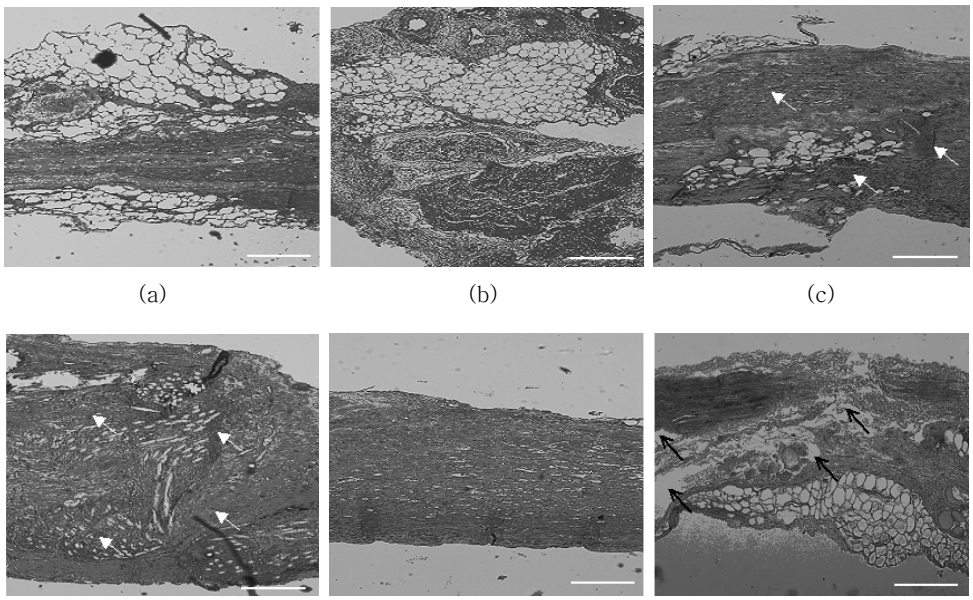
결 론

본 연구에서는 천연 생체 재료인 SIS를 스폰지 형태로 제조한 조직공학적 지지체와 슈반세포를 이용하여 완전히 절단되어 손상된 말초 신경의 재생에 응용하고자 하였다. 본 연구에서 채택한 좌골신경



(a) (b) (c) (d)

Figure 9. Immunostaining for anti-GFAP protein antibody on the parts of regenerating nerve at the midline of the conduit. longitudinal section of (a) Control I (uninjured model), (b) Control II (blank model), (c) Group I (with scaffold only model), and (d) Group II (with scaffold and cell model) at 4 weeks after operation. White arrows show the positive response and black arrows show the damaged cavity (Scale bar 250 μm).



(a) (b) (c)

(d) (e) (f)

Figure 10. Immunostaining for anti-NF protein antibody on the parts of regenerating nerve at the midline of the conduit. At 2 weeks post-operatively, (a) Group I (with scaffold only model), (b) Group II (with scaffold and cell model), (c) Group I, (d) Group II, and (e) Control I (uninjured model), and (f) Control II (blank model) at 4 weeks after operation sciatic nerve. White arrows show the positive response and black (Scale bar 250 μm).

모델은 단순 절단이 아닌 5 mm의 신경결손을 만들었다. 그리고 우수한 재생 효과를 나타내는 슈반세포를 순수 배양하여 실험에 응용하였는데, 이는 액체 상태의 슈반세포 부유액을 넣는 경우 주변조직으로 세포 부유액이 새어 원하는 부위에 세포조직을 유지시킬 수 없기 때문에 이를 막기 위하여 SIS를 스폰지를 사용하였다. 이번 실험 결과 SIS 스폰지는 신경 유도관으로 신경 영양물질 또는 신경 성장 물질이 존재하기 때문에 말초 신경의 재생을 촉진하고, 생체 조직에 이식할 때 세포면역에 의한 거부 반응을 일으키지 않는다는 것을 확인했고, 조직공학적 결과로써 우수한 특성을 가짐을 보여주고 있었다. 좌골 신경에 손상을 주었을 경우 신경 섬유는 시간이 경과할수록 증가하고 재생된 신경 정도도 시간이 경과함에 따라 증가하는 것을 보였다. 그리고 8주 후 아무것도 이식하지 않은 군에서는 조직의 형성이 미미하였지만, SIS 스폰지만 이식한 군은 이식하지 않은 군보다 신경 재생이 더 많이 진행되었고 조직이 형성되었다. 하지만 이식 부위를 완전히 연결하지 못함을 확인하였다. SIS 스폰지와 슈반세포를 함께 이식한 군은 손상을 받지 않은 군과 별 차이가 없을 정도로 수초화가 급격히 증가하는 양상을 보여 주었고, 거동 시 손상을 받지 않은 군과 별 다른 차이점을 볼 수 없을 정도로 빠른 회복을 보여주었다. 이는 SIS 스폰지를 통하여 재생에 필요한 물질을 적절히 공급하고, 차단된 수송을 원활히 일어나게 한 것으로 추정된다. 그리고 슈반세포가 말초 신경 손상시 자연 회복을 촉진시키는 효과가 있으므로, 신경 손상 시 슈반세포를 임상에 적용한다면 신경 재생을 유도할 수 있을 것이라고 사료된다. 따라서 본 연구에서 사용한 같은 방법을 통해 손상된 척수신경재생을 위한 연구와 SIS 스폰지의 다공이 신경 재생에 있어 세포 성장 방향에 끼치는 영향을 확인할 예정이다.

감사의 글 : 본 연구는 과학기술부 프린티어 사업과 세포응용사업단(SC3100)의 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. S. K. Kim, K. D. Hong, S. H. Kim, M. S. Kim, G. Khang, I. W. Lee, C. W. Han, H. K. Lee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 130 (2005).
2. E. J. Kim, J. H. Song, M. S. Kim, J. M. Rhee, C. H. Han, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 41 (2004).
3. S. K. Kim, K. D. Hong, J. W. Jang, S. J. Lee, M. S. Kim, G. Khang, I. W. Lee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 149 (2004).
4. C. Girard, A. Bemelmans, N. Dufour, J. Mallet, C. Bachelin, B. Nait-Oumesmar, A. B. Evercooren, and F. Lachapelle, *J. Neurosci.*, **25**, 7924 (2005).
5. S. Shimizu, M. Kitada, H. Ishikawa, Y. Itokazu, S. Wakao, and M. Dezawa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **359**, 915 (2007).
6. G. Keilhoff, A. Goihl, F. Stang, G. Wolf, and H. Fansa, *Tissue Eng.,* **12**, 1451 (2006).
7. C. J. Chen, Y. C. Ou, S. L. Liao, W. Y. Chen, S. Y. Chen, C. W. Wu, C. C. Wang, W. Y. Wang, Y, S, Huang, and S. H. Hsu, *Exp. Neurol.*, **204**, 443 (2007).
8. S. Y. Hou, H. Y. Zhang, D. P. Quan, X. L. Liu, and J. K. Zhu, *Neuroscience,* **140**, 101 (2006).
9. K. Katarzyna, M. Wieslaw, L. B. Magdalena, T. Zofia, M. K. Izabela, S. Wojciech, J. S. Halina, and L. K. Joanna, *Microsurgery*, **26**, 579 (2006).
10. M. Wiberg and G. Rereghi, *Surg. Technol. Int.,* **11**, 303 (2003).
11. J. W. Fawcett and R. J. Keynes, *J. Neurosurg.,* **65**, 354 (1986).
12. H. Fansa and G. Keilhoff, *Neurol. Res.*, **26**, 167 (2004).
13. Y. Nishiura, J. Barandt, A. Nilson, M. Kanje, and L. B. Dahlin, *Tissue Eng.*, **10**, 157 (2004).
14. F. R. Pereira Lopes, L. C. Moura Campos, J. D. Correa Jr., A. Balduino, S. Lora, F. Langone, R. Borojevic, and A. M. Blanco Martinez, *Exp. Neurol.*, **198**, 457 (2006).
15. J. Y Chang, J. H. Lin, C. H. Yao, J. H. Chen, T. Y. Lai, and Y. S. Chen, *Macromol. Biosci.,* **7**, 500 (2007).
16. J. Caddick, P. J. Kingham, N. J. Gardiner, M. Wiberg, and G. Terenghi, *Glia*, **54**, 840 (2006).
17. C. M. Kim, S. M. Kim, S. H. Kim, I. W. Lee, M. S. Kim, J. M. Rhee, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **4**, 60 (2007).
18. C. Marchesi, M. Pluderi, F. Colleoni, M. Belicchi, M. Meregalli, A. Farni, D. Parolini, L. Draghi, M. E. Fruguglietti, M. Gavina, L. Porretti, A. Cattaneo, M. Battistelli, A. Prelle, M. Moggio, S. Borsa, L. Bello, D. Spagnoli, S. M. Gaini, M. C. Tanzi, N. Bresolin, N. Grimoldi, and Y. Torrente, *Glia*, **55**, 425 (2007).
19. K. Thomas, K. Naomi, and P. B. Richard, *J. Neurosci.*, **11**, 2433 (1991).
20. A. Hoke, R. Redett, H. Hameed, R. Jari, C. Zhou, Z. B. Li, J. W. Griffin, and T. M. Brushart, *J. Neurosci.*, **11**, 2433 (1991).
21. M. S. Lee, J. C. Yang, S. H. Kim, I. B. Song, M. S. Kim, G. Khang, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **30**, 259 (2006).
22. K. S. Park, C. M. Jin, S. J. Yun, K. D. Hong, S. H. Kim, M. S. Kim, J. M. Rhee, G. Khang, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **29**, 501 (2005).
23. S. H. Kim, H. W. Shin, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, and G. Khang, *Biomater. Res.*, **8**, 143 (2004).
24. H. W. Shin, S. H. Kim, J. W. Jang, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **28**, 194 (2004).
25. G. Khang, M. S. Kim, B. H. Min, I. W. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **3**, 376 (2006).
26. G. Khang, P. Shin, and I. Kim, *Macromol. Res.*, **10**, 158 (2002).
27. S. H. Kim, S. J. Yun, J. W. Jang, M. S. Kim, G. Khang, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **30**, 14 (2006).
28. Y. Su, B. F. Zeng, C. Q. Zhang, K. G. Zhang, and X. T. Xie, *Brain Res.*, **1145**, 41 (2007).
29. M. S. Kim, H. H. Ahn, Y. N. Shina, M. H. Cho, G. Khang, and H. B. Lee, *Biomaterials*, **10**, 1016 (2007).
30. A. l. Luis, J. M. Rodrigues, J. V. Lobato, M. A. Lopes, S. Amado, A. P. Veloso, A. D. Silva, S. Raimondo, S. Geuna, A. J. Ferreira, S. P. Varejao, J. D. Santo, and A. C. Maurcio, *Biomed. Mater. Eng.,* **17**, 39 (2007).