

신생원쥐의 알콜성 뇌손상 후 환경강화가 BDNF 발현 및 운동수행력에 미치는 영향

대구대학교 대학원 재활과학과 물리치료학전공

이선민, 구현모

대구대학교 물리치료학과

김진상

Effects of Enriched Environment on Expression of BDNF and Motor Performance after Alcohol-induced Brain Injury in Neonatal Rats

Lee, Sun-Min, P.T. · Koo, Hyun-Mo, P.T., M.S.

Major in Physical Therapy, Dept. of Rehabilitation Science, Graduate School, Daegu University

Kim, Jin-Sang, D.V.M., Ph.D.

Department of Physical Therapy, College of Rehabilitation Science, Daegu University

<Abstract>

Alcohol exposure during development leads to significant long-term neurobehavior dysfunction and central nervous system alteration. The purpose of this study was to determine the effects of enriched environment in developmental period through motor behavior test and expression of BDNF. Neonatal rat exposed to alcohol on postnatal days 4 through 10 were studied. Female Sprague-Dawley pups were assigned to two groups. Experimental group(EG) via 4.5 g/kg-day-1 of ethanol was housed in enriched environment for 9 weeks.

The main result of this study were as follows:

1. There was significant difference in the mean of weight change between control and experimental group.
2. In motor behavior test, there was significant difference in the mean of weight change between control and experimental group.
3. Regarding the immunoreactivity of BDNF were higher appeared experimental group than control group.

In conclusion, the present results reveals that enriched environment in developmental period is to be extremely useful in neuronal reorganization and motor behavior improvement after alcohol exposure.

I. 서론

태아알콜증후군(fetal alcohol syndrome : FAS)은 임신한 산모의 지속적인 알콜섭취로 인해 신생아가 정신적·신체적 장애를 일으키는 것을 말한다. 자궁환경내에서의 알콜노출은

발생과정에 있는 태아의 뇌에 불가역적인 손상을 야기하여 인지기능, 운동수행력, 사회 및 정서행동의 조절의 발달에 영향을 미칠 수 있다(Hannigan과 Berman, 2000; Cook, 2003).

1973년 Jones와 Smith는 태아알콜증후군(FAS)의 진단을 위해 태아기나 신생아기에 체중이나 키 및 머리둘레에서 나타나는 성장지연과 신경학적인 비정상, 정신지체나 발달지연과 같은 중추신경계의 손상 및 안면기형을 태아알콜증후군(FAS)의 3가지의 진단 기준으로 제안하였다. 또한 태아알콜증후군(FAS)의 진단시 요구되는 안면기형과 같은 특징적인 증상을 보이지는 않지만 태아내 알콜노출의 경험으로 인해 신경발달학적 장애를 나타내는 알콜 관련 신경발달장애(alcohol-related neurodevelopmental disorder : ARDN)와 인지장애, 과활동성 및 운동장애를 나타내는 태아알콜영향(fetal alcohol effect : FAE)을 나타내는 아동들도 있다(Coles 등, 1997; Mattson 등, 1998 a, b; Streissgut, 1998; Klintsova, 2002).

태아알콜증후군의 출생률에 관한 연구가 우리나라에서는 미비한 실정이지만 미국의 경우 1000명당 0.5명에서 5.6명꼴로 매우 높게 나타나며, 안면기형과 같은 특징적인 증상을 나타내지는 않지만 자궁내 알콜노출로 인해 장애를 안고 태어난 태아알콜효과(FAS)나 알콜관련 신경발달장애(ARDN) 아동의 출생률까지 포함한다면 발생률은 신생아 1000명당 9.1명에 이른다. 이는 다운증후군 출생률의 10배에 해당되는 수치로 매년 수천명의 아동들이 알콜로 인해 일생동안 장애에 직면하게 된다(Sampson, 1997; Cook, 2003).

태아기동안의 알콜노출로 인해 정상적인 발달프로그램에 손상을 입은 태아알콜증후군(FAS) 아동들과 알콜관련 신경발달 장애(ARDN) 아동들은 신경세포의 소실, 뇌의 부피감소, 소녀의 형성부전(hypoplasia), 뇌량의 발육부전(agenesis) 및 살아남은 신경 세포사이의 신호 전달 변화나 비정상적인 연결 및 가소성의 약화로 인해 지속적인 기능장애를 나타낸다(Hannigan, 2000; Maier 2001 ; Goodlett, 2001; Climent, 2002; Wright, 2003). 즉, 지능의 저하, 집중력 결손, 과활동성, 학습과 기억의 손상, 균형 및 손-눈 협응력의 장애와 보행의 장애와 같은 기능들에 광범위한 문제점을 나타내며, 뇌성마비나 정신지체의 증상을 나타낼 확률이 높다(Marcus 등, 1987; Barr 등, 1990; Coles 등, 1997; Mattson 등, 1998; Roebuck 등, 1998 a, b, c; Goodlett 등, 2001, Klintsova 등, 2002).

동물모델을 이용한 기초적 연구가 태아알콜증후군을 위한 재활프로그램을 개발하는데 있어 도움을 줄 수 있다. 최근의 몇몇 연구들은 알콜에 노출된 흰쥐를 이용하여 초기의 'handling'의 경험과 강화된 환경이 생리학 및 구조적인 신경가소성의 촉진에 미치는 영향에 관한 연구가 이루어지고 있다(Klintsova 등, 1997). 신경가소성은 발달과정에 있는 뇌의 알콜성 손상을 개선시켜 뇌의 기능을 향상시키고 촉진시키는 잠재적으로 치료에 유의한 효과가 있다. 특히 가소성은 일생을 거쳐 신경계가 가질 수 있는 특성으로 학습, 발달, 손상으로부터의 회복과 관련된 많은 기전에서 특히 강조되어왔다.

신경계 가소성에 중요한 역할을 하는 신경영양성 인자들의 발현은 매우 중요하다. 이러한 신경영양성 인자들은 신경연접의 강화와 신경계의 발생, 기억, 손상 후 재생과정에서도 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있는데 대표적인 인자로는 BDNF, NGF, NT-3, NT-4/5 등이 있다. 이러한 신경영양성인자는 수입성 연접의 형태와 수를 조절함으로써 신경원의 생존, 발생기의 분화, 세포운명의 선택에 영향을 줄뿐만 아니라, 신경돌기의 형태와 성숙기 이후의 신경연접의 강화에 작용한다(권영실, 2001; Hyman 등, 1991; Ip 등, 1993; Bothwell, 1995).

특히 BDNF는 해마, 피질, 선조체, 척수 등의 신경원에 폭넓게 분포하는 인자로 tryosin kinase receptor(Trk) B로 알려진 Low-affinity p75 수용체와 결합하여 활성화되어 신경원

의 생존과 선택적인 분화를 증진시킨다. 예를 들면, BDNF는 somatostatin, substance P, neuropeptide Y와 cholecystokinin과 같은 특별한 neuropeptide의 발현을 자극하기 때문에 GABA-containing neuron을 위한 peptidergic differentiation factor로써 작용할 뿐만 아니라 calcium-binding protein의 발현을 조절하는 것으로 보고되었다(Chao, 1992; Barbacid, 1994; Bothwell, 1995). 또한 BDNF는 비활동 synapse의 성숙을 조절하며(Isaac 등, 1997), 피질의 수지상돌기와 시상으로부터 구심성 섬유를 증가시켜 시냅스의 수를 증가시키는데 관여하여 결과적으로 비활동 synapse를 만들기 위해 적합한 발화를 증가시키게 된다.

강화된 환경이나 복합 환경에서 사육된 동물들은 중추신경계의 발달과 손상후 회복을 촉진시킬 뿐만 아니라 행동학적 수행력을 강화시킨다. 또한 강화된 환경에서 사육된 흰쥐는 효소의 수준(enzyme level), 피질의 두께, 가지돌기의 가지치기(dendrite spines 및 branching), 신경연접의 접촉 및 전달(transmission), 신경세포의 크기가 증가되어 학습이나 기억력이 강화된다(Olsson, 1994; Ohlsson, 1995).

환경적인 강화는 기억 및 학습능력을 향상시킬 뿐만 아니라 조롱박세포의 가지돌기 가지치기(dendritic branching)와 신경연접 전 소포(presynaptic vesicle)를 증가시키고 신경연접형성(synaptogenesis)의 촉진에 관여한다. Frick와 Fernandez (2002)는 환경적인 강화가 주어진 흰쥐에서 공간기억이 증가될 뿐만 아니라 신경연접단백질의 증가를 보고한 바 있다.

뇌손상으로 인한 신경행동학적 장애를 치료하기 위한 다양한 중재들이 이루어지고 있으나 태아알콜중후군(FAS) 아동들에게 적용할 적절한 치료적 중재의 개발은 시급한 실정이다. 또한 환경적인 강화를 통한 중재가 기능적인 회복에 기여하는지를 운동행동학적 측면과 분자생물학적 측면에서 객관적으로 규명할 필요가 있다.

따라서 본 연구는 중추신경계의 발생시기 동안 알콜의 노출로 인해 뇌의 발생에 손상을 입은 흰쥐에게 환경강화를 통한 운동기능의 변화를 평가하고 분자 및 세포수준에서 신경영양성인자인 BDNF의 발현을 관찰하여 정량적으로 분석하고자 한다. 이로서 다양한 자극 입력과 활동을 제공할 수 있는 강화된 환경이 운동기능 및 BDNF의 발현에 미치는 효과를 객관적으로 규명하고자 한다.

본 연구는 태아내 알콜 노출로 인해 뇌에 손상을 입은 아동들에게 환경강화를 통한 조기 중재의 효과에 관한 치료적 근거를 마련할 뿐만 아니라 새로운 치료적 운동방법에 접근할수 있는 토대를 마련해 줄 것으로 기대된다.

II. 연구 방법

1. 실험동물

본 연구에 이용된 실험동물은 생후 8-10주, 체중 250-300g의 건강한 자성 흰쥐에서 태어난 생후 4일된 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였다. 먼저 임신연령 22일인 출생일 즉 생후 0일을 기준으로 생후 4일된 흰쥐에게 생후 10일까지 7일동안 알콜을 경구적으로 주입하였다.

실험 기간중 알콜을 주입하는 시간을 제외하고는 모성흰쥐와 함께 사육하여 스트레스를 최소화하였고, 실험실의 온도는 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, 습도는 $50\pm 2\%$ 로 유지하였다. 실험기간중 물과 먹이는 제한없이 공급하였고 1일 광주기와 암주기를 각각 12시간으로 조절하였다.

본 연구에 이용될 모체는 총 3마리로, 건강한 음성 어린쥐 12마리가 무작위 추출되어 이용

되었고 실험군 및 대조군은 각각 6마리가 이용되었다.

2. 실험방법

1) 알콜적용

3마리의 모체에서 태어난 신생쥐를 출생일을 생후 0일로 하여 생후 4일된 신생쥐를 2그룹 즉 대조군 및 실험군으로 무작위 분류하여 경구적으로 알콜을 투여하였다. 알콜 주입방법은 Klintsova 등(2002)과 Hsiao 등(2002)의 연구에서 사용한 방법을 수정하여 11%(v/v)의 에탄올이 포함된 우유 유동식(4.9g/kg/day)을 하루에 두 번 2시간 간격으로 경구용 존데를 이용하여 주입하였다.

알콜은 생후 4일부터 생후 10일까지 7일간 투여하였으며 실험동물들은 알콜을 투여하는 시간을 제외하고는 모체와 함께 사육하여 스트레스를 최소화하였다.

2) 환경강화

본 실험에서는 강화된 환경조건에서 자유롭게 움직일 수 있도록 하였으며 권도윤(2001)과 Kleim 등(1997)의 연구에서 사용된 환경강화방법을 수정하여 균형 및 협응력과 다양한 감각 입력을 증진시킬 수 있는 환경으로 구성하였다.

강화된 환경 조건은 900×600×600mm 크기의 철판으로 골격으로 구성된 사육장에 내부에는 길이 110m, 폭 50m의 막대로 경사판을 양쪽에 설치하였고, 또한 사육장의 정중앙에는 300×200mm 크기의 그물망을 설치하였다. 그리고 한쪽 면에는 직경 210mmdml 쳇바퀴를 설치하였고 바닥에는 나무로 된 다양한 모양의 장난감을 배치하였다.

실험군의 동물들은 알콜 주입이 끝난 후 10일이 경과한 이후 즉, 생후 20일부터 모체와 함께 환경이 강화된 사육장에서 사육하였다. 환경강화 사육장에서는 생후 9주까지 사육하여 실험결과를 측정하였다.

3. 결과 측정

1) 체중의 변화

신생기 초기에 알콜을 처치한 실험동물내에서 환경적인 강화를 적용한 실험군과 아무런 중재도 적용하지 않은 대조군 및 알콜을 주입하지 않은 표준 사육장에서 사육된 정상군을 대상으로 일반적인 성장지표로 고려되는 체중의 변화를 검사하였다. 먼저, 알콜을 처치하기 직전 즉, 생후 4일에 체중을 측정한 후 알콜을 마지막으로 처치하는 생후 10일에 측정하였다. 그리고 9주가 경과한 즉 생후 84일에 각각 측정하여 환경강화로 인한 체중의 변화를 살펴보았다.

2) 운동행동학적검사

신생기 초기에 알콜을 주입한 후 환경강화를 통한 치료적 중재가 운동기능에 미치는 영향을 다양한 운동기능 검사를 통해 측정하였다. 검사는 동일한 검사자에 의해 평가되었고 3회 실시한 이후 3번째 값을 기록하였다.

(1) Beam-walking test

운동의 통합성과 협응성을 검사하기 위하여 Goldstein(1990)의 검사방법을 수정하여 실시하였다. 바닥에서 1m의 높이에 있는 두 개의 테이블에 길이 181cm, 폭 1.5cm의 막대를 걸쳐 놓고 검사를 실시하였다. 막대의 끝에는 20 cm × 25 cm × 25cm 크기의 암실을 연결하여 실험동물을 유인하였다. 점수는 올려 놓자마자 떨어지면 0점, 막대를 건너갈수는 없지만 그 위에 앉아 있으면 1점, 걷다가 떨어지면 2점, 막대를 건너갈 수는 있으나 50%이상 미끄러지면 3점, 막대를 건널 때 20% 이하로 미끄러지면 4점, 전혀 미끄러지지 않으면 5점을 주었다.

(2) Rope climbing test

일반적으로, 앞다리와 뒷다리의 움직임이 협응을 이루지 못하는 동물들은 Rope climbing 과제를 수행에 어려움을 가지므로 알콜로 인해 손상을 입은 동물들의 앞다리와 뒷다리의 움직임의 협응력을 검사하기 위해 Klintsova 등(1998)의 연구에서 실시한 방법을 수정하여 실시하였다. 직경이 1.9cm rope를 지면위 1m에 수직으로 배치한 후 2.5cm의 rope의 절반까지 오르도록 전훈련을 실시한 후 검사를 실시하였다.

전체 rope를 완전히 오르는데 걸리는 시간을 기록하고 검사자가 다음과 같이 점수를 주었다. 검사자의 도움이나 강화가 없이 완벽하게 수행하면 5점, 오르기 시작하는 시점에서 약간의 강화가 주어지면 4점, 강한 강화가 주어지면서, 강화가 중단되었을 때 내려오기를 시도하면 3점, 오르는 동안 지속적인 강화가 주어지면 2점, 오르지 못하거나 rope를 잡고있거나 미끄러지는 경우 1점을 주었다.

3) 조직학적검사

(1) 관류 및 조직 처리

각 실험동물들은 운동행동학적 검사를 모두 실시한 후 염산케타민(Ketamin HCL, 유한양행)과 Xylazine hydrochloride(Rompun, 바이엘코리아)를 1:1의 비율로 섞은 전신마취제를 복강내 주사(2ml/kg)하여 마취한 후 흉강을 열고 cannula를 좌심실을 통하여 오른대동맥에 삽입하였다. 이어 관류수세기(MASTERFLEX, Cole-Parmer Instrument Co., USA)를 이용하여 0.9% NaCl로 관류 수세한 후 0.1M phosphate buffer(PB)에 녹인 4% Paraformaldehyde를 이용하여 관류전고정을 실시하였다. 그 이후 뇌신경을 제거한 뇌를 적출하여 대뇌를 분리한 후 4% Paraformaldehyde 용액에 4℃에서 24시간 동안 침전시켜 후고정을 실시하였다. 후고정이 끝난 조직은 30% sucrose 용액에서 24시간동안 침전시킨 후 극저온 냉동기(freezing microtome)를 이용하여 -40℃ 냉동 상태에서 25 μ m 두께로 관상면에서 절편을 제작하였다.

(2)면역조직화학적 검사

25 μ m 두께로 관상면에서 제작된 뇌 절편은 BDNF의 발현을 관찰하기 위해 면역조직화학적 반응을 검사할 실시하였다. 모든 과정동안 free-floating section을 사용하여 실시하였고 동일

한 환경에서 시행되었다. 항체의 수세와 희석은 0.2% Triton X-100이 포함된 0.01M PBS를 이용하였다. 먼저 조직내의 비특이적인 면역반응을 최소화하기 위하여 5% normal goat serum(Sigma)으로 실온에서 30분간 전처리를 실시하고 항체가 포함된 모든 용액에 2.5% normal goat serum을 첨가하였다. 전처리가 끝난 조직은 ABC(avidin-biotin complex)법을 이용하여 다음과 같이 실시하였다. 먼저 1 : 500로 희석된 1차항체인 monoclonal antibody against BDNF 용액을 사용하여 4°C에서 24시간동안 배양하였다. 이후 PBS로 조직을 수세한 후 2차항체인 goat anti-mouse IgG(1:150)로 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 수세한 후 3차항체로 Vectastatin Elite ABC Regent(Vector, USA)로 실온에서 1시간 동안 반응시킨후 PBS로 수세하였다. 수세가 끝난 조직은 PBS 용액에 0.03%의 H₂O₂가 포함된 0.3%의 DAB(3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) 용액에 담귀 실온에서 10분간 발색 과정을 거친후 PBS로 수세하였다. 이후 젤라틴(gelatin)으로 코팅된 슬라이드에 올려 탈수와 청명과정을 거친후 마지막으로 PMM(Permounting media)인 clarion(Biomed, USA)을 이용하여 cover glass로 봉입하였다.

(3) 항체 양성반응 세포 수 분석

광학현미경(Olympus Bx 50, Japan)을 통한 조직 영상은 광학현미경에 장착된 CCD 카메라(Toshiba, Japan)와 개인용 컴퓨터를 연결시켜 자료전송을 실시하였으며, 디지털 영상화된 자료는 Image-pro plus ver 4.0 for windows(media cybernetics, USA)를 이용하여 촬영 및 영상분석(image analysis)을 시행하여 형태학적 관찰을 실시하였다. 면역조직화학적 반응은 bregma -2.80 영역에서 관찰하였으며, 일차운동피질, 일차체성감각 피질, 이차체성감각 피질에서 관찰하였다.

4. 결과처리 및 분석

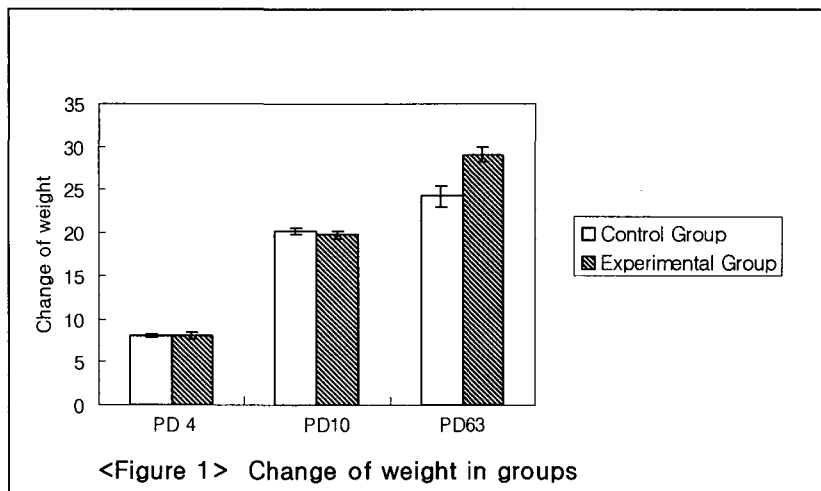
각 검사에서 얻어진 결과는 기술통계학적 분석을 통해 각 집단에서의 측정값을 평균 및 표준오차로 기술하였다. 운동행동학적 검사 및 조직학적 검사의 결과는 각 그룹간의 차이를 살펴보기 위하여 t-검정을 실시하였다. 모든 통계처리는 SPSS win 10.0을 이용하여 실시하였으며 유의수준 α 는 .05로 하였다.

III. 실험 결과

1. 체중의 변화

신생원쥐에게 알콜 주입으로 뇌손상을 야기한 후 성장과정에서 주어진 환경강화가 일반적인 성장지표로 고려되는 체중의 변화에 영향을 미치는지를 관찰하였다. 출생후 4일에 측정된 초기 측정치와 알콜 주입이 끝난 생후 10일에 측정된 체중에서 실험군과 대조군간에는 유의한 차이를 관찰할 수 없었다. 이는 알콜로 인한 체중변화에 있어 실험군과 대조군은 동일한 양상을 보였음을 의미한다.

그러나 알콜주입이후 환경강화로 인한 체중변화의 유의성을 살펴본 결과 생후 9주에 환경이 강화된 사육장에서 사육한 실험군은 24.3±1.2를 나타냈고, 일반적인 표준사육장에서 사육한 대조군은 29.1±0.9를 나타내 그룹간에 유의한 차이를 나타냈다($p < .05$)(Fig 1).



2. 운동 행동학적 결과

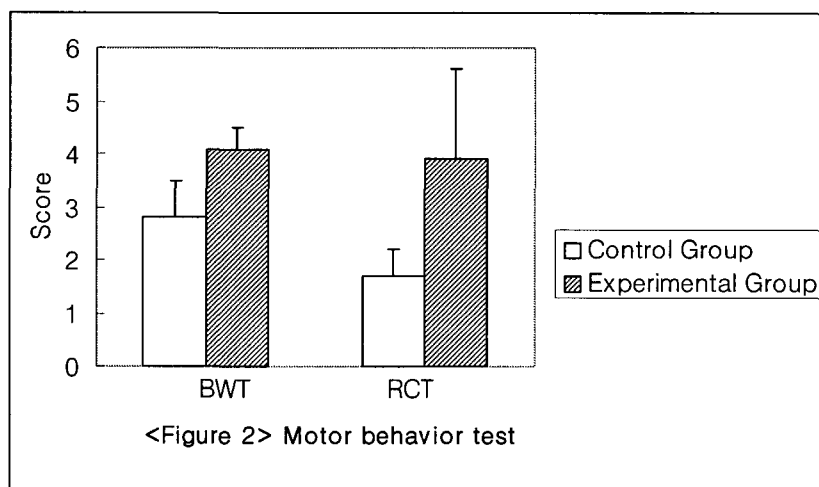
신생기 초기에 알콜적용으로 인해 정상적인 뇌발달에 손상을 입은 흰쥐에게 환경강화를 적용한 후 운동행동학적검사를 통한 운동기능의 평가에 관한 실험결과는 다음과 같다(Fig 2).

1) Beam-Walking test(BWT)

Beam-Walking 검사를 실시한 결과 대조군이 2.8 ± 0.8 점을 보였고, 환경이 강화된 사육장에서 사육한 실험군은 4.1 ± 0.5 점을 나타내 실험군과 대조군간에 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다($p < .05$)

2) Rope climbing test(RCT)

앞다리와 뒷다리의 움직임이 협응성과 운동 수행력을 평가하기 위해 Rope climbing 검사를 실시한 결과 대조군이 1.7 ± 0.4 점을 나타냈고, 실험군은 3.9 ± 1.3 을 나타내 환경강화로 인한 실험군과 대조군간의 점수차에는 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다($p < .05$).



3. 면역조직화학적 결과

신생 흰쥐의 알콜성 뇌 손상후 일반적인 실험실 환경에서 사육한 대조군과 강화된 환경에서 8주간 사육한 실험군의 대뇌를 분리하여 면역조직화학법을 실시하여 BDNF의 발현 정도를 관찰한 결과는 다음과 같다. 강화된 환경에서 사육된 실험군은 대조군에 비해 일차운동 피질 영역(Fig 3, 4)과 일차체성감각피질(Fig 5, 6) 및 이차체성감각피질영역(Fig 7, 8)에서 BDNF의 면역반응이 더욱 높게 나타났다.

IV. 고찰

본 연구는 생후 4일된 흰쥐에게 알콜성 뇌손상을 야기한 이후 환경강화를 통한 조기중재가 흰쥐의 운동행동학적 양상과 신경영양성 인자중의 하나인 BDNF의 발현에 영향을 미치는지를 살펴보았다.

생후 4일된 흰쥐는 사람의 뇌발달 단계 중 임신 3기에 해당되는 시기로서 태아알콜 증후군을 연구하기 위한 동물모델에서 널리 이용되고 있다. 생후 10일된 흰쥐는 제대 36주에서 40주된 유아의 뇌발달에 해당되며, 3주된 쥐는 2세 소아에 해당되고, 6개월된 쥐의 뇌발달은 성인의 뇌에 해당된다. 이에 본 연구에서는 많은 선행연구자들의 연구에서 이용된 생후 4일에서 10일경에 알콜을 주입하여 연구를 실시하였다. 이 시기는 사람의 임신 말기에 해당되는 시기으로써 뇌의 급속한 발달이 이루어지는 시기이다.

Klintsova 등(1998)의 연구에 의하면 생후 4일에서 9일 사이에 알콜에 노출된 흰쥐에서 운동수행력의 감소가 나타나고 소뇌 과립세포에서 NMDA의 감소와 소뇌의 주요세포인 조롱박세포에 유의한 감소와 신경영양성 인자의 변화가 관찰된다고 하였다.

뇌 성장기의 알콜 독성에 대한 노출은 중추신경계의 세포사(apoptosis)를 통한 신경변성을 유발시켜 중추신경계의 발달에 영향을 미친다(Ikonomidou 등, 2000; Goodlett와 Horn, 2001). Olney(2000)의 연구에 의하면 알콜에 노출된 경험이 있는 흰쥐의 경우 정상적인 뇌 발달시기에 세포사(apoptosis) 하는 세포수의 15배 정도에 해당되는 뇌 세포가 파괴된다고 한다.

알콜에 의한 신경병리현상에 영향을 미칠 수 있는 조건으로는 저산소증(hypoxia), 저혈당증(hypoglycemic)이나 태아 환경내의 허혈, 과도한 산소유리기의 생성 및 내인성 항산화(endogenous protective antioxidant)의 감소 등을 들 수 있다(Davis, 1990; Kotch, 1995; Andrews 등, 1999; Agarwal, 1999). 1981년 Henderson 등은 태아알콜증후군을 발생시키는 기전을 에탄올의 mutagenicity에 초점을 맞추어 연구하였으며 Michaelis 등(1992)은 에탄올로 인해 야기되는 자궁내 영양분 전달, 저산소증 및 칼슘 조절 기전의 붕괴가 태아에 미치는 영향에 관해 연구하였다. 그는 에탄올이 세포 지질막으로 전달되어 이온채널과 단백질의 작용에 영향을 미치고, 특히 뇌에서 흥분성(glutamate) 및 억제성(GABA)의 아미노산 의존성 이온통로에 많은 영향을 미친다고 하였다.

또한 세포 손상이나 세포사(apoptosis)를 유발할 수 있는 칼슘 항상성의 변화와 세포의 대사변화 및 에탄올의 대사물질인 아세트알데하이드의 유해성으로 인한 손상이 있다. 임신기간 동안 알콜에 의한 태반 혈관의 수축으로 영양분 공급의 감소 및 정상적인 발달과정에 필요한 비타민 A와 엽산(folic acid)의 저하, CYP2E(cytocrom P-450 2E1)에 의한 ROS(reactive oxygen species)의 형성이 알콜 독성의 원인으로 제시되고 있다(Copani, 2001; Schoede, 2001).

그리고 알콜이 글루타메이트 수용체 중 NMDA 수용체의 cation channel을 억제시켜 학습과 기억 및 인지기능에 미치는 영향에 대한 연구도 활발히 진행중이다. Gruol(1988) 등은 뇌 성장이 활발히 진행되고 있는 신생아 시기의 알콜 노출은 소뇌 과립신경세포의 NMDA를 감소시킨다고 하였다.

발달과정에서 에탄올로 인한 신경독성과 관련된 중요한 기전의 하나로 신경영양성인자(NTFs)의 반응성 및 합성의 변화에 관한 연구들이 제시되고 있다. 에탄올로 인한 신경영양성인자(NTF)와 그 수용체의 변화를 연구한 몇몇의 연구에서는 출생전의 알콜노출로 인해 해마영역에서 신경성장인자가 일시적으로 증가되고 해마의 신경활성(neural activity)이 증가된다고 제시하고 있다(Luo, 1997). 반면 생후 초기의 알콜노출후 소뇌의 조롱박 세포의 가시돌기에서 신경영양성인자 수용체(NTF receptor) trkA 와 p75의 감소가 관찰되고, 에탄올의 취약성이 가장 높은 시기동안의 알콜 노출로 신생쥐의 소뇌에서 신경성장인자(NGF)의 양이 감소되는 것으로 알려져 있다(Velier, 1997). 또한 태아내 알콜 노출로 인해 BDNF와 NT3의 감소를 보고한 연구들도 있다(Marieta 등, 2000; Light 등, 2001, 2002)

뇌가 급속히 성장하는 생후 4-9일 동안 저용량(4.5g/kg)의 알콜을 매일 투여한 군과 고용량(6.6g/kg)의 알콜을 단기간 투여한 흰쥐들을 비교한 결과 매일 저용량의 알콜을 투여한 흰쥐의 뇌의 중량이 더욱 감소되고 뇌신경세포의 손상이 더욱 현저했다고 보고하였다(Hannigan 등, 2000). 또한 알콜의 농도가 높을수록 뇌의 중량이 감소되고 심한 소두증(microcephaly), 신경세포 손상, 과도한 활동이 보이는 행동장애와 공간개념의 장애가 발생되므로 알콜이 뇌에 손상을 야기하며 뇌신경세포를 세포사(apoptosis)한다고 보고하였다(Light 등, 2001).

따라서 본 연구에서는 선행연구자들의 연구를 분석하여 생후 4-10일 동안 저용량(4.5g/kg)의 알콜을 매일 투여하여 뇌의 발달에 손상을 입은 흰쥐에게 환경적인 강화를 통하여 손상 이후 행동학적 변화와 신경영양성 인자의 변화를 살펴보았다. 그 결과 강화된 환경이 알콜성 뇌 손상 이후 운동행동에 큰 영향을 미치며 뇌의 분자생물학적 변화 즉, 신경영양성 인자인 BDNF의 발현에도 영향을 미치는 것으로 나타났다. 알콜성 뇌 손상 이후 강화된 환경을 제공한 실험군의 경우 대조군에 비해 협응력과 균형 및 학습능력을 필요로 하는 운동행동학적 검사에서 대조군에 비해 높은 점수를 보였으며, 신경영양성인자인 BDNF의 발현 또한 높게 나타났다.

강화된 환경 속에서 생활한 흰쥐들이 일반적인 환경에서 생활한 흰쥐들에 비해 기능적 활동력이 뛰어나다는 것은 여러 연구를 통해 밝혀져 있으며, 기능적 활동력뿐만 아니라 신경성장인자와 신경성장인자수용기의 변화에도 영향을 미칠 수 있다(Varty 등, 2000; Pham, 1999). 또한 성숙기 이후 장난감이나 활동성 기구들을 갖춘 강화된 환경에서 다수 집단으로 길러지거나 생활한 동물의 경우 독립적인 생활을 하거나 소수의 집단으로 일반적인 실험실 환경에서 생활한 동물의 경우와 비교해서 신경돌기가 더 많은 가지를 내거나 단위 신경당 연접의 숫자가 더 많이 증가하였으며 이것은 영양성 인자에 대한 유전자 발현이 더 높게 나타난 것과 관련된 것으로 본 연구의 결과와 일치한다(권영실, 2001; Turner, 1985; Olsson, 1994; Ohlsson, 1995)

환경적인 자극이 인지 및 신경계 발달에 미치는 영향에 관한 연구에 의하면 강화된 환경이 두뇌의 발달에 영향을 미치며 강화된 환경에서 사육된 흰쥐는 효소의 수준(enzyme level), 피질의 두께, 가시돌기의 가지치기(dendrite spines 및 branching), 신경연접의 접촉 및 전달(transmission), 신경세포의 크기가 증가되어 학습이나 기억력이 강화된다고 한다.

본 연구에서 이용된 강화 환경은 기존의 사육환경에 비해 넓은 면적을 제공함으로써 여러 가지 신체활동과 쳇바퀴, 경사대, 철망등을 이용한 다양한 활동을 제공할 수 있어 운동을 유도할 통해 운동기능의 향상을 이끌 수 있었다. 운동기능의 향상의 중추신경계의 회복의 행동학적 증거로 볼 수 있다. 또한 신경영양성 인자인 BDNF는 신경의 생존, 축삭의 성장, 시냅스의 가소성등을 조절하는 물질로서 신경의 손상을 방지하고 축삭의 성장을 유도하여 기능적 회복에 기여한 것으로 이해된다.

신경계의 기능은 뇌의 발생과정 동안에 신경세포들이 서로 연결되어 형성되는 복잡한 신경망에 근거한다. 따라서 세포수준에서 보면 학습이나 기억 및 운동행동학적 훈련과 환경은 신경세포들을 서로 연결하는 신경연접의 연결강도를 변화시켜 새로운 신경망을 형성하는 과정이라 볼 수 있다. 즉, 신경연접의 연결강도(synaptic strength)는 고정된 것이 아니라 환경이나 훈련을 통해 수정되어 증감될 수 있는데 이러한 작용을 통해 기존의 신경망이 더욱 강화될 뿐만 아니라 새로운 신경망이 형성될 수 있다.

본 연구에서도 초기 신생기에 알콜로 인해 뇌 발달에 손상을 입은 흰쥐에게 환경의 강화를 통해 신경계의 강화를 이끌수 있음이 증명되었다. 향후 사람을 대상으로 한 연구를 통하여 태아내 알콜 노출로 인해 뇌에 손상을 입은 아동들에게 환경강화를 통한 조기중재의 효과를 보다 폭넓고 객관적으로 제시할 수 있는 다방면의 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

V. 결론

본 연구에서는 강화된 환경이 신생흰쥐의 알콜성 뇌 손상 후 운동기능 및 BDNF의 발현에 미치는 효과를 검증하기 위하여 실험을 실시하였다. 생후 4일된 흰쥐에게 7일간 즉 생후 10일까지 알콜을 경구적으로 주입한 후(4.9g/kg/day) 생후 9주까지 사육하여 실험결과를 측정하였다. 대조군은 일반 실험실 환경인 표준적 환경에서 사육하고 실험군은 환경이 강화된 사육장에서 사육하였다.

생후 9주에 강화된 환경에서 사육한 실험군과 일반 실험실 환경에서 사육한 대조군을 평가한 결과는 다음과 같다.

1. 신생흰쥐의 알콜성 뇌 손상 후 일반적인 표준 사육장에서 사육한 대조군에 비해 강화된 사육장에서 사육한 실험군이 체중이 높게 나타났다.
2. Beam-Walking test에서 실험군이 대조군에 비해 높은 운동수행력을 보였다.
3. Rope climbing test에서 실험군이 대조군에 비해 높은 운동수행력을 보였다.
4. 강화된 환경에서 사육된 실험군이 BDNF 면역조직화학 반응성이 대조군에 비해 높게 나타났다.

이상의 결과로 알콜성 뇌 손상을 입은 신생흰쥐에게 강화된 환경을 제공하는 것은 운동수행력을 증진시키고 신경영양성인자인 BDNF의 발현을 증진시키는 것으로 사료된다.

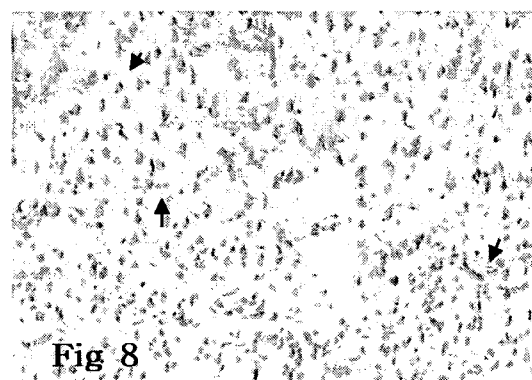
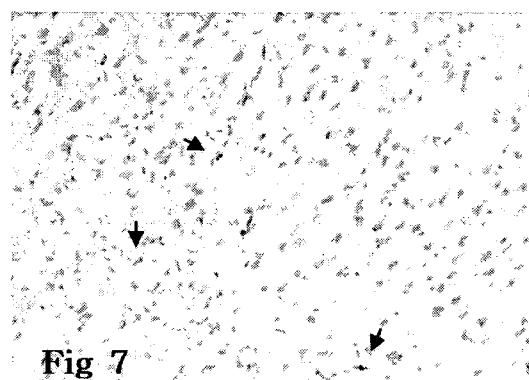
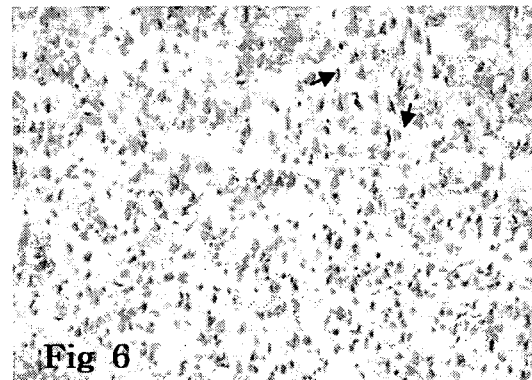
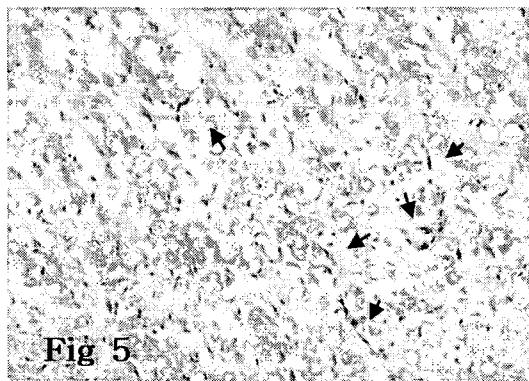
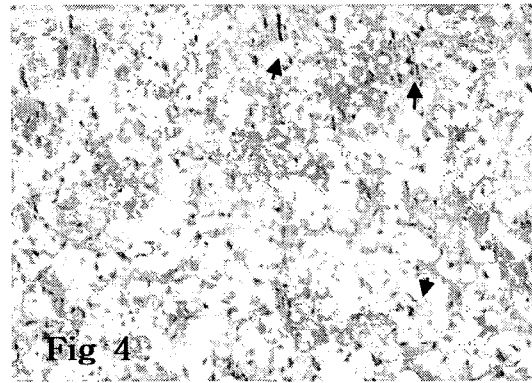
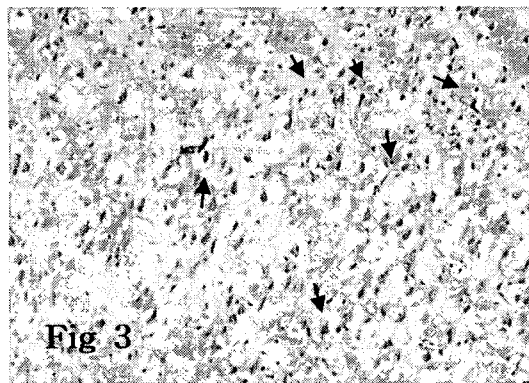
참고문헌

- 권영실 : 환경 적응 훈련이 흰쥐의 중대뇌동맥 폐쇄 후 운동 기능 및 BDNF와 pCREB 발현에 미치는 영향. 대구대학교 대학원 박사 학위 논문, 미간행, 2001.
- Andrews DL, Williams GS, Mahoney JC, & West JR : DNA fragmentation during exposure of rat cerebella to ethanol under hypoxia imposed in vitro. *J. Neurobiol.* 38; 82-92, 1999.
- Agarwal, Gupta A, & Shukla GS : Developmental pattern of reactive oxygen species generation and antioxidative defense machinery in rat cerebral microvessels. *Int. J. Dev. Neurosci.* 17; 673-679, 1999.
- Barbacid M : The Trk family of neurotrophin receptors, *J. Neurobiol.* 25; 1386-1403, 1994.
- Barr H, Streissguth AP : Prenatal exposure to alcohol, caffeine, tobacco and aspirin: effects on fine and gross motor performance in 4-year-old children. *Dev. Psychol.* 26; 339-348, 1990.
- Bothwell M : Functional interactions of neurotrophin and neurotrophin receptors, *Annu. Rev. Neurosci.* 18; 223-53, 1995.
- Chao MV : Growth factor signaling; Where is the specificity? *Cell.* 68; 995-997, 1992.
- Climent ME, Pascual J, Renau-Piqueras & Guerri C : Ethanol exposure enhances cell death in the developing cerebral cortex: role of brain-derived neurotrophic factor and its signaling pathways. *J. Neurosci. Res.* 68, 213-225, 2002.
- Coles KA, Platzman CL, Raskind-Hood RT, Brown A, & Smith : A comparison of children affected by prenatal alcohol exposure and attention deficit, hyperactivity disorder. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 21; 150-161, 1997.
- Cook JD : Biochemical markers of alcohol use in pregnant women. *Clinical Biochemistry* 35; 9-19, 2003.
- Copani A, Uberti D, Sortino MA, Bruno V, Nicoletti F, & Memo M : Activation of cell-cycle-associated proteins in neuronal death: a mandatory or dispensable path?. *Trends Neurosci.* 24; 25-31, 2001.
- Davis W, Crawford L, Cooper O, Farmer G, Thomas D, & Freeman B : Ethanol induces the generation of reactive free radicals by neural crest cells in vitro. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* 10; 277-293, 1990.
- Goodlett CR, & Horn KH : Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. *Alcohol Res. Health* 25; 175-184, 2001.
- Hannigan J, & Berman RF : Amelioration of fetal alcohol-related neurodevelopmental disorders in rats: exploring pharmacological and environmental treatments. *Neurotoxicol. Teratol.* 22; 103-111, 2000.
- Hyman C, Hofer M, Barde YA, Juhasz M, Yancopoulos GD, Squinno S, & Lindsay R. M : BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature.* 350; 230-232, 1991.
- Ikonomidou C, Bittigau PMJ, Ishimaru, DF, Wozniak C, Genz, Koch, KMT, Price V,

- Stefovska, F. Horster, T, Tenkova K. Dikranian & JW. Olney : Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 287; 1056-1060. 2000.
- Ip NY, Li Y, Yancopoulos GD, & Lindsay RM : Cultured hippocampal neurons show response to BDNF, NT-3, NT-4, but not NGF. *J. Neurosci*, 13; 3394-3405, 1993.
- Klintonsova AY, Scamra C, Melissa Hoffman, Napper MA, Goodlett CR, Greenough WT : Therapeutic effects of complex motor training on motor performance deficits induced by neonatal binge-like alcohol exposure in rats: : II. A quantitative stereological study of synaptic plasticity in female rat cerebellum, *Brain Research*, 937(1,2); 83-93, 2002.
- Klintonsova AY, Matthews JT, Goodlett CR, Napper A, & Greenough WT : Therapeutic motor training increases parallel fiber synapse number per Purkinje neuron in cerebellar cortex of rats given postnatal binge alcohol exposure: preliminary report. *Alcoholism Clin. Exp. Res.* 21; 1257-1263, 1997.
- Klintonsova A, Briones T, Hussain A, Weir B, Goodlett C, Napper R, & Greenough W.T : Plasticity of neurons in motor cortex after neonatal exposure to ethanol: effect of motor activity alone and complex motor learning. *Soc. Neurosci. Abstr.* 24; 1983, 1998.
- Kotch L, Chen S.-Y, & Sulik K : Ethanol-induced teratogenesis: free radical damage as a possible mechanism. *Teratology* 52; 128-136, 1995.
- Maier SE. & West JR : Regional differences in cell loss associated with binge-like alcohol exposure during the first two trimesters equivalent in rat. *Alcohol*, 23; 49-57, 2001.
- Marcus JC : Neurological findings in the fetal alcohol syndrome. *Neuropediatrics*, 18; 158-160, 1987.
- Mattson S, & Riley EP : A review of the neurobehavioral deficits in children with fetal alcohol syndrome or prenatal exposure to alcohol. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 22 ; 279-294, 1998.
- Mattson S, Riley EP, Gramling L, Delis DC, & Jones KL : Neuropsychological comparison of alcohol-exposed children with or without physical features of fetal alcohol syndrome. *Neuropsychology* 12; 146-153, 1998.
- Luo ., West JR, & Pantazis NJ : Nerve growth factor and basic fibroblast growth factor protect rat cerebellar granule cells in culture against ethanol-induced cell death. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 21; 1108-1120, 1997.
- Light KE. & Pierce DR : Timing of Purkinje cell apoptotic death following a single ethanol exposure on postnatal day 4 in rat. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 25; 32A, 2001.
- Light KE, Brown DP, Newton BW, Belcher SM, & Kane CM : Ethanol-induced alterations of neurotrophin receptor expression on Purkinje cells in the neonatal rat cerebellum. *Brain Res.* 924, 71-81, 2002.
- Ohlsson A-L, Johansson BB : Environmental influences functional outcome of cerebral infarction in rats, *Stroke*, 26; 4, 644-649, 1995.
- Olsson, Mohammed AH, Donaldson LF, Henriksson BF, Seckl JR Glucocorticoid receptor and NGFI-A gene expression are induced in the hippocampus after environmental enrichment in adult rat. *Molec Brain Res.* 23; 349-353. 1994.

- Pham TM, Ickes B, Albeck D, Soderstrom S, Granholm A-Ch, Mohammed AM : Changed in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year, *Neuroscience* 94(1); 279-286, 1999.
- Roebuck T, Mattson SN, & Riley EP. A review of the neuroanatomical findings in children with fetal alcohol syndrome or prenatal exposure to alcohol. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 22 ; 339-344, 1998.
- Roebuck T., Simmons RW, Mattson SN, & Riley EP : Prenatal exposure to alcohol affects the ability to maintain postural balance. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 22; 252-258, 1998.
- Roebuck T, Simmons RW, Richardson C, Mattson SN, & Riley EP : Neuromuscular responses to disturbance of balance in children with prenatal exposure to alcohol. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 22; 1992-1997, 1998.
- Sampson P, Streissguth AP, Bookstein FL, Little RE, Clarren SK, Dehaene, P. & Hanson JW, Graham J : Incidence of fetal alcohol syndrome and prevalence of alcohol-related neurodevelopmental disorder. *Teratology*, 56; 317-326, 1997.
- Schoedel KA, Sellers EM, & Tyndale RF : Induction of CYP2B1/2 and nicotine metabolism by ethanol in rat liver but not rat brain, *Biochemical Pharmacology*, 62(8); 1025-1036, 2001.
- Streissguth A, Bookstein FL, Barr HM, Press S, & Sampson PD : A fetal alcohol behavior scale. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 22 325-333, 1998.
- Turner AM, Greenough WT : Differential rearing effect on rat visual cortex synapses I: synaptic and neuronal density and synapses per neuron, *Brain Res.* 329; 195-203, 1985.
- Varty GB, Paulus MP, Braff DL, Geyer MA : Environmental Enrichment and Isolation Rearing in the Rat: Effect on Locomotor Behavior and Startle Response Plasticity, *Biol Psychiatry.* 47; 864-873, 2000.
- Wright JW, Masino AJ, Reichert JR, Turner GD, Meighan SE, Meighan PC, & Harding JW : Ethanol-induced impairment of spatial memory and brain matrix metalloproteinases, *Brain Research*, 963(1,2); 252-261, 2003.

Legends for Figures



<Figure 3> Immunoreactivity(arrow) with BDNF antibody in experimental group on the primary motor area($\times 100$).

<Figure 4> Immunoreactivity(arrow) with BDNF antibody in control group on the primary motor area($\times 100$).

<Figure 5> Immunoreactivity(arrow) with BDNF antibody in experimental group on the primary somatosensory area($\times 100$).

<Figure 6> Immunoreactivity(arrow) with BDNF antibody in control group on the primary somatosensory area($\times 100$).

<Figure 7> Immunoreactivity(arrow) with BDNF antibody in experimental group on the secondary somatosensory area($\times 100$).

<Figure 8> Immunoreactivity(arrow) with BDNF antibody in control group on the secondary somatosensory area($\times 100$).