

# 안면신경 압박손상 후 Adenovirus 매개 BDNF 유전자 전달을 통한 신경손상 회복에 관한 연구

양병은 · 이종호\*

한림대학교 의과대학 구강악안면외과학교실, \*서울대학교 치의학대학원 구강악안면외과학교실

**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2006;32:308-316)

## ADENOVIRAL VECTOR MEDIATED *IN VIVO* GENE TRANSFER OF BDNF PROMOTE FUNCTIONAL RECOVERY AFTER FACIAL NERVE CRUSH INJURY

Byoung-Eun Yang, Jong-Ho Lee\*

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Medicine, Hallym University.*

*\*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Graduate School of Dentistry, Seoul National University*

### Objectives

Despite considerable advances in technique, experience and skill, the precise place of surgery in the treatment of facial nerve injury remains uncertain. We designed a facial nerve crush injury model in rats and evaluated the recovery of crushed nerve which is the most common injury type of facial nerve using adenovirus vector mediated *in vivo* gene transfer of Brain derived neurotrophic factor(BDNF).

### Materials and methods

In 48 Sprague Dawley rats, we made a facial nerve crush injury model to main trunk before the furcation, and injected a 10<sup>11</sup>pfu adenoviral BDNF in experimental group(BDNF adenoviral injection group; ad-BDNF) and 3  $\mu$ l saline in control group(Saline injection group; saline). After a period of regeneration from 10 to 40 days, nerve regeneration was evaluated with functional test (vibrissae and ocular movement), electrophysiologic study(threshold, peak voltage, conduction velocity) and histomorphometric study of axon density.

### Results

Vibrissae and ocular movement, threshold and conduction velocity improved as time elapse in both group, however axon density was increased significantly only in experimental group.

Functional test in 10 days and 20 days showed no difference between experimental group and control group. Vibrissae movement, threshold, conduction velocity and axon density in 30 days revealed that the regeneration in quality of experimental group was significantly superior to that of control group.

### Conclusion

In general, there is tendency for nerve regeneration in experimental group (BDNF-adenovirus injection group) during 40 days, functional recovery was detected successfully after facial nerve crush in 30 days postoperatively.

**Key words:** Facial nerve regeneration, BDNF, Adenoviral gene transfection, Crush injury

## I. 서 론

안면신경은 안면의 표정근을 지배하는 신경으로 손상 시 외관의 변형을 일으켜 사회활동에 심각한 영향을 미친다. 두개

내에서의 긴 해부학적 경로와 두개외에서의 표층 위치로 인해 뇌신경 중 가장 손상 받기 쉬운 신경이다. 안면신경은 교통사고나, 종양성장에 따른 압박 또는 감염, 그리고 외과적 절제로 손상될 수 있다. 최근까지도 신경 손상이 발생될 경우 임상적 해결방법은 미세수술이 가장 선호되고 있다. 그러나 미세외과적 술기의 발전에도 불구하고 그 결과는 100% 만족할 만하지 못하며 운동기능의 완전한 회복이 어려운 것이 현실이다. 논쟁거리이긴 하나 안면이식술이 조금씩 시도되고 있는 현실에서 혈관이나 기타 복합조직의 해결문제보다 장기적 재활 및 기능의 관점에서 안면신경의 회복은 중요한 문제일 것이다<sup>1)</sup>.

운동신경의 손상 시 외부에서 투여된 BDNF에 의해 손상이

### 이 종 호

110-768 서울특별시 중로구 연건동 275-1

서울대학교 치의학대학원 구강악안면외과학교실 및 치학연구소

### Jong-Ho Lee

Dept. of OMFS, Graduate School of Dentistry, Seoul National Univ. & Dental Research Institute

28 Yeongun-dong, Jongno-gu, Seoul, #110-768, South Korea

Tel: 82-2-2072-2630 Fax: 82-2-766-4948

E-mail: leejongh@plaza.snu.ac.kr

회복되었다는 보고들이 있어왔다. 외부에서 BDNF만 투여하여 생체 내에서 적정농도를 유지하기란 어려우므로 여러 가지 투여방법 중 adenovirus를 이용한 유전자 이입법이 효과적인 것으로 보고된 바 있으며 retrograde axonal transport에 의해 얻어지게 되는 것으로 알려졌다<sup>2)</sup>.

본 연구는 안면부 외상 또는 외과적 시술에 의해 발생할 수 있는 안면신경 압박 손상모델을 백서에 설정하고, Adenovirus 매개 BDNF 유전자 이입을 통해 압박된 신경의 기능적 회복을 유도할 수 있는지 알아보고자 하였다.

## II. 연구 재료 및 방법

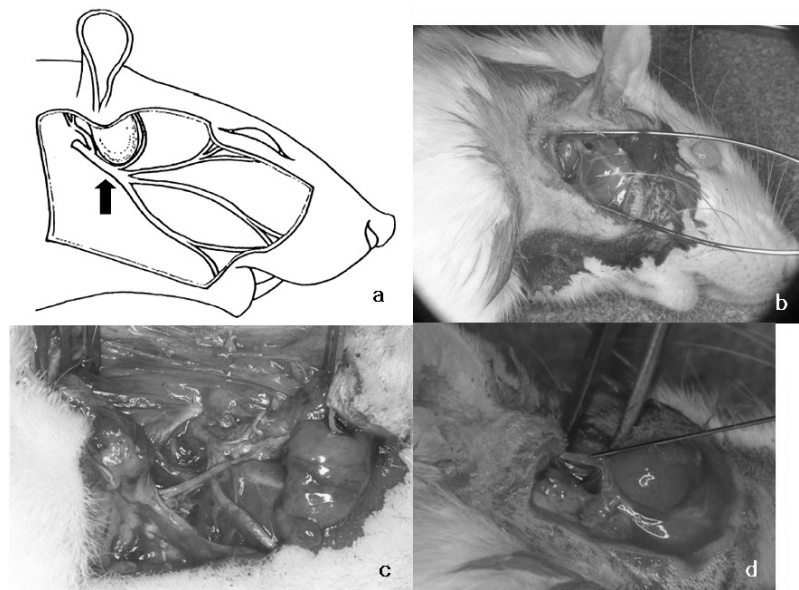
### 1. 재조합 BDNF-Adenovirus 제조 및 농축

BDNF-adenovirus는 경희대학교 생물학과의 김윤희 교수 실험실에서 만들었으며 제조방법은 간단히 설명하면 다음과 같다. BDNF-adenovirus를 제조하기 위해 인간 BDNF cDNA유전자를 cDNA library에서 PCR을 이용해 얻은 다음 adenovirus shuttle vector인 pAACCMVpARS의 E1region이 제거된 위치에 cloning하였다. BDNF-adenovirus shuttle vector와 전체 adenovirus 5 genome을 가지고 있는 pJM17 plasmid를 293 cell에 co-transfection하여 adenovirus genome sequence간에 homologous recombination이 일어나게 하여 replication-incompetent BDNF-adenovirus를 생산하였다. 재조합 adenovirus는 viral genome 내에 BDNF sequence가 들어있는지 PCR을 이용해 확인하였고, BDNF-Adenovirus를 single plaque으로 분리하여 wild-type adenovirus를 제거하였다.

최종 분리한 BDNF 재조합 virus vector를 다량의 293 cell에 감염시키고 (50 m.o.i) 이틀 후 293 cell이 cytotoxicity를 나타낼 때 cell을 채취하고 -80 °C에서 얼림과 녹임을 5회 반복하고 각 단계마다 vortex로 과격히 흔들어주어 BDNF adenovirus 혼탁액을 얻었다.

### 2. 안면신경의 손상 및 약제 투여

SPF SD 백서(6주령, 음성, 체중 200그램, n=48)를 1주간의 검역과 적응기간을 거친 후 서울대학교 치학연구소 실험동물 지침에 따라 동물을 사육하였다. 케타민(Ketara®, Yuhan Corp., 40mg/kg)과 Xylazine(Rompun®, Bayer Korea Ltd., 10mg/kg)를 4:1의 비율로 혼합 후 복강 내로 주입하여 마취하였다(0.1ml/100mg). 귀 앞에 절개를 하고 이하선을 확인 후 안면신경의 주분지를 노출시켰다. 압박손상은 혈관검자를 이용하였으며 3mm 폭 만큼이 눌리도록 하여 손잡이의 첫 번째 클립이 맞물리도록 30초간 균일하게 가하고 신경 손상부를 확인하기 위해 압박부위의 근심에 9-0 nylon suture를 시행하였다. 실험군(n=24)과 대조군(n=24)은 시기에 따라 10일간격으로 다시 네 군(각 군당 n=6)으로 나누었다. 모든 개체에서 안면신경의 기능평가를 좌우로 비교하기 위해 우측의 안면신경만을 대상으로 실험하였다. 실험군은 안면신경 압박손상 후 신경외막(epineurium)에 recombinant BDNF-adenovirus (10<sup>11</sup> pfu/3 μl)를 대조군은 생리식염수 3 μl를 30G 니들이 달린 Hamilton syringe를 이용하여 각각 주입하였으며 (Fig. 1) 그 후 창상을 봉합하였으며 마취에서 회복 후 수염의 움직임이 없음을 통해 손상측(우측)의 안면신경의 기능이 소실되었음을 확인하였다.



**Fig. 1.** a. arrow - crush injury site.  
b.c. operation view of rat facial nerve.  
d. injection of adenoviral BDNF with Hamilton syringe(30G)

### 3. 안면신경 기능 검사

안면신경의 회복과 관련된 기능 검사로는 수염의 운동을 검사하는 방법과 눈꺼풀의 깜빡임을 검사하는 방법이 있다. 눈꺼풀의 깜빡임 조사를 위해 안구부위를 향해 주사기로 생리식염수를 떨어뜨려 눈을 깜빡이는 정도 또는 palpebral fissure가 좁아지는 것을 측정하였다. 전혀 눈꺼풀이 닫히지 않으면 0, 완전히 눈꺼풀이 닫히면 1, 50% 정도의 palpebral fissure가 좁아지면 0.5로 기록하였다<sup>3)</sup>. 또한 수염의 운동에 대한 검사를 시행코자 희생 전 30초간에 걸쳐 머리 전방부 및 머리 상방에서 수염 움직임 영상을 비디오 촬영하였으며, 실험에 가담하지 않은 2명의 사람에게 아래와 같은 기준을 주고 기록하게 하여 평균을 측정하였다. 수염의 움직임이 전혀 없으면 0, 수염의 하방에서 요동이 있어서 수염모양으로부터의 움직임으로 해석되는 경우는 1, 전체 길이에 걸쳐서 일부 수염이 움직이면 2, 모든 수염이 움직이면 3, 손상시키지 않은 반대쪽과 완전 동일하게 움직일 경우 4로 측정하였다<sup>4)</sup>.

### 4. 전기생리학적 검사

각각의 군에서 희생 전 안면신경의 주분지와 협측 분지를 노출시켰다. 자극 전극을 압박손상부위 근위부의 주분지부위에 위치시키고 수용전극을 협측분지 원위단에 위치시켰다(Fig. 2). 주위의 노이즈 감소를 위해 액상파라핀으로 절연하고 정상부위 자극을 20 $\mu$ A부터 시작하여 반응을 보일 때까지 증가시켰다. 자극원은 WPI stimulus isolator A365<sup>®</sup> (WPI Instrument<sup>®</sup>, USA)를 이용하였으며 amplifier(Plexon, Dallas, USA)를 이용하여 1,000배 증폭하여 신호를 측정하였다. Oscilloscope은 LeCroy 9304AM QUAD 200MHz Oscilloscope를 이용하였으며, 활동전압이 발생할 때 전압을 측정하여 최고전압(peak voltage)으로 기록하였다. 또한 신경자극원과 수용전극과의 거리와 latency period를 측정하여 신경전도속도를 계산하였다.

### 5. 축삭 밀도 측정

각 실험군 및 대조군의 신경생리학적 검사를 시행한 후 압박손상 부위를 포함하여 안면신경을 약 1cm 채취하였다. 사용된

9-0 Nylon을 수술 현미경(Zeiss, Germany) 하에 찾은 뒤 가운데 부위를 찾아서 표본을 제작하였다. 가운데가 절단된 조직은 2% glutaraldehyde에 고정하고, 2% osmium tetroxide에 후고정을 시행하였다. 100% epon에 포메시킨 다음 1  $\mu$ m 두께의 semithin 절편을 만든 후, 각 조직편을 toluidine blue에 염색하였다. 광학현미경 하에 축삭이 관찰되는 대표부위를 선택하여 400배에서 각 3군데에서 관찰하여 디지털 영상을 얻었으며, Optima 6.5 image analyzing 프로그램(Mediacybernetic USA)을 이용하여 임의 면적에서의 축삭의 갯수를 얻고 이를 토대로 전체면적의 축삭의 갯수를 얻었으며 축삭의 개수를 총면적으로 나눈 후 100만배를 곱하는 방식으로 축삭 밀도를 비교하였다.

### 6. 통계 분석

데이터 분석은 SPSS 10.0 (Statistical Package for Social Science - Microsoft, Illinois, Chicago, USA)을 이용하여 시행했다. 전기생리학적 검사, 축삭밀도의 실험군과 대조군사이 동일 날짜의 비교는 unpaired one-tailed t-test로 검증했고 안면신경기능 검사에 대해서 실험군과 대조군 사이의 동일 날짜의 비교는 Mann-Whitney U test로 검증했다. 날짜의 경과에 따른 비교를 위한 분석은 전기생리학적 검사와 축삭밀도의 비교는 one-way ANOVA로, 안면신경기능 검사의 경우는 Kruskal-Wallis test로 검증하였다.

## III. 결 과

### 1. 전기생리학적 검사

압박손상을 가하지 않은 안면신경에서 수염이 움직이는 정도의 전기역치는 평균 약 90 $\mu$ A였으며 이것을 기준으로 서서히 증가시켜 수염의 움직임이 발생하는 전기역치 자극을 구한 결과 다음과 같았다(Table 1). 전기역치의 차이는 30일군에서 BDNF-Adenovirus군은 855 $\pm$ 140 $\mu$ A, 생리식염수 군은 1525 $\pm$ 65 $\mu$ A로 유의한 차이(p<0.05)를 보였다. 40일군에서는 두 군 사이에는 유의한 차이는 없다고 할 수 있겠으나(p<0.1) 대략 정상 전기역치에 근접한 것으로 보였다(Fig. 3). 대조군(saline)과 실험군(ad-BDNF)에서 전도속도는 활동전압의 측정을 위해 모두

**Table 1.** Electrophysiologic test results

Days	10		20		30		40	
	ad-BDNF	saline	ad-BDNF	saline	ad-BDNF	saline	ad-BDNF	saline
Threshold( $\mu$ A)	2900 $\pm$ 258	2888 $\pm$ 278	1497 $\pm$ 815	1733 $\pm$ 415	855 $\pm$ 140**	1525 $\pm$ 65**	117 $\pm$ 5*	145 $\pm$ 36*
C.V(m/sec)	7.63 $\pm$ 1.9	7.53 $\pm$ 0.85	8.02 $\pm$ 0.42	8.63 $\pm$ 0.75	9.87 $\pm$ 0.73**	8.4 $\pm$ 0.84**	22.7 $\pm$ 5.03*	18.69 $\pm$ 3.36*
Peak voltage(mv)	0.4 $\pm$ 0.11	0.59 $\pm$ 0.29	0.78 $\pm$ 0.57	0.52 $\pm$ 0.17	1.15 $\pm$ 0.86	1.05 $\pm$ 0.36	0.9 $\pm$ 0.82	0.94 $\pm$ 0.56

\*\* P<0.05 \* P<0.1

ad-BDNF : adenoviral BDNF group (experimental group)

C.V : conduction velocity

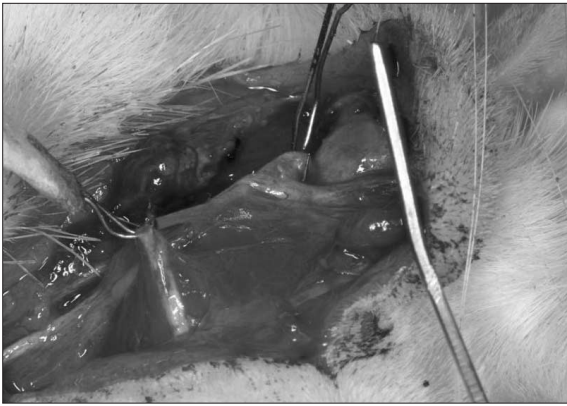


Fig. 2. Electrophysiology test.

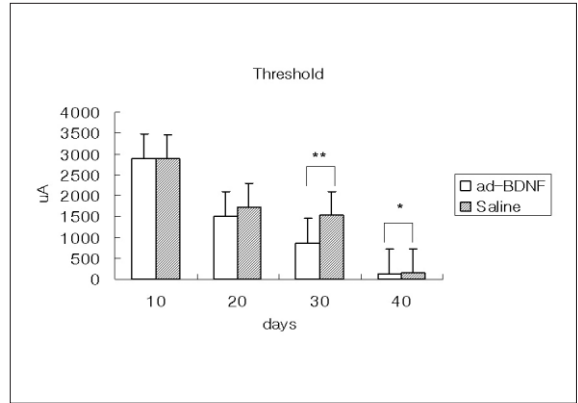


Fig. 3. Difference in threshold between adenoviral BDNF(ad-BDNF) and Saline group.

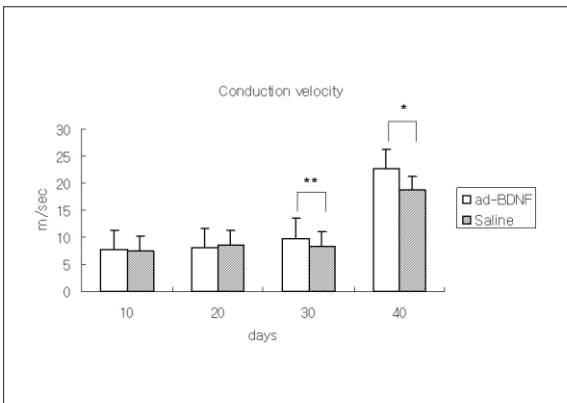


Fig. 4. Difference in conduction velocity between ad-BDNF and Saline group(\*\*p<0.05, \*p<0.1).

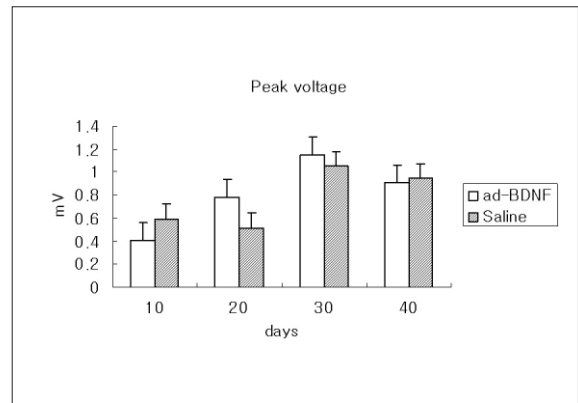


Fig. 5. Difference in peak voltage between ad-BDNF and Saline group.

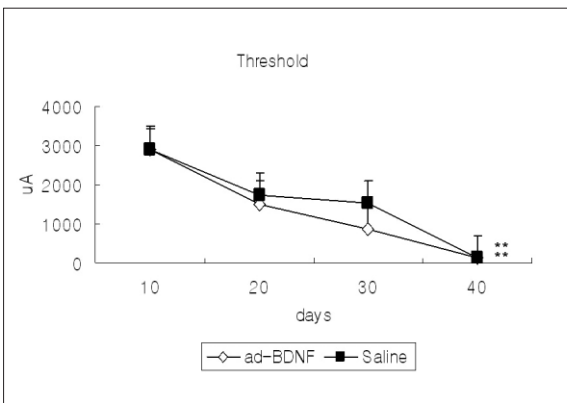


Fig. 6. Difference in threshold with time(\*\*p<0.05).

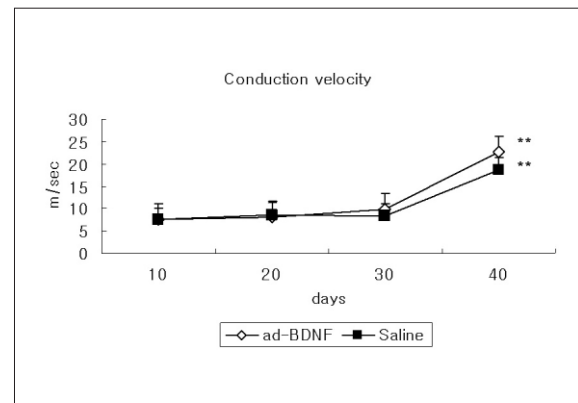


Fig. 7. Difference in conduction velocity with time (\*\*p<0.05).

1000µA를 사용하여 측정하였으며 30일에서 유의한 차이 (p<0.05)를 보였다(Fig. 4). 최고 전압은 실험군과 대조군에서 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 5).

실험군이나 대조군에서 모두 날짜의 경과에 따른 비교는 전기역치와, 전도속도에서는 유의한 차이가 있었으나(p<0.05) 최고전압에서는 차이가 없었다(Fig. 6, 7).

2. 안면신경 기능검사

안면신경의 회복에 대한 기능검사로써 수염의 움직임과 눈꺼풀의 깜박임에 대한 검사 결과는 다음과 같다(Table 2). 수염의 움직임은 30일과 40일에서 실험군과 대조군 사이에 유의한 차이(p<0.05)가 있었으며(Fig. 8), 안검 운동은 실험군과 대조군 사이에서는 유의한 차이가 없었다(Fig. 9). 실험군과 대조군 각각에서는 수염의 움직임과 안검의 운동 모두에서 날짜증가에 따라 유의한 차이를 보였으며(p<0.05) 40일로 갈수록 거의 회

복되는 양상을 보였다(Fig. 10, 11).

3. 축삭(axon) 밀도 측정

축삭의 밀도는 실험군에서 30일째에 가장 높았으며 이 시기에 유의할만한 차이가 있었다(Table 3, Fig. 12) (p<0.05). 각 군에서의 시기별 차이를 살펴보면 실험군에서는 각 시기별 유의한 차이가 있었으나(p<0.01) 대조군에서는 차이를 보이지 않았다(Fig. 13-15).

Table 2. Functional study results

Days	10		20		30		40	
Group	ad-BDNF	saline	ad-BDNF	saline	ad-BDNF	saline	ad-BDNF	saline
vibrissae movement	0.33±0.52	0	1.83±0.75	1.17±0.41	3.17±0.41**	2.5±0.55**	3.5±0.55**	2.67±0.52**
ocular movement	0.33±0.26	0.25±0.27	0.92±0.20	0.83±0.26	1.0±0	0.83±0.26	1.0±0	1±0

\*\* P<0.05

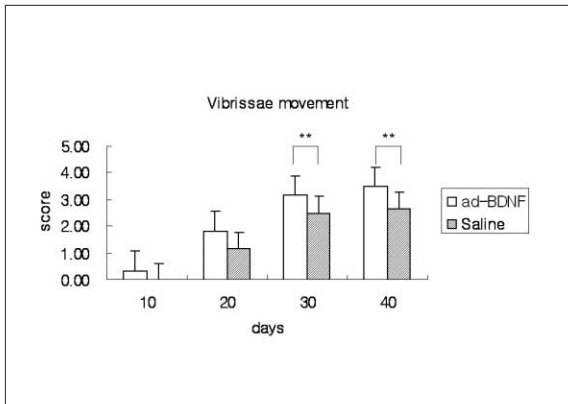


Fig. 8. Difference in vibrissae movement between ad-BDNF and Saline group(\*\*p<0.05).

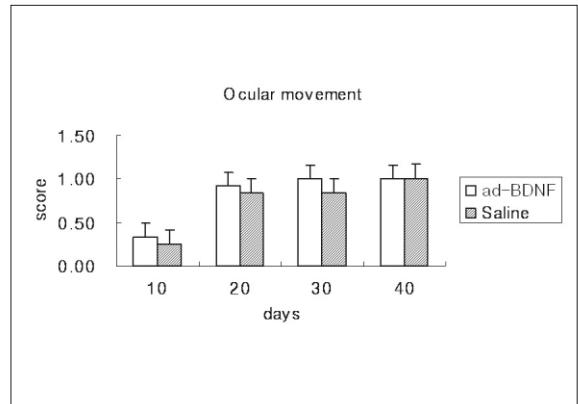


Fig. 9. Difference in ocular movement between ad-BDNF and Saline group.

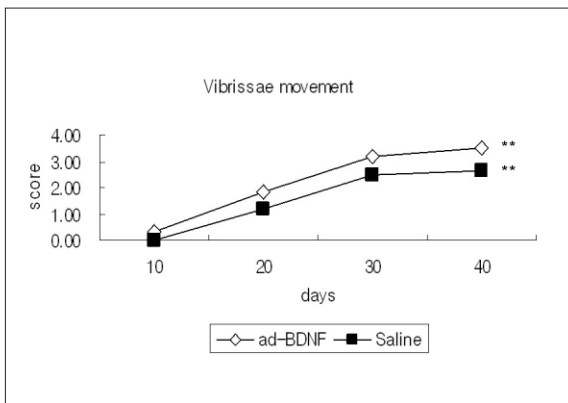


Fig. 10. Difference in vibrissae movement with time(\*\*p<0.05).

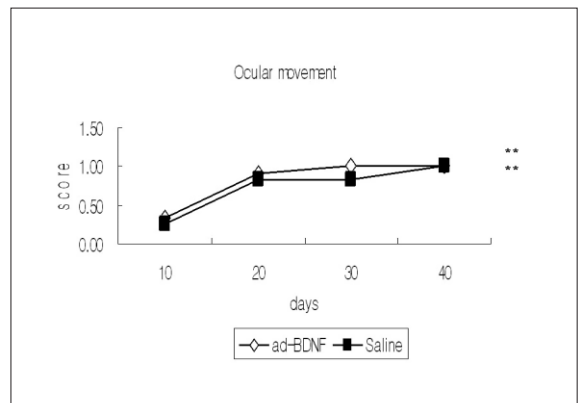
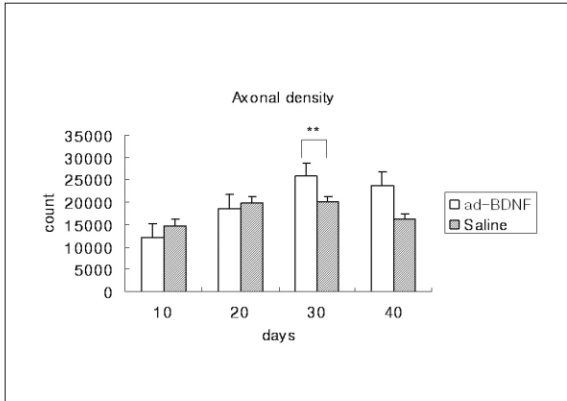


Fig. 11. Difference in ocular movement with time(\*\*p<0.05).

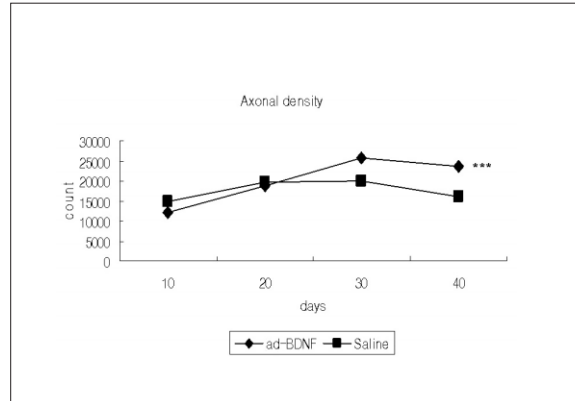
**Table 3.** Axonal density results

Days	10	20	30	40
ad-BDNF	12087 ± 111	18697 ± 745	25751 ± 307**	23676 ± 313
saline	14803 ± 279	19830 ± 509	20023 ± 138**	16087 ± 438

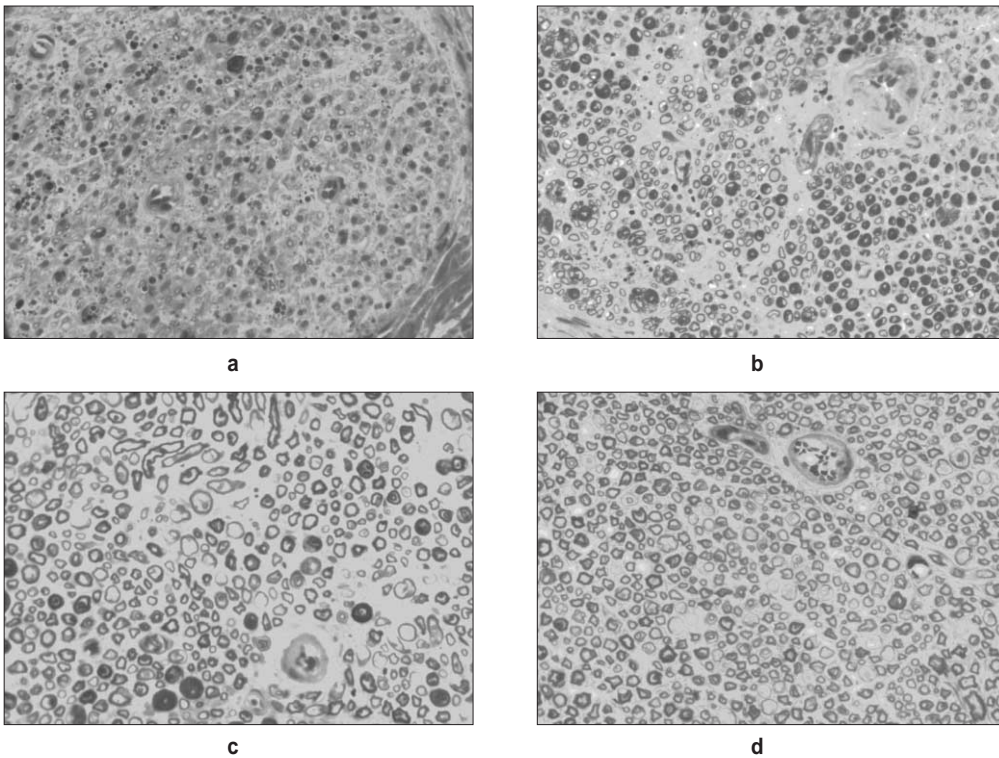
\*\* P<0.05



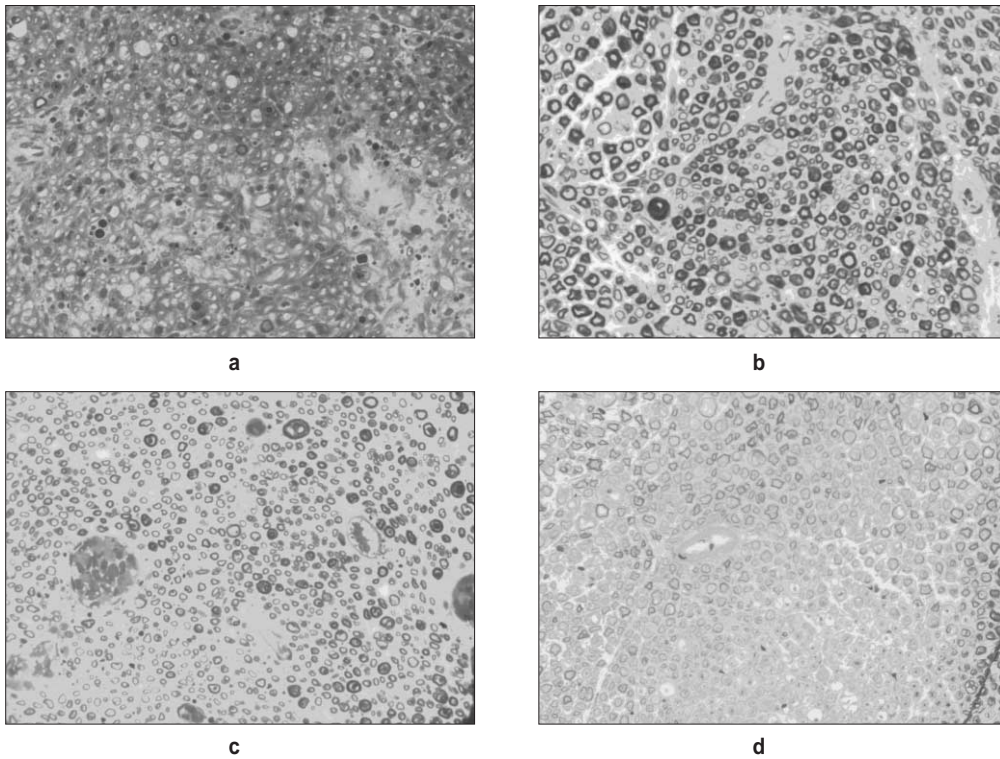
**Fig. 12.** Difference in axon density between ad-BDNF and Saline group (\*\*p(0.05)).



**Fig. 13.** Difference in axon density with time(\*\*\*p(0.01)).



**Fig. 14.** a. ad-BDNF group 10 day (×400). b. ad-BDNF group 20 day (×400). c. ad-BDNF group 30 day (×400). d. ad-BDNF group 40 day (×400).



**Fig. 15.** a. saline group 10 day (×400). b. saline group 20 day (×400).  
c. saline group 30 day (×400). d. saline group 40 day (×400).

#### IV. 고 찰

신경손상의 흔한 형태 중 하나가 압박손상(crush) 그리고 percussion 손상이다. 이런 손상의 형태는 동물모델에서 적용되어 왔는데 통상적인 방법은 smooth-tipped forceps을 이용하여 신경을 쥐어짜는(squeezing) 것이다. 이 경우는 해부학적으로 축삭 불통(axonal interruption)은 있지만 슈반세포 basal laminal tube는 손상되지 않는 경우이다<sup>9)</sup>. 사람의 경우, 골절 발생시, 혈중에 의한 경우 이런 손상의 형태가 나타날 수 있다. 압박손상 후 축삭돌기와 마이엘린의 재생은 정밀하나 매우 느린 과정이며 특히 축삭돌기는 대략 하루에 1mm 정도로 재생되고 나이나 축삭돌기의 길이에 반비례하여 감소하는 것으로 알려진다<sup>6)</sup>.

BDNF는 1982년 처음 알려졌으며<sup>7)</sup> 척추동물의 경우 발생시 대략 반이상의 spinal motoneuron을 자연적으로 잃게 되는데 발생동안의 조류를 대상으로 한 연구에서 외부에서 투여한 BDNF가 운동뉴런의 손실을 억제시킨다고 보고하였으며<sup>8)</sup> in vivo에서 신생 쥐(newborn rats)에 안면신경절단손상을 가한 후 3가지의 neurotrophin(nerve growth factor(NGF), BDNF, neurotrophin-3(NT-3))을 가한 후 평가한 결과 BDNF를 투여한 경우가 안면신경 운동뉴런의 생존이 가장 많다고 보고했으며<sup>9)</sup> 백서에서 axotomy를 시행 후 관찰한 결과 외부투여된 BDNF가 좌

골신경 생존을 촉진하고 좌골신경 슈반세포에서 존재가 확인된다고 보고되었다<sup>10,11)</sup>. Neurotrophins과 다른 Neurotrophic factors는 손상후 퇴행성 변화를 일으키는 말초신경에서 상승하게 되는데<sup>12)</sup>, Axotomy후 슈반세포내의 BDNF mRNA titer가 수배 증가하고, 손상 4주 후 최대에 달한다고 보고되었으며<sup>13)</sup> 운동신경 뿐 아니라 감각신경, 교감신경의 outgrowth와 생존에도 관여한다고 보고되었다<sup>9)</sup>. Nerve growth factor(NGF)의 경우는 운동신경에서는 거의 나타나지 않으며 손상 후에도 upregulation 되지 않으나, BDNF는 정상적인 운동신경에서는 비교적 적은 양이 나타나나 손상 후 급격히 증가된다<sup>14)</sup>. 이런 이유로 BDNF는 직, 간접적으로 운동뉴런, 운동신경과의 관련성이 있으므로 본 연구에서는 손상된 안면신경의 회복을 위해 BDNF를 사용하였다. BDNF는 motor axonal regeneration을 촉진하는데 중요한 인자로 작용하며 쥐를 통한 연구에서 부작용 없는 최적의 투여농도(0.5-2 $\mu$ g/일, 28일)가 보고된 바 있다<sup>10)</sup>. 이렇게 28일에 걸친 지속적인 투여가 필요하다는 것은 일부 연구를 통해 주장하는 바에 의하면 일시적인 BDNF국소투여가 말초신경재생에 별다른 영향을 미치지 못한다는 것에 기인한다<sup>15)</sup>. 따라서 어떤 식으로든 지속적인 효과발현을 위해서는 전달하는 방법의 개선 및 국소적으로 적절한 농도를 지속적으로 주입할 수 있어야 한다<sup>16)</sup>. 또한 BDNF는 반감기가 짧고 blood-nerve barrier를 통과하

지 못하므로 외부투여시의 한계점을 가진다<sup>17)</sup>. 이런 이유로 본 연구에서는 생체내에서 BDNF의 지속적인 농도유지를 위한 방안으로 adenovirus를 사용하였다<sup>18)</sup>. 기도상피세포를 자연적 숙주로 하는 adenovirus는 분열중인 세포뿐만 아니라 비분열세포도 감염시킬 수 있는 폭넓은 숙주범위를 가지고 있으며 안정성 면에서는 숙주의 염색체에 삽입되지 않으며 문제가 생긴다고 하더라도 경미한 호흡기질환을 야기할 정도이다. 또한 바이러스의 분리와 높은 역가로의 농축이 쉬운 장점이 있다. 물론 adenoviral vector는 21일정도만 지속되는 transgene발현이 문제이나<sup>19)</sup> 이를 해결할 여러 방법에 대한 연구도 진행되고 있다<sup>20)</sup>. 좌골신경 또는 근육으로의 adenovirus의 투여에 의해 말초신경으로 유전자이입에 대한 여러 연구가 있어왔다<sup>21,22)</sup>. 본 연구에서는 adenovirus 매개의 BDNF 유전자이입을 이용한 방법으로 기존의 적정 농도라고 밝혀진 단순 BDNF만 투여한 경우와 비교하기는 어렵겠으나 adenoviral BDNF가 투여된 쥐에서 특별한 합병증 없이 신경재생이 이루어진 것으로 보아 유효한 정도인 것으로 사료되었다.

정상적인 안면신경은 BDNF의 수용체인 *trkB* mRNA의 distinct signals을 나타내는 것으로 알려져 있으며 axotomy후 BDNF mRNA가 8시간내에 급격히 증가하고 손상 2일 후 모든 안면신경이 높은 양의 BDNF mRNA를 나타낸다고 보고되었다. 그러나 이러한 BDNF gene의 발현은 일시적이며 4일째에 감소되기 시작하여 7일째부터 14일까지에 걸쳐 거의 최저한도(baseline)에 도달한다고 보고되었는데<sup>23)</sup>, Axotomized motoneurons에서 BDNF, *trkB*, 그리고 *p75*가 급격하게 상승하며, BDNF가 자가분비(autocrine) 또는 이웃분비(paracrine)의 기능을 할 수 있을 것으로 보이므로<sup>24)</sup> 외부에서의 투여는 이웃분비의 기능에 도움을 줄 것으로 생각된다.

본 연구에서는 전기생리학적 검사에서나 안면신경 기능검사에서 30일에서 실험군과 대조군 사이에 유의할 만한 차이가 있는 것으로 밝혀졌고 실험군이나 대조군에서 모두 시간이 경과됨에 따라 각 시간 사이의 비교를 보면 유의하게 회복되는 것으로 보였다. 또한 축삭밀도 측정에서도 30일에서 실험군과 대조군 사이에 유의할 만한 차이가 있고 특기할 만한 것은 대조군의 경우는 시기별 차이가 없으나 실험군에서는 시기별 상승이 보인다는 점이며 연구에 사용된 쥐의 수가 많지 않아 모두 그렇게 되리라 볼 수는 없으나 40일군에서 오히려 둔화되는 양상을 보이는 것으로 보아 본 연구에 쓰인 압박손상방법의 최고 회복시점은 약 30-40일사이인 것으로 생각되었다. 안면신경 압박손상과 관련해서 회복시점에 따른 한 보고에 따르면 손상 후 특별한 조작을 가하지 않았을 때도 대략 13일경에 회복이 되는 것으로 보고하고 있으나 이 경우는 본 실험에 사용한 압박손상방법과 비교해 볼 때 압박손상의 강도가 경미한 것으로 보이며, 흥미로운 점은 neuronal labeling을 통한 이 연구에서 초기단계(2-6일)에 염색정도의 상승이 후기(6-16일)에서의 상승속도보다 크다는 것이다<sup>25)</sup>. 이 것은 전기한 연구<sup>25)</sup>에서의 BDNF 유전자발현의 변화의 시점과 일맥상통하는 것으로 보인다. 압박손상은 당연히 절단손상보다는 완전히 회복되어

지는 시점이 빠를 것으로 기대되나 압박손상의 강도에 따라서도 차이가 있을 것으로 생각된다. 따라서 압박손상시 초기단계인 2-6일 시점에서의 본태적 BDNF 발현을 어떻게 지속적으로 유지시키며 더 공급해줄 수 있는지가 손상회복의 관건이라 할 수 있겠다. 손상의 정도와 관련해서는 이를 모의할 여러 방법들이 있으나 혈관 clamp를 이용하여 시간에 따라 시간이 길수록 손상의 강도가 더 크음을 보고한 바 있다<sup>26)</sup>. 본 연구에서는 약 30초간의 crush를 주는 것으로 되어 있으나 통상의 보고에서의 jeweler forcep이나 aneurysmal clip등과는 다른 혈관점자(mosquito)를 사용하였으므로 직접적 시간 비교는 할 수 없을 것으로 사료되나 전기한 연구<sup>26)</sup>에서의 120초-180초에 걸쳐 시행하여 발생된 불완전 또는 완전마비상태에 준하거나 더 심한 손상 정도라 여길 수 있을 것이다.

BDNF의 지속적인 유리라는 측면에서 생체내 adenovirus 효과의 지속은 필수적이며 cyclosporine A나 FK506의 동시 투여가 중추신경계에서 유전자 지속발현을 연장시키는 데 효율적이라는 보고가 있고 특히 중추신경계를 대상으로 하는 연구에서 astrocyte에서 BDNF의 mRNA와 단백질의 upregulation이 FK506의 neuroprotective action과 관련이 있을 것이라는 보고가 있다<sup>27)</sup>. 이를 토대로 이런 면역억제제와 adenovirus 매개 BDNF유전자 전달이 말초신경계에서 상승 효과를 발휘할 것이라는 기대도 해본다. 안면신경의 손상은 말초신경계의 손상 중에 아주 치명적인 것에 해당한다. Adenovirus 매개 BDNF 유전자 이입방법이 여러 단점에도 불구하고 숙주에 유해한 영향을 주지 않고 안정된 방법으로 정착된다면 안면신경손상회복에 새로운 장이 열릴 것으로 생각된다.

## V. 결 론

전반적으로 실험군(BDNF-adenovirus injection을 한 군)에서 40일에 걸쳐 관찰한 결과 신경재생을 촉진시키는 경향이 있었으며 30일째에 명확히 대조군에 비해 신경재생이 촉진되었다. 본 연구에서 안면신경의 압박손상모델에서 통해 Adenovirus 매개 BDNF 유전자이입은 대략 술 후 30일 경에서 성공적으로 기능회복을 유도함을 확인할 수 있었다.

## 참고문헌

- Petit F, Paraskevas A, Minns AB, Lee WP, Lantieri LA: Face transplantation: where do we stand? *Plast Reconstr Surg* 2004;113:1429-1433.
- Gimenez Ribotta M, Revah F, Pradier L, Loquet I, Mallet J, Privat A: Prevention of motoneuron death by adenovirus-mediated neurotrophic factors. *J Neurosci Res* 1997;48:281-285.
- Hadlock TA, Heaton J, Cheney M, Mackinnon SE: Functional recovery after facial and sciatic nerve crush injury in the rat. *Arch Facial Plast Surg* 2005;7:17-20.
- Mattsson P, Janson AM, Aldskogius H, Svensson M: Nimodipine promotes regeneration and functional recovery after intracranial facial nerve crush. *J Comp Neurol* 2001;437:106-117.
- Adams JH DL, eds. *Greenfield's Neuropathology*. New York: NY: Oxford University Press; 1992.



6. Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL: Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991;66:807-815.
7. Barde YA, Edgar D, Thoenen H: Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *Embo J* 1982;1:549-553.
8. Oppenheim RW, Yin QW, Prevet D, Yan Q: Brain-derived neurotrophic factor rescues developing avian motoneurons from cell death. *Nature* 1992;360:755-757.
9. Sendtner M, Holtmann B, Kolbeck R, Thoenen H, Barde YA: Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature* 1992;360:757-759.
10. 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.
11. Yan Q, Elliott J, Snider WD: Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death. *Nature* 1992;360:753-755.
12. Markus A, Patel TD, Snider WD: Neurotrophic factors and axonal growth. *Curr Opin Neurobiol* 2002;12:523-531.
13. Meyer M, Matsuoka I, Wetmore C, Olson L, Thoenen H: Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *J Cell Biol* 1992;119:45-54.
14. Funakoshi H, Frisen J, Barbany G, Timmusk T, Zachrisson O, Verge VM, Persson H: Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *J Cell Biol* 1993;123:455-465.
15. Shirley DM, Williams SA, Santos PM: Brain-derived neurotrophic factor and peripheral nerve regeneration: a functional evaluation. *Laryngoscope* 1996;106:629-632.
16. Jones LL, Oudega M, Bunge MB, Tuszynski MH: Neurotrophic factors, cellular bridges and gene therapy for spinal cord injury. *J Physiol* 2001;533:83-89.
17. Poduslo JF, Curran GL: Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Brain Res Mol Brain Res* 1996;36:280-286.
18. Koda M, Hashimoto M, Murakami M, Yoshinaga K, Ikeda O, Yamazaki M, Koshizuka S, Kamada T, Moriya H, Shirasawa H, Sakao S, Ino H: Adenovirus vector-mediated in vivo gene transfer of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes rubrospinal axonal regeneration and functional recovery after complete transection of the adult rat spinal cord. *J Neurotrauma* 2004;21:329-337.
19. Peltekian E, Parrish E, Bouchard C, Peschanski M, Lisovoski F: Adenovirus-mediated gene transfer to the brain: methodological assessment. *J Neurosci Methods* 1997;71:77-84.
20. Smith GM, Romero MI: Adenoviral-mediated gene transfer to enhance neuronal survival, growth, and regeneration. *J Neurosci Res* 1999;55:147-157.
21. Hermens WT, Giger RJ, Holtmaat AJ, Dijkhuizen PA, Houweling DA, Verhaagen J: Transient gene transfer to neurons and glia: analysis of adenoviral vector performance in the CNS and PNS. *J Neurosci Methods* 1997;71:85-98.
22. Haase G, Pettmann B, Vigne E, Castelnuovo-Ptakhine L, Schmalbruch H, Kahn A: Adenovirus-mediated transfer of the neurotrophin-3 gene into skeletal muscle of pmn mice: therapeutic effects and mechanisms of action. *J Neurol Sci* 1998;160 Suppl 1:S97-105.
23. Kobayashi NR, Bedard AM, Hincke MT, Tetzlaff W: Increased expression of BDNF and trkB mRNA in rat facial motoneurons after axotomy. *Eur J Neurosci* 1996;8:1018-1029.
24. 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.
25. Kamijyo Y, Koyama J, Oikawa S, Koizumi Y, Yokouchi K, Fukushima N, Moriizumi T: Regenerative process of the facial nerve: rate of regeneration of fibers and their bifurcations. *Neurosci Res* 2003;46:135-143.
26. Sugita K, Hirota T, Iguchi I, Mizutani T: Comparative study of the pressure of various aneurysm clips. *J Neurosurg* 1976;44:723-727.
27. Zawadzka M, Kaminska B: Immunosuppressant FK506 affects multiple signaling pathways and modulates gene expression in astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 2003;22:202-209.