

혈관결찰용 클립을 이용한 급성 척수손상 모델 연구

김도현, 허승담, 심기범*, 신태균

제주대학교 농업생명과학대학 수의학과, 제주대학교 의과대학 신경외과*

A model of acute severe spinal cord injury in rats using a vascular clip

Do Hyun Kim, Seung Dam Heo, Ki Bum Sim*, Tae Kyun Shin

Dept. of Veterinary Medicine, College of Agriculture and Life Science, Cheju National University
Department of Neurosurgery, College of Medicine, Cheju National University*

ABSTRACT : A model of acute spinal cord injury was established in rats using vascular clip. The spinal cord of rats under ether anesthesia was exposed by a partial laminectomy of the caudal thoracic region. A compression injury was performed for 1 minutes at the exposed site using a vascular clip (10-15g). The wounds were closed. After surgery, locomotor functions (Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) score 0-21) was evaluated by the criteria of BBB for 3 weeks. Five animals were sacrificed for the immunopathological study at day 1, 4, 7, 14 and 21 post-injury. The pathological lesions of spinal cords in SCI were largely consistent with those of previous reports. We postulate that a vascular clip compression injury will be a useful model for the study of spinal cord dysfunction in rats.

서론

사람의 척수손상을 연구하기 위해서는 그와 유사한 병변을 나타내는 실험동물 모델이 필요하다. 급성 척수손상 동물모델은 척수의 퇴행성 변화 연구 및

외상 후 척수 조직의 재생기전 연구에 필요하다 (Basso 등, 1996). 척수손상의 효과적인 실험동물 모델은 척수손상 병변이 일정하여야 하고 해부학적 및 행동학적 결과가 일정하여야 한다. 현재까지 여러 가지 방법을 활용한 척수 손상 모델이 연구되어 왔으며 그 중 대표적인 것으로 무게 추를 활용한 weight drop model(Basso 등, 1995), 척수 신경섬유 절단을 통한 Transection models(Basso 등, 1996), 풍선을 활용한 압박수술(Tarlov, 1953), 그리고 기구를 활용한 강한 압박 수술 등(Rivlin 과 Tator, 1978)이 알려져 있다. 이들 모델은 각각 나름대로의 특징이 있으나 대부분 특수한 기구를 사용함에 따라 이를 확보하지 못한 실험실에서 연구를 하기에는 제약이 있어 보다 간편하고 규칙적인 병변을 유도할 수 있는 방법이 꾸준히 연구되고 있다.

동물 모델로써 이용되기 위해서는 규칙적인 병변과 병변에 따른 행동학적 평가가 선행되어야 좋은 모델이라고 할 수 있다. 현재까지 알려진 척수 기능장애 평가 방법은 Basso, Beattie, Bresnahan (BBB)의 세 사람이 제안한 방법이 가장 상세한 평가 방법으로 알려져 있다. 이 평가 방법은 New York University 팀들이 처음 무게 추를 활용한 척수손상 모델에서 평가를 시도한 이후 여러 연구에서 활용되고 있다(Basso 등, 1996).

저자 등은 간편한 척수 손상 모델을 개발하기 위한 문헌 조사를 통해 압박 수술이 간편하면서도 일정한 결과를 도출할 수 있음을 확인하였다. 그러나 아직 까지 이 수술법에 의한 행동학적 평가 및 조직학적 평가는 미미한 실정이었다.

이 실험에서는 뇌수술 시 이용되는 혈관결찰 클립을 활용하여 척수 손상을 주었을 때 행동학적으로 어떤 경과를 취하는지 조사하고, 동시에 경시적으로 조직학적 변화를 관찰하여 알려진 다른 모델과 비교하고자 한다.

재료 및 방법

Rats의 척수손상 모델

척수손상은 microvascular clip(Storeling, Wood Dale, Illinois, USA)을 이용한 Rivlin과 Tator(1978)의 방법을 응용하였다. 수술은 성숙한 랫드(Sprague-Dawley, 150-200g, female)(대한실험동물, 청주)를 에테르로 흡입마취시킨 후 8-9번째 흉추 부위에서 추궁절제술을 시행하였다. 실험군(n=82)은 척수를 노출시킨 후 1분간 vascular clip(10-15g)을 수직으로 삽입한 후 압박하였고, 대조군(n=10)은 추궁절제술만 실시하였다. 수술 후 근육과 피부를 봉합한 후 랫드를 케이지에 3-4마리씩 넣어 자유롭게 음식과 물을 먹을 수 있게 하였고 하루에 두번씩 손으로 방광을 자극하여 소변을 유도하였다.

행동학적 평가

Basso, Beattie 및 Bresnahan(1996)의 방법에 따라 척수 손상동물에서 운동기능의 회복을 평가하였다. 즉 0단계는 완전 마비, 1-8단계는 체중을 부양하지 못하지만 뒷다리의 움직임 유무, 9-13단계는 걷기시 앞·뒷다리 움직임의 협동성 유무와 체중부양, 14-21단계는 걷기시 앞·뒷다리의 협동성, 체중부양시의 몸통의 안정성, 발가락 움직임의 명확성 그리고 뒷발의 위치와 꼬리의 위치에 따라 0에서부터 21 까지

구분하여 평가하였다(Basso 등, 1996). 랫드의 운동기능은 1x0.65m의 종으로 덮혀진 테이블위에서 4명의 관찰자가 1분간 랫드 스스로의 움직임을 보면서 평가하였다. 수술 1일째 BBB score가 0 및 1 인 랫드를 중심으로 행동학적 회복 정도를 그래프로 표시하였다. 수술후 일주일간은 매일 측정하였고 14일과 21일째 되는 날 각각 측정하였다.

조직 처리

조직검사를 위해 실험군은 수술 후 1, 4, 7, 14, 21 일째 랫드를 각각 5마리씩 희생시켰으며 Sham 그룹은 수술 후 4일째 5마리를 희생시켜 척수를 채취하였다. 채취된 척수는 단백질 분석을 위해 -70°C로 냉동 보관하였고 조직 검사를 위해서는 포르말린에 고정된 후 파라핀 포매 절편을 만들었다. 절편은 통상적인 hematoxylin-eosin 염색을 실시한 후 검경하였다. 검사부위는 손상부위(T8-9)와 경수(C3-4) 및 요수(L2-3)등을 채취하였다.

면역조직화학 염색

면역염색은 avidin-biotin complex Elite kit (Vector, Burlingame, CA)를 이용하였다. 조직절편은 파라핀을 제거한 후 과산화 수소를 첨가한 methanol에서 침적하여 내재성 peroxidase를 제거하였다. 그 후 비특이적 면역반응을 방지하기 위해 normal blocking serum을 반응시켰다. 조직내 별아교세포 및 탐식세포를 확인하기 위하여 rabbit anti-glial fibrillary acidic protein(GFAP)(1:800)(Dake, Copenhagen, Denmark) 및 ED1 (1:800)을 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 biotinylated anti-rabbit IgG 또는 biotinylated anti-mouse IgG를 실온에서 45분 동안 반응시켰다. 이어서 avidin-biotin peroxidase conjugate로 45분간 실온에서 반응시켰으며 각 단계 사이에는 PBS로 5분간 3회씩 충분히 세척하였다. 면역 반응이 끝난 조직은 3, 3-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB) 용액에 과산화 수소가 0.009%되게 희석된 용액에서 발색시켰다. 양성반응을 나타낸 조직을 hematoxylin

용액으로 대조염색을 하고, ethanol, xylene의 탈수 및 투명화 과정을 거친후 봉입하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

Apoptosis 관찰

ApopTag Kit (ONCOR)를 사용하여 TdT-mediated dUTP-Dig nick end labeling(TUNEL)반응을 실시하였다. 파라핀 절편에서 파라핀을 제거한 후 proteinase K (20µg/ml)로 처리하고 equilibration buffer를 점적하여 실온에서 5분간 반응시켰다. 그 후 Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) 과 digoxigenin-dUTP을 TdT buffer와 혼합하여 점적하고 plastic cover slip을 덮어 37°C를 유지하면서 wet chamber내에서 1시간 반응시켰다. 이어 Stop/Washbuffer로 반응을 정지시켰고 anti-digoxigenin-peroxidase를 점적하여 반응시켰다. 3,3'-diaminobenzidine으로 발색한 후 hematoxylin으로 대조염색하고 탈수과정을 거친 후 봉입하고 현미경으로 관찰하였다.

결 과

행동학적 평가

수술 후 마비 정도에 따라 0과 1을 나타내는 동물을 대상으로 운동능력을 측정하였다. 수술한 랫드 중 대다수(63/82, 77%)의 랫드는 수술 후 1일째 BBB score 가 0으로 나타났다. 드물게 1를 보인 경우도 있으나 수는 많지 않았다(8/82, 10%)(Table 1). 마비가 0인 경우 수술 후 7일 이내 폐사되는 예가 있었으며 이는 척수 손상 의 직접적인 원인이라기 보다 이들의 지배를 받는 내장 장기의 기능장애로 추정되었다(Table 2). 척수 손상 후 평균적인 BBB score의 상승은 7일째 6, 10일째 7, 14일째 11, 21일째 16포인트로 각각 증가하였다(Fig. 1). 회복 증세가 보인 경우는 수술 후 14일째부터 회복 속도가 빠르게 나타났다. BBB score 0인 경우 관찰 기간동안 회복하지 않고 그대로 유지되는 경우도 나

타났다. 수술직후부터 마비의 정도가 BBB score 1-2 인 경우는 회복 속도가 현저히 빠르게 나타났다(Table 3).

Table 1. Survival rate with clip compression injury.

BBB score	Group(Total n=82)	Percent(%)
Grade 0	63	77%
Grade 1	8	10%
Above Grade 2	11	13%

Table 2. Fatality of rats with clip compression injury.

BBB score	1 Week	2 Weeks	3 Weeks	Survival
Grade 0 (Total n=63)	20, 32%	14, 22%	1, 2%	28, 44%
Grade 1 (Total n=8)	1, 12%	0	3, 38%	4, 50%

Table 3. BBB score recovery of alive rats with clip compression injury at day 21 post operation.

BBB score	Under Grade 7	Above Grade 8
Grade 0 (Total n=28)	20/28, 71%	8/28, 29%
Grade 1 (Total n=4)	0	4/4, 100%

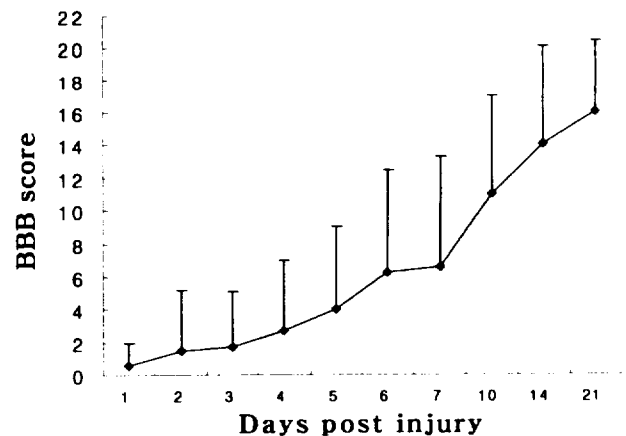


Fig 1. Behavioral changes of rats with clip compression injury. The time course of the functional recovery of rats with clip compression injury operation as measured by BBB open-field locomotor score(n=82). Note the increase in locomotor scores for the SCI group between 10 and 14 days

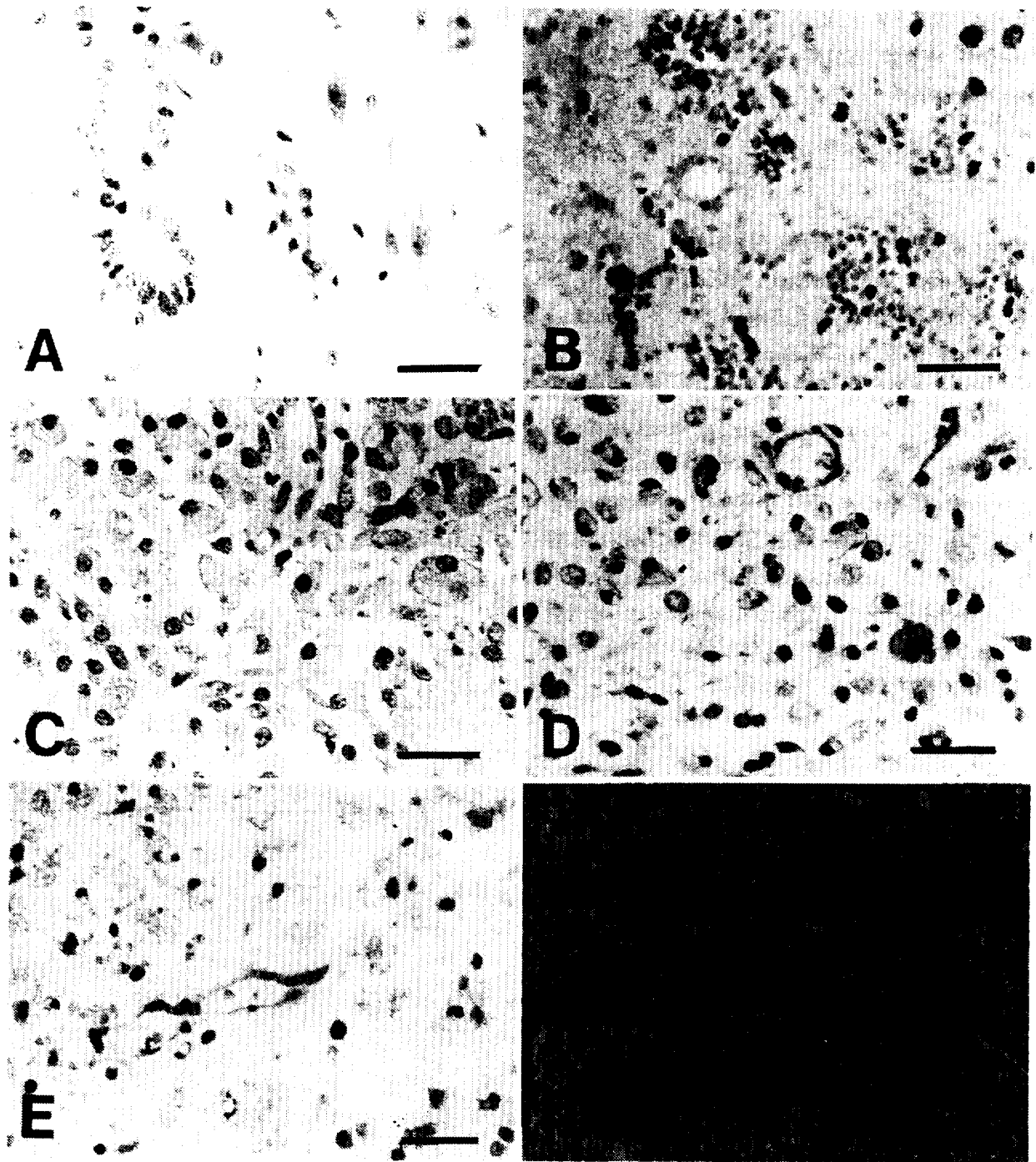


Fig. 2. Histological findings in the spinal cord of sham-operated rats(A) and SCI rats at day 1(B), 4(C), 7(D), 14(E) and 21(F) post operation. The sham operations caused no injury to the spinal cord(A). At day 1(B), mechanical damage including petechial hemorrhage, extensive necrosis, increased extracellular space were visualized. At day 4(C), phagocytes increased in number at the injury lesion. At day 7(D), phagocytes and glial cell increased throughout the white and grey matter. At day 14(E), there were increased small round cyst and irregular shaped spaces in white matter and increase of phagocytes and glial cells in grey matter. At day 21(F), there were shrinkage of spinal cord, decreased volume of grey matter, distinguished of white and grey matter. A-F were stained with hematoxylin-eosin. Scale bar = 30 μ m.

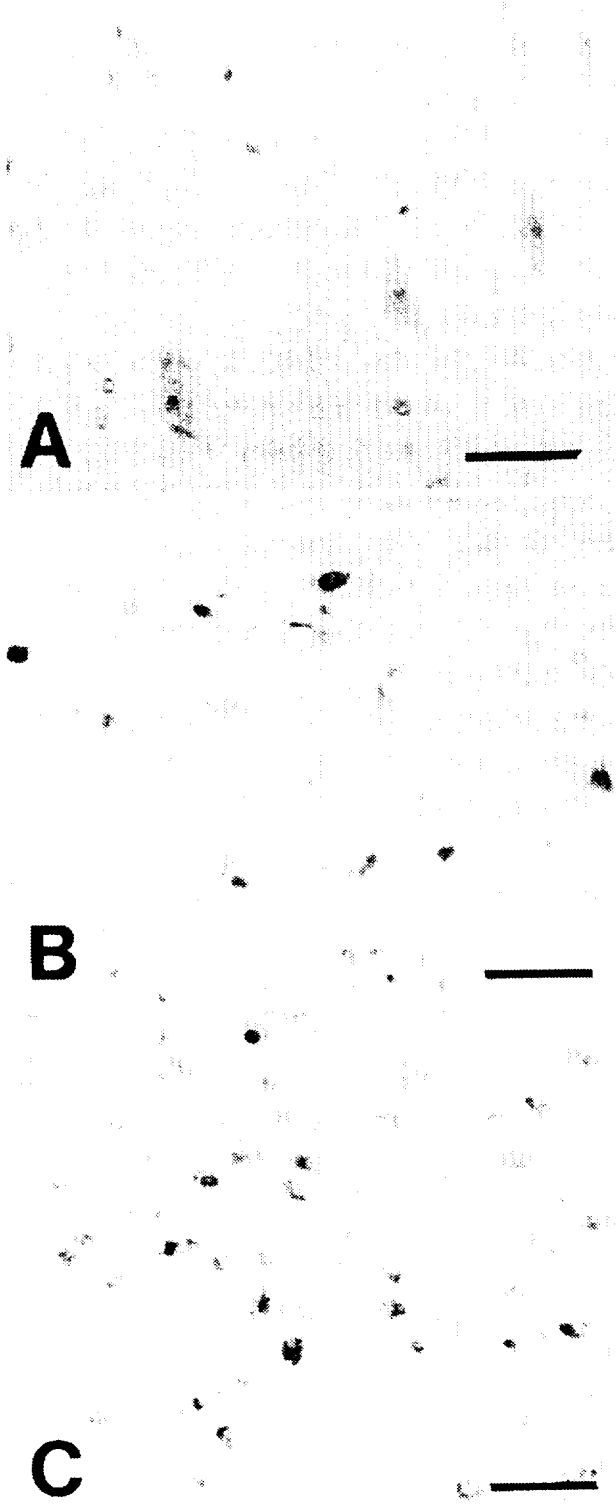


Fig. 3. Immunostaining of ED1 in the spinal cord with sham and spinal cord injury at day 1 and day 4 post-injury. A: There was few ED1 positive cells in the spinal cord with sham operation. B: Some ED1 positive

macrophages appeared in the lesions at day 1 after SCI. C: A large number of inflammatory cells were immunostained with ED1, suggesting that many macrophages are found within SCI lesions. A-C were stained with ED 1 using ABC kit. A-C: counterstained with hematoxylin. Scale bar = 30 μ m.

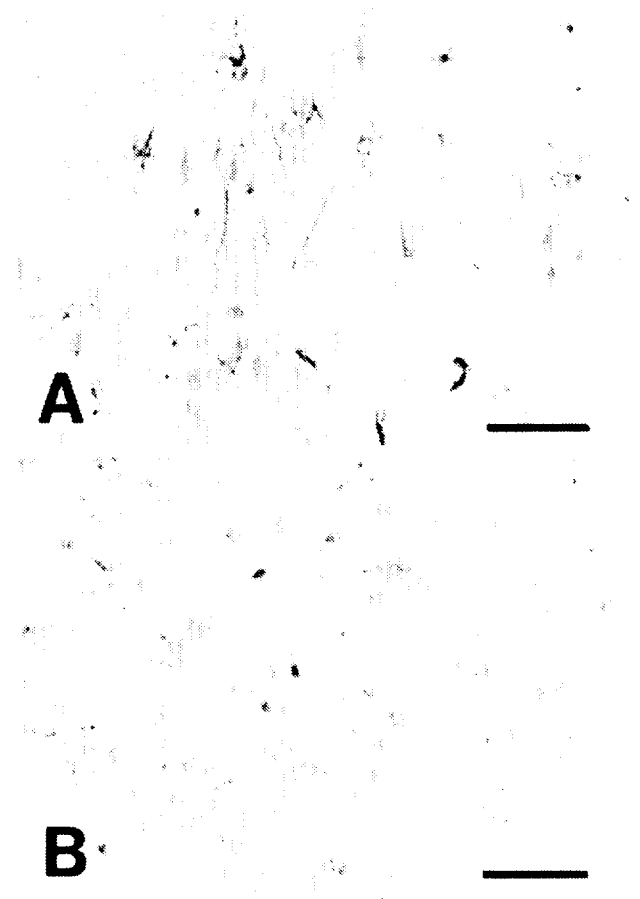


Fig. 4. GFAP immunohistochemical staining in the spinal cord with sham and day 4 post operation. There were increased astrocytic response in the spinal cord 4 days post injury. Note poor astrocytic response at sham group. A and B were immunostained with rabbit anti-GFAP using ABC kit. A and B: counterstained with hematoxylin. Scale bar = 30 μ m.

조직학적 변화

조직학적 특징을 비교하기 위해서는 급성 척수 손

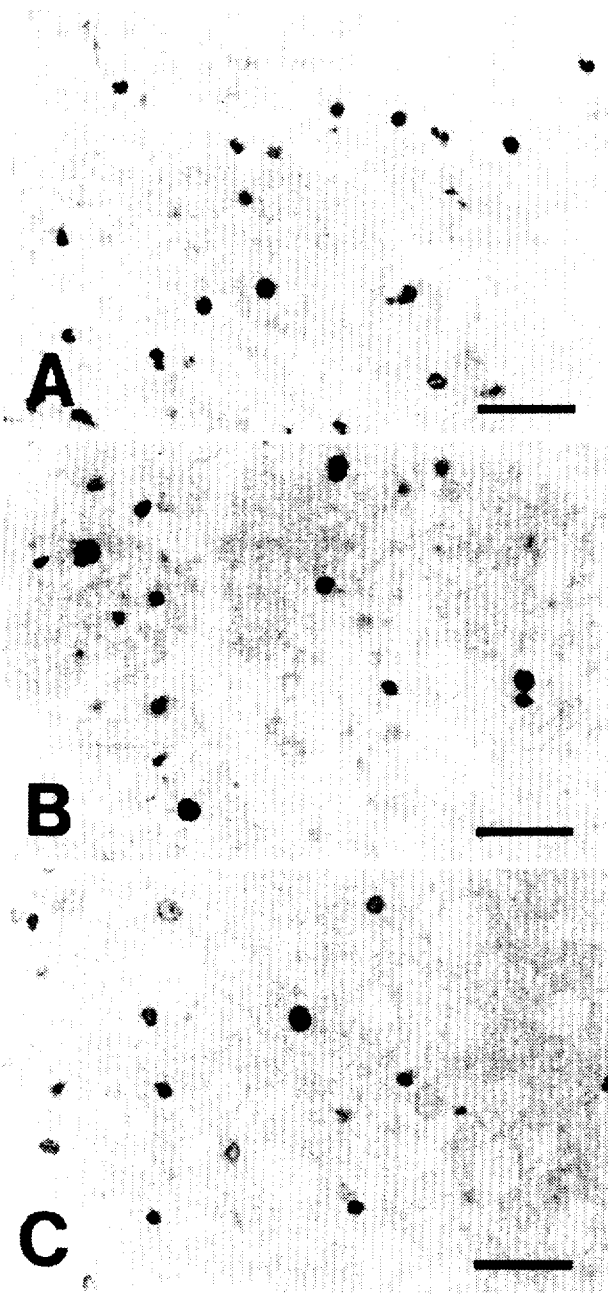


Fig. 5. TUNEL reaction in the spinal cord at day 1 and 4 post injury. Some cells in the white matter were positive for TUNEL at day 1 postinjury(A) and day 4 postinjury(B). A and B, counterstained with hematoxylin, scale bar = 30 μ m

상을 중심으로 퇴행성 과정을 관찰하였다(Fig. 3, 4, 5; Table 4, 5).

수술 후 1일째 척수 병변: 수술 후 1일째 척수 손상부위에서는 점상출혈, 범발적 괴사, extracellular

space의 증가 등 물리적 조직 손상이 있었다. 탐식세포로 보이는 구형의 세포는 약간 보였다(fig. 2B). 그러나 Sham group은 물리적 조직 손상과 탐식세포로 보이는 구형의 세포는 찾아볼 수 없었다(fig. 2A).

수술 후 4일째 병변: 손상을 준 부위에 많은 수의 탐식세포로 보이는 구형의 세포가 나타났다. 손상 후 척수조직의 변화는 다른 척수손상의 실험적 모델과 매우 유사했다(fig. 2C).

수술 후 7일째 병변: 백색질 및 회색질 모두에서 많은 수의 탐식세포가 침윤되었고 손상부위를 중심으로 신경교세포의 증가가 명확하게 나타났다(fig. 2D).

수술 후 14일째 병변: 밝게 염색된 백색질에서 전반적으로 많은 수의 Small round cyst와 Irregular shaped spaces가 나타났고 진하게 염색된 회색질의 경우 많은 수의 신경교세포의 증가와 탐식세포의 침윤이 있었다(fig. 2F).

수술 후 21일째 병변: 척수 조직의 전반적인 수축이 있었고, 백색질과 회색질은 명확하게 구분되었다. 특히 회색질의 volume 감소가 현저하였다(fig. 2G).

APOPTOSIS 관찰

수술후 apoptosis를 관찰한 결과 1일째 (255개/척수단면)와 4일째(270개/척수단면)의 TUNEL-positive cells은 주로 척수의 백색질내 탐식세포와 신경교세포가 다수 관찰되었고(fig. 5), 수술 후 7일째 되는 날에는 척수의 백색질내 탐식세포와 신경교세포에서 소수가 발견되었다. 그러나 손상부위로부터 떨어진 경수와 요수부위에서도 TUNEL-positive cell이 소수 관찰되었다.

고 찰

지난 50년 동안 척수손상으로 인한 환자의 살고자 하는 욕구는 극적으로 증가하였다. 하지만 우리의 척수 손상시 복잡한 병리생리학적인 기전에 대한 지식은 매우 불완전하다. 좀 더 효과적인 치료법이나 척수손상에 대한 정확한 기전에 대한 이해는 매우 필

Table 4. Histological characteristics of rat spinal cord with vascular clip compression injury.

Day post operation	Under Grade 7 (No recovery group)	Above Grade 8 (Recovery group)
1	petechial hemorrhage, extensive necrosis, increased extracellular space	petechial hemorrhage, extensive necrosis, increased extracellular space
4	increased phagocyte in injury lesion	increased phagocyte in injury lesion
7	Phagocyte and glial cell increased throughout the white and grey matter	Phagocyte and glial cell increased throughout the white and grey matter
14	increased small round cyst and irregular shaped spaces in white matter that phagocyte and glial cells in grey matter	increased small round cyst and irregular shaped spaces in white matter that phagocyte and glial cells in grey matter
21	shrinkage of spinal cord, decreased volume of grey matter, distinguished of white and grey matter	shrinkage of spinal cord, decreased volume of grey matter, distinguished of white and grey matter

Table 5. Immunohistochemical detection of macrophages and astrocytes in epicenter of clip compression injury in rats.

	staining	1day ^a	4days ^a	7days ^a	14days ^a	21days ^a
macrophage	ED1 *	+ ^b	+++	+++	++	++
Glia cell **	Anti-GFAP	+	+++	++		
apoptosis	TUNELc	+++ (255)	+++ (270)	+(40)		

a Five animals were examined in each group by 3 blind observer

b The intensity of immunoreactive cells is expressed as negative (0), weak(1+), moderate (2+), very intense(3+) of positive cells in the spinal cords of each group.

c SCI sections were analyzed using an apoptosis detection kit and immunohistochemistry using antibodies to detect specific markers. Stained sections were scored on the number of cells per field that were positive. The number of positive cells was defined in the average of 3 randomly chosen 400X fields: -, no positive cells: +, <50 cells per field: ++, <200 cells: +++, ≥200 cells

* ED1-positive inflammatory cells are macrophages/activated microglia.

** Glial cells imply all unidentified non-neuronal cells in the parenchyma, which may include GFAP(+) astrocyte, oligodendrocytes and inactivated microglia

요한 요소이다.(Euler 등, 1997) 이 연구에서는 척수 손상 후 신경조직의 손상과정을 연구할 목적으로 심한 척수 손상 모델을 제작하고 병변의 변화과정을 행동학적 및 조직학적으로 조사하였다. 그 결과 척수의 압박 손상시 조직학적 변화는 NYU impact device를 활용한 척수손상모델과 서로 매우 유사하게 나타났다(Balentine, 1978). 따라서 급성 척수 손상 모델을 활용하기 위해서 vascular clip injury가 간편하게 이용될 수 있을 것이라 생각된다.

행동학적 평가는 BBB scale 이 광범위하게 활용되며 이 실험에서도 이 방법으로 평가하였다. 그 결과 수술받은 랫드는 대부분 수술직후 완전마비를 나타내었으며 일부는 수술직후 BBB 등급이 1-2로 나타

났다. 이 모델을 활용하여 치료 목적의 실험을 할 경우 수술 후 마비정도를 평가하여 동일한 마비 군을 치료시험에 이용하는 것이 바람직할 것으로 생각된다. 수술 후 1주 이내 폐사되는 예가 적지 않았지만 이는 척추손상에 의한 직접 원인이라기 보다 내장장기의 이상으로 일어나는 것으로 추정된다. 이를 극복하기 위해서는 규칙적으로 방광을 마사지를 통해 강제배뇨하여 주는 것이 효과적일 것으로 생각된다.

척수 손상시 염증 반응은 병변의 진행과정에 있어서 매우 중요한 요소이다. 급성 염증반응은 손상부위에서 호중구, 대식세포 그리고 신경교세포에 의해 수반된다. 이들은 조직내에서 oxidative burst을 유도하고 손상부위의 희색질과 등쪽백색질에 침윤된다. 또

한 macrophage의 출현은 조직 파편의 탐식작용과 백색질의 신경로의 재생을 향상시킨다고 알려지고 있다(Sonia 등, 1998). 이 손상 모델에서도 손상 방법의 차이는 있으나 국소적 조직 변화는 기존의 연구 결과와 같게 나타났다.

결론적으로 본 실험을 통해 clip 을 활용한 척수손상 모델에서 행동학적 반응과 조직학적 변화를 조사한 결과 척수손상 후 기능적 회복을 평가하기 위한 BBB scale과 같은 운동기능의 회복율을 측정하는 방법의 효용성을 확인할 수 있었다. 또한 전반적으로 급성 변화를 취하며 1주일까지 관리가 용이한 점으로 보아 급성 척수 손상모델로 적합할 것으로 생각된다.

Acknowledgement

This study was supported by a grant from the Korean Health 21 R&D Project. The Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (02-PJ1-PG10-21305-0003).

인용문헌

1. Balentine, J.D., 1978. Pathology of experimental spinal cord trauma. I. The necrotic lesion as a function of vascular injury. *Lab. Invest.*, 39: 236-253.
2. Basso, D.M., Beattie, M.S. and Bresnahan, J.C., 1995. A Sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J. Neurotrauma*, 12: 1-21.
3. Basso, D.M., Beattie, M.S. and Bresnahan, J.C., 1996. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp. Neurol.*, 139: 244-256.
4. Rivlin, A.S. and Tator, C.H., 1978. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute model in the rat. *Surg. Neurol.*, 10: 39-43.
5. Sonia, L.C., Mark, E.P. and Joe, E.S., 1998. Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp. Neurol.*, 151: 77-88.
6. Tarlov, I.M., Klinger, H. and Vitale, S., 1953. Spinal cord compression studies I. Experimental techniques to produce acute and gradual compression. *A.M.A. Archiv. neurol. Psych.*, 70: 813-819.
7. Von Euler, M., Seiger, A. and Sundstromm, E., 1997. Clip compression injury in the spinal cord : A correlative study of neurological and morphological alterations. *Exp. Neurol.*, 145: 502-510.