

골격근을 이용한 흰쥐 심장성형 후 심장을 지배하는 중추신경로에 관한 연구

변 경 희, 고 선 영, 김 재 우, 이 봉 회*

제주대학교 의과대학 해부학교실 및 제주대학교 의과학연구소

CNS innervation to the heart after skeletal muscle transplantation in the rat

Kyung-Hee Byun, Sun-Young Ko, Jae-Woo Kim, Bong-Hee Lee*

Department of Anatomy and Neurobiology, Institute of Medical Science,
Cheju National University College of Medicine, Jeju 690-756, Korea

Abstract

The congestive heart failure is known as one of the most popular cause of human death. The purpose of this study were to identify the CNS pathway innervating heart after reconstruction using latissimus dorsi muscle by using the pseudorabies virus injection into the hippocampus after entorhinal cortex lesions.

The pseudorabies virus labelled neurons were distributed at several different nuclei including paraventricular nucleus. No significant morphological changes were observed in the CNS heart innervation after reconstruction. These data suggested that the CNS innervation showed no morphological changes throughout the whole brain areas after heart reconstruction.

Key words : Heart, CNS pathway, pseudorabies virus

서론

울혈성 심부전 (Congestive Heart Failure)은 서구 사회에서 매우 중대한 사망원인으로 나타나는 질환이다. 서구의 식생활에 익숙해진 오늘날의 우리 나라에도

이 질환으로 인한 사망자 수는 꾸준히 늘어가고 있는 것이 사실이다. 우리 나라의 사망원인 분포에서도 울혈성 심부전에 의한 사망자 수가 날로 증가하고 있는 추세이다. 이러한 치명적인 질환에 대한 완벽한 치료법은 아직 개발되어 있지 못하다. 현재까지 시도되어온 치료법과 그 한계는 아래와 같다.

1) 약물요법 (Pharmacotherapy): 단기적인 증상완화에는 효과가 있으나 심부전으로의 이행을 막지는 못한다.

· 본 연구는 제주대학교 발전기금의 지원에 의하여 이루어진 것임.

*Corresponding author: bhlee1@cheju.ac.kr

2) 심장이식 (Cardiac Transplantation): 가장 이상적인 방법이나 공여자 (Donor)가 제한되어 있어서 그 혜택을 받는 환자는 제한적이다.

3) 이종심장이식 (Xenotransplantation): 돼지심장 등을 이식하는 방법으로 공여자의 부족을 해결할 수 있는 방법이나 면역학적 문제와 사람과 다른 종에만 특이하게 존재하는 바이러스 등의 문제가 미결인 상태이다. 그리고 윤리적인 문제 또한 남아 있다.

4) 인공심장 (Artificial Heart): 보조 심장과 완전히 식형 인공심장 등이 연구되고 있으며 보조심장 중에는 이미 상품화되어 있는 것이 있다. 혈전과 안전성이 가장 큰 문제로 제기되고 있으나 가격이 다른 치료법에 비하여 싸고 기술의 발전 속도로 비추어 가까운 미래에 보편화될 것으로 예상하고 있다.

5) 조직공학심장 (Tissue Engineering Heart): 배아에서 심장만을 선택적으로 배양하여 공여장기의 부족 상태를 해결하려는 시도로서 아직은 시도단계에 있는 기술이다. 그리고 이 또한 기술적 한계와 함께 윤리적 문제가 남아 있다.

6) 세포이식 (Cell Therapy): 심근 세포나 평활근세포, 태아 심근세포 등을 심장 경색 영역에 주입하면 기존의 심장 근육을 대체하는 조직이 발생하고 심근의 확장을 막아서 심장의 기능을 호전시키는 기술이다. 아직은 초기 연구단계이나 조직공학심장과 함께 각광받는 연구분야이다.

7) 수술요법 (Surgical Therapy): 가장 많이 이용되는 방법이나 외과수술의 특성상 그 적용대상 환자가 많지 않고 숙련된 기술을 가진 의사가 요구된다.

본 연구의 목표는 골격근육을 심장에 이식하는 수술요법 시에 이식된 골격근의 뇌 속에서 시작되는 중추 신경지배 여부를 확인하고자 하는데 있다. 이는 이식된 골격근이 단순히 생존만 하는 것인지 중추신경지배를 통하여 조절되는 것인지를 확인하여 수술요법을 통한 심장치료에 기초자료를 제공하고자 한다. 골격근육을 심장에 이식하여 손상된 심장조직에서의 골격근육의 형태적 및 기능적인 재생을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

체중 250 gm 내외의 성숙한 Sprague-Dawley 랫드 30마리를 암수 구별없이 사용하였다. 실험동물은 외부와 격리된 20~25°C의 온도를 유지한 동물 사육장에서 사료와 물을 자유로이 공급하며 사용하였다.

2. 골격근육이식

실험동물들은 실험 직전에 기관과 반지연골 (cricoid cartilage)사이를 절개하여 흡입마취하고 및 인공호흡기관을 삽입한 후 고정하였다. 완전히 마취와 고정이 끝난 흰쥐는 앞다리 아래의 피부를 절개하여 넓은등근 (Lastissimus dersimuscle)을 떼어낸 후 생리식염수에 담가두었다. 또 뒷다리의 위부분의 피부를 절개하여 큰둔부근 (Gluteus maximus)을 떼어낸 후 생리식염수에 담가두었다. 그후 가슴의 피부를 절개하고 흉골을 절개한 후 호흡이 잘 되고 있나를 확인하고 심장막 (pericardium)을 절개하고 심장을 노출시킨 후 모스키토 검자를 이용하여 심장을 고정시킨 후 심장벽의 일부를 가위로 떼어내고 빈자리에 골격근을 이식하였다. 이식이 끝나면 빈주사 바늘 끝을 흉곽에 넣고 기흉을 방지하며 흉골을 봉합한 뒤 주사바늘을 빼고 피부를 봉합하였으며 인공호흡기관을 제거한 후 목의 피부를 봉합하고 주의 깊게 관찰한다.

3. 조직처리

이식 후 2주에서 2개월 후에 골격근육이 생존하였는가 또 심장근육으로 형태학적으로나 기능적으로 적응하는지의 여부를 검증하기 위하여 실험동물들을 Ketamine hydrochloride (케타라, 50 mg/ml)와 Xylazine

(롬폰, 20 mg/ml)을 각각 체중 100 gm당 0.15 ml 및 0.05 ml씩 섞은 용액을 주사하여 마취시킨 뒤 가슴을 열고 심장을 떼어내었다. 이식된 골격근육부위를 중심으로 심장조직을 절제하여 4% paraformaldehyde-lysine-periodate를 용액에 담가 고정하였다. 4시간이 지난 후 심장조직은 0.1 M PB로 1시간 동안 수세하고 20% phosphate buffered sucrose 용액에 12시간 내지 48시간 동안 담가 보관하였다. 심장조직들은 동결 절편기를 이용하여 약 10 μ m 두께의 절편을 만들어 6-well plate에 순위대로 보관하며 차례대로 형태학적인 검증을 시행하였다.

4. 형태학적인 검증

검증을 위하여 통상적인 Hematoxylin & Eosin 염색과 Van Gieson에 염색을 시행하였다. 또한, fast, slow myosin에 대한 면역조직화학염색을 시행하는데 염색은 1:10,000으로 희석한 1차 항체에 조직절편들을 담가 실온에서 12시간 내지 24시간 동안 반응시켰다. 이때 1차 항체의 희석은 0.1M PB에 1% normal goat serum (Vector laboratories, Inc.)과 0.3% Triton X-100 (Sigma)이 섞여 있는 것을 사용하였다. 그 후 조직절편들은 실온에서 15분간 2회 0.1 M PB로 세척하며 2차 항체인 1:200으로 희석된 biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Inc.)에 실온에서 1시간 가량 반응시켰다. 다시 15분간 2회의 0.1 M PB 수세과정을 거친 후 peroxidase가 표지된 ABC 용액에 담가 실온에서 1시간 가량 반응시켰다. 그 후 다시 0.1 M PB에 DAB를 녹인 용액에서 5분간 반응시킨 후 과산화수소를 0.005% 되게 첨가하여 갈색의 발색반응을 약 5분간 시행하였다. 반응이 끝난 조직들은 다시 0.1 M PB로 여러 차례 수세하고 gelatin이 입혀진 슬라이드 위에 차례대로 얹어 4°C에서 12시간 이상 건조시켰다. 그 후 통상적인 방법에 따라 에탄올과 xylene의 탈수와 투명화를 거친 후 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

5. 중추신경로 조사

1) 바이러스

Pseudorabies 바이러스중 Bartha strain (PRV-Ba라 함)은 본 실험실에서 증식 시켜 사용하였다. 이 strain은 porcine kidney fibroblast (PK15-cell)에서 키운 것을 냉동 (-70 °C)보관하며 주사직전에 녹여 신선한 것을 사용하였다. 1차 항체는 이 virus strain을 acetone-inactivation된 것을 토끼에 주사하여 얻은 rabbit anti-PRV-Ba를 제작하여 사용하였다.

아직 사람에서 이 virus의 감염보고는 없었으나 만일의 경우를 생각하여 실험과정 중 모든 실험기와 실험동물은 외부와 분리하여 접촉을 피하고 실험 연구자는 반드시 1회용 가운과 모자, 마스크 및 장갑을 사용하여 사용 후는 모두 소각 처리하였다. 또한 모든 수술도구는 clorax로 소독하여 보관하는 등 만일의 사고에 대비하여 최대의 감염방지 노력을 하였다.

2) 바이러스주입

실험동물들은 실험 직전에 Ketamine hydrochloride (cathemine, 50 mg/ml)와 Xylazine (롬폰, 20 mg/ml)을 각각 체중 100 g 당 0.15 ml, 및 0.05 ml씩 섞은 용액을 주사하여 마취시킨 뒤 흉곽을 열고 심장을 노출시켰다. 이식이 육안으로 확인된 골격근에 10 μ l의 pseudorabies 바이러스를 주입하였다. 그 후 서서히 주사바늘을 후퇴하며 제거한 후 생리식염수로 수술 부위를 약 5-10회 세척해 낸 다음 피부를 봉합하고 주의 깊게 관찰하였다.

3) 조직처리

Pseudorabies 바이러스 주입후 약 3~5일의 생존기간을 준 다음 각 흰쥐들은 다시 동일 마취액으로 마취시키고 심장을 통하여 관류고정을 실시하였다. 관류고정은 먼저 0.1 M sodium phosphate buffer (PB)에

heparin (1000 IU/1000ml)을 섞은 용액을 10분간 관류 시키고 4% paraformaldehyde-lysine-periodate를 30분간 관류 시켰다. 관류고정이 끝난 후 대뇌, 소뇌 및 뇌 줄기 등을 적출한 다음 동일 고정액에 4°C에서 4시간 동안 담가 후고정을 시행하였다. 그 후 다시 0.1 M PB로 1시간 동안 수세하고 20% phosphate buffered sucrose 용액에 12시간 내지 48시간 동안 담가 보관하였다. 보관된 뇌조직들은 동결절편기를 (Cryotome, AO) 이용하여 약 30 μ m 두께의 관상연속절편을 만들어 6-well plate에 순서대로 보관하며 총 약 500장 정도의 조직절편을 free floating method로 면역조직화학염색을 시행하였다.

4) 면역조직화학염색

염색은 1:10,000으로 희석한 1차 항체에 조직절편들을 담가 실온에서 12시간 내지 24시간동안 반응시켰다. 이때 1차 항체의 희석은 0.1 M PB에 1% normal goat serum (Vector Laboratories, Inc.)과 0.3% Triton X-100 (Sigma)이 섞여 있는 것을 사용하였다. 그 후 조직절편들은 실온에서 15분간 2회 0.1 M PB로 세척하였으며 2차 항체인 1:200으로 희석된 biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Inc.)에 실온에서 1시간 가량 반응시켰다. 다시 15분간 2회의 0.1 M PB 수세과정을 거친 후 peroxidase가 표지된 ABC 용액에 담가 실온에서 1시간 가량 반응시켰다. 그 후, 다시 0.1 M PB로 15분간 2회 수세하고 나서 30 mg의 3,3'-diaminobenzidine를 150 ml의 0.1 M PB에 녹인 용액에서 5분간 반응시킨 후 과산화수소를 0.005% 되게 첨가하여 갈색의 발색반응을 약 5분간 시행하였다.

반응이 끝난 조직들은 다시 0.1 M PB로 여러 차례 수세하고 gelatin이 입혀진 슬라이드 위에 차례대로 얹어 4°C에서 12시간 이상 건조 시켰다. 그 후 통상적인 방법에 따라 에탄올과 xylene의 탈수와 투명화를 거친 후 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

결 과

1. 조직학적 관찰

흰쥐의 심장에 넓은등근 (Lastissimus dersimuscle)을 이식한 후 관찰한 결과 이식된 골격 근육들은 심장 근육사이에 퇴화없이 잘 부착되어 관찰 되었다.

Table 1. The distributions of PRV labeled cells in the brain after injection into the heart of the sham and reconstructed rats

Nucleus	PRV labeling	
	Normal	30 days after reconstruction
BST	+++	+++
DR	+++	+++
ENT	+++	+++
LM	++	++
LC	++	+++
MGm	+++	±
MGv	+++	++
MS	+++	++++
SFO	+	+
CSm	++	+++
TH	+++	-
PVN	++++	++++

The quantity of labeled cells were counted in each group of nucleus and presented as follows (-: not detection; ±: rare; +: a few; ++: moderate; +++: abundant; ++++: extremely rich)

Abbreviation: BST, Bed nucleus of stria terminalis; DR, Dorsal raphe nucleus; ENT, Entorhinal cortex; FN, Fastigial nucleus; LM, Lateral mammillary nucleus; LC, Locus ceruleus; MGv, Medial geniculate complex, ventral part; MS, Medial septal nucleus; PVN, Paraventricular nucleus; SFO, Subformical organ; CSm, Superior central nucleus raphe, medial part; TH, Thalamus.

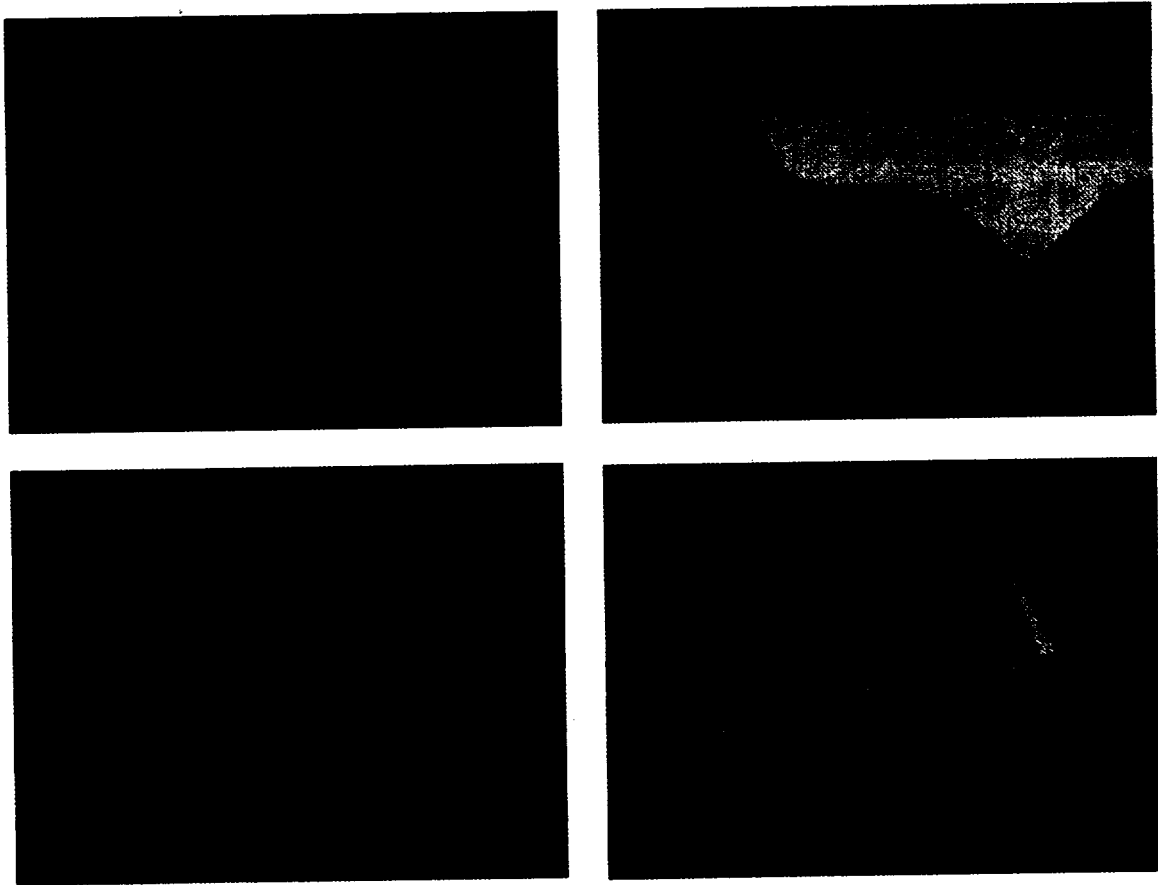


Fig. 1. Pseudorabies virus (PRV) labeled cells in the different brain areas after PRV injection into the heart of the rat. a, paraventricular nucleus; b, locus ceruleus; c, gigantocellular nucleus; d, raphe dorsalis.

2. 심장의 신경로

흰쥐의 심장에 pseudorabies 바이러스를 주입한 후 면역조직화학 염색을 시행한 결과 뇌실옆핵 (paraventricular nucleus)를 비롯한 여러 신경핵에서 양성반응이 나타났으며, 핵 종류에 따라 양성반응은 차이를 보였다 (Fig. 1, Table 1).

3. 심장 재건 후 중추신경로

심장 재건 후 30일 후에 흰쥐의 심장에 pseudorabies 바이러스를 주입한 결과 뇌실옆핵 (paraventricular nucleus)를 비롯한 여러 신경핵에서 양성반응이 나타났으며, 핵 종류에 따라 양성반응은 차이를 보였다 (Fig. 1, Table 1).

고 찰

심부전을 치료하기 위한 노력의 일환인 인공심장에 대한 연구는 1960년대부터 시작되었다. 1980년대에 기계식 심장이 등장하면서 그에 대한 연구가 주류를 이루게 되었다. 현재 개발된 기계식 심장은 크게 심실보조장치 (Ventricular Assist Device)와 완전이식형인 공심장 (Total Artificial Heart)의 두 종류가 있다.

심실보조장치 중 일부는 이미 미국 식품의약품안전청 (FDA) 의 허가를 받아서 임상시험 중에 있고 곧 상품화될 것이다. 양심실 보조장치는 현재는 심실 보조장치 2개를 이용하여 실험하고 있으나 일체형으로 개발되고 있는 것은 한국형 양 심실 보조 장치뿐이다. 그리고 완전 이식형 인공심장은 현재 내구성

시험이 진행 중이며 2002년에는 FDA 승인을 받을 것으로 보인다. 대부분의 인공심장들은 현재 거의 완성단계에 있다고 할 수 있으며 한국형 인공심장도 현재 임상시험을 준비 중에 있다.

세포이식에 대한 연구는 1990년대 초반에 근원세포(myoblast)가 분화하고 모 근관(myotube)과 융합한다는 것이 밝혀지면서 시작되었다. 성장한 도롱뇽의 심방조직을 상처 입은 심장부위에 부착했을 때 이식한 조직이 수축 가능한 조직으로 재편되는 것도 보여 졌다. 최근의 연구결과들은 근육 근원세포(skeletal myoblast)나 심근세포들이 심장에 이식되었을 때 기존의 세포들과 잘 결합하며 안정적으로 정착하는 것을 알게 되었다. 특히 태아의 심근세포는 기존 세포들과 세포간의 결합기관까지 형성하는 것이 보고되고 있다. 이러한 연구들은 초기의 쥐 모델에서 돼지 등과 같은 큰 동물들에게도 실험이 진행 중이다.

한편, 골격근육의 이식에 대한 연구는 크게 두 범위로 연구되고 있는데 골격근육을 성형하며 심장의 모형을 제작하고 이것을 심장 대신 혈액을 공급하게 하는 것 (1-4)과 심장의 주변을 골격근육으로 감싸서 전기자극을 가하여 수축시키는 방법 (5)이 보편적으로 이용되고 있다. 이렇게 현재까지 가장 보편적으로 이용되고 있는 골격근의 성형술에서 이식된 골격근의 신경지배에 관해서는 아직 조사 보고된 바가 없는 실정이다. 한편 신경연접은 이동이 가능하여 말초장기의 중추신경지배를 조사하기 위해 pseudorabies 바이러스가 근간에 사용되기 시작한 신경친화성 바이러스인 pseudorabies 바이러스는 종래에 사용된 신경추적자들의 한계점을 보완할 수 있다 (6). 즉 바이러스는 양방향 이동추적자이지만 축삭을 따라 이동하면서 바이러스가 증식되어 그 수가 증가될 뿐 아니라 연접을 쉽게 통과할 수 있다 (7, 8). 그리고 사람에서는 감염이 되지 않아 손쉽게 이용되며, PHA-L, WGA, FITC, TRITC 등을 이용한 다중염색을 통하여 신경전달물질의 변화와 신경로 추적에 널리 사용되고 있다 (9, 10). Pseudorabies 바이러스는 DNA를 갖는 Alpha Herpesviridae의 한 종류이며, 최근 10년간

여러 개의 시냅스를 통과할 수 있는 특징과 신경친화성 바이러스로서 사용도가 증가하고 있다 (11). Pseudorabies 바이러스는 심장, 말초근육, 위, 지라, 신장, 꼬리, 미주신경, 좌골신경, 소뇌겉질, 시상, 편도체 등의 말초신경계통과 중추신경계통에서 신경로를 구축하는데 신경추적자로서 많이 이용되고 있다 (12-16). 본 실험결과 심장 재건 후 30일 후에 흰 쥐의 심장에 pseudorabies 바이러스를 주입한 결과 뇌실옆핵(paraventricular nucleus)를 비롯한 여러 신경핵에서 양성반응이 나타났으며, 핵 종류에 따라 양성반응은 차이를 보였다. 이 때 정상적인 심장과의 신경로는 차이를 보이지 않아 골격근을 이용한 심장 성형은 매우 유용한 것으로 사료 되었다.

참 고 문 헌

1. Armenti FR, Bitto J, Macoviak A et al. Transformation of skeletal muscle for cardiac replacement. *Surg Forum* 1984;35:258-260.
2. Mannion JD, Acker MA, Hammond RL et al. Power output of skeletal muscle ventricles in circulation: short-term studies. *Circulation* 1987;76:155-162.
3. Mannion JD, Acker MA, Hammond RL, Stephenson LW. Four-hour circulatory assistance with canine skeletal muscle ventricles. *Surg Forum* 1986;37:211-2136.
4. Mocek FW, Anderson DR, Pochettino A et al. Skeletal muscle ventricles in circulation long-term: 191 to 836 days. *J Heart Lung Transplant* 1992;11:s334-s340.
5. Carpentier A, Chachques JC. Myocardial substitute with a stimulated skeletal muscle: First successful, clinical case. (letter) *Lancet* 1985;1:1267.
6. Lee BH, Lynn R, Lee HS et al. Calcitonin-gene related peptide of nucleus ambiguus motoneurons in the rat: viscerotopic organization. *J Comp Neurol*

- 1992;320:531-543.
7. Card JP, Rinaman L, Schwaber JS et al. Neurotropic properties of pseudorabies virus: uptake and transneuronal passage in the rat central nervous system. *J Neurosci* 1990;10:1976-1994.
 8. Card JP, Rinaman LM, Lynn RB et al. Pseudorabies virus infection of the rat central nervous system: ultrastructural characterization of viral replication, transport, and pathogenesis. *J Neurosci* 1992;13:2515-2539.
 9. Farkas E, Jansen ASP, Loewy AD. Periaqueductal gray matter input to cardiac-related sympathetic premotor neurons. *Brain Res* 1998;792:179-192.
 10. Deng C, Rogers LJ. Differential sensitivities of the two visual pathways of the chick to labelling by fluorescent retrograde tracers. *J Neurosci Meth* 1999;89:75-86.
 11. Card JP. Practical considerations for the use of pseudorabies virus in transneuronal studies of neural circuitry. *Neurosci Biobehavior Rev* 1998;22:685-694.
 12. Rotto-Perceland DM, Wheeler JG, Osorio FA, Platt KB, Lowey AD. Transneuronal labeling of spinal interneurons and sympathetic preganglionic neurons after pseudorabies virus injections in the rat medial gastrocnemius. *Brain Res* 1992;574:291-306.
 13. Jasmin L. Pseudorabies virus as a neuroanatomical tracer. *J Neurovirol* 1995;1:326-327.
 14. Doggweiler R, Jasmin L, Schmidt RA. Neurogenically mediated cystitis in rats: an animal model. *J Urology* 1998;160:1551-1556.
 15. Chen S, Yang M, Miselis RR, Aston-Jones GS. Characterization of transsynaptic tracing with central application of pseudorabies virus. *Brain Res* 1999;838:171-183.
 16. Kim ES, Li H, McCulloch PF, Morrison LA, Yoon KW, Xu XM. Spatial and temporal patterns of transneuronal labeling in CNS neurons after infection of pseudorabies virus into the sciatic nerve of adult rats. *Brain Res* 2000;857:41-55.