

수영 훈련이 뇌허혈 유발 흰쥐의 해마 치아이랑에서 뇌신경생성과 기능적 능력에 미치는 영향

김호성, 김덕호
일맥의료재단 인애가 한방병원
이정필, 김영주, 신영오, 김상훈, 권기욱, 오재근
한국체육대학교 대학원 스포츠의학 연구실

Abstract

The Effects of Swim Training on Neurogenesis in the Hippocampal Dentate Gyrus and Functional Ability After Focal Ischemic Stroke in Rats

Ho-sung Kim, Ph.D., P.T., Deuk-ho Kim, D.O.M., O.M.D.
Inega Oriental Medical Hospital, Ilmaek Medical Group
Jeong-pil Lee, Ph.D., Young-joo Kim, Ph.D.
Young-oh Shin, Ph.D., Sang-hoon Kim, M.A.
Ki-wook Kwon, Ph.D., Jae-keun Oh, Ph.D., O.M.D.
Dept. of Sports Medicine, The Graduate School, Korea National Sport University

The present study was aimed at investigating the effect of swimming training on brain function after focal cerebral ischemia in rats. Therefore, this study was examined on neurogenesis in dentate gyrus of hippocampus using 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) to label proliferating cells and assessed the neurological response following focal cerebral ischemia in rats using neurological motor behavioral test. In an observer-blinded fashion, twenty male Sprague-Dawley (280~310 g, 7 weeks old) rats were divided into four groups: MCAO plus swimming group (ME, $n_1=5$), MCAO plus control group (MC, $n_2=5$), SHAM plus swimming group (SE, $n_3=5$), SHAM plus control group (SC, $n_4=5$). The results of this study were as follows: 1) The limb placing time before and after swimming in the ME group were significantly longer than the MC group ($p<.05$), the SE group were significantly longer than the SC group ($p<.01$). 2) The balance beam scores before and after swimming in the ME group was higher than the SE group, the MC group was higher than the SC group but was not significantly different ($p>.001$). 3) The foot fault index before and after swimming training in ME group was significantly lower (i.e., improved) than the MC group ($p<.001$) and the SE group ($p<.001$), the SE group was significantly lower (i.e., improved) than the SC group ($p<.001$). 4) The mean number of BrdU-positive cells in the dentate gyrus in the ME group was significantly higher than the MC group ($p<.001$) and the SE group ($p<.01$). The MC group and the SE group was significantly higher than the SC group ($p<.001$). 5) There was significantly correlation between limb placing time and number of BrdU-positive cells on swimming training, there was positive correlation ($r=.807$, $p<.0001$) and between foot fault index and BrdU-positive cells number, there was negative correlation ($r=-.503$, $p<.05$). However, between balance beam scores and BrdU-positive cells number, there was no correlation. In conclusion, the present study demonstrates that the role of swimming train-

ing improves behavioral motor function probably by enhancing cell proliferation in that hippocampus. This study provides a model for investigating the stroke rehabilitation that underlies neurogenesis and functional ability.

Key Words: BrdU immunohistochemistry; Focal cerebral ischemia; Neurogenesis; Neurological motor behavioral test; Swimming training.

I. 서론

뇌혈관 질환은 많은 국가에서 사망원인 중 세번째에 해당될 만큼 치명적이고, 치료의 예후도 매우 제한적이기 때문에 일차적으로 예방에 주안점을 두고 있다(Moseley 등, 2003; Paganini-Hill 등, 1988). 2004년 통계청 자료에 의하면 우리나라도 매년 뇌혈관 질환으로 인해 35,000명이 사망한다고 보고하였다. 이러한 뇌혈관 질환은 주로 혈전성 색전증(thromboembolism)으로 인해 뇌세포가 괴사하는 뇌허혈증(cerebral ischemia)으로 주로 감각운동 기능장애, 인지적 기능장애, 근력약화, 시각장애, 언어장애, 지능저하 등이 나타나게 된다(Hattori 등, 2000; Johansson, 2000).

뇌조직에서 허혈손상은 복잡하고 치명적인 세포내 신호전달 경로들이 작동되어 세포막의 특성 및 이온 이동의 변화, 지속적인 단백질 분해와 합성장애, 세포생존과 관련된 신호전달체계의 손상 및 이러한 손상을 인지하는 능력의 상실 등을 초래한다. 허혈은 고에너지인 ATP 화합물의 공급을 차단하여 전반적인 탈분극을 초래하고 과량의 glutamate가 분리되어 허혈에 민감한 신경원(neuron)은 전압의존성 이온채널과 glutamate 조절성 Ca²⁺ 채널이 열려 세포내 Ca²⁺ 농도가 증가하고 이에 따라서 phospholipase, calpain, calcineurin의 활성화 및 nitric oxide synthase의 활성화, free arachidonic acid의 축적 등이 발생한다(위대한, 2001; Kirsi, 2001).

한번 손상된 뇌세포는 재생되지 않고, 신경학적 질환과 장애의 원인이 된다(Eriksson 등, 1998). 그러나 뇌 허혈에 따른 장애는 수주에서 수개월 동안 부분적으로 회복된다(Dombovy와 Bach-y-Rita, 1988). 이것은 손상된 뇌조직이 재생되지 않더라도 신경보호기전에 의해 국소적 신경세포 발아(sprouting)와 연결 재조직화(synaptic reorganization)가 형성되어 기능회복에 관여한다고 한다(Ding 등, 2003; van Praag 등, 2002). 이러한 뇌신경세포생성(neurogenesis)은 신경세포가 증식(proliferation), 생존(survival), 분화(differentiation)되는 과정을 거치는데 신경전구세포(neuronal progenital

cells)인 신경아세포(neuroblast)는 치아이랑의 과립세포 하 영역에서 생성되어 신경세포로 분화되고, 축삭을 내어 다른 신경세포와 연결을 이루어 신경세포를 생성하는 것으로 알려져 있고(van Praag 등, 2002), 인간을 포함한 모든 포유류에서 지속적으로 일어나고 있다(Gu 등, 2000). 그러나 이러한 신경세포생성은 뇌의 특정 부위 즉, 해마 치아이랑(hippocampal dentate gyrus)의 과립하 영역(subgranular zone)과 후구(olfactory bulbs)의 뇌실하 영역(subventricular zone)에서 관찰되고(Jin 등, 2001; Johansson과 Ohlsson, 1996), 학습, 운동, 강화된 환경, 뇌 허혈 등에 의해 증가된다(Gould 등, 1999; Trejo 등, 2001).

신체적 활동은 뇌신경 세포를 더 많이 생성시키는 것으로 알려져 있고, 치료방법으로 운동이 매우 중요시되고 있다(Trejo 등, 2001; van Praag 등, 1999a). 일상에서 중추신경계 손상 환자에게 적용된 운동치료는 기능을 회복시키고, 인지기능도 향상시키는 것으로 보고되고 있다(Neeper 등, 1995). 정상적인 상태에서 신경세포 생성은 해마와 후구에서만 발생하는데 운동은 해마에서는 포유동물 뇌에서 효과적으로 신경세포생성을 촉진하여 신경간세포들의 증식에 적용함으로써 뇌의 기능을 증진시킬 수 있다고 하였다(Kempermann 등, 1997).

Van Praag 등(1999b)은 학습, 수영, 수의적 휠 달리기(voluntary wheel running)등을 적용한 실험에서 수의적 휠 달리기 대조군 보다는 생쥐 해마의 치아이랑에서 새로운 신경세포의 생성을 2배로 증가시킨다고 하였고, 김신호(2001)와 Trejo 등(2001)은 쥐를 트레드밀 운동을 시켰을 때 치아이랑에서 세포생성이 증가된다고 하였다. 운동 시 신경전구세포의 생존과 분화와 관련이 있는 신경성장인자(neurotrophic factor)의 분비가 증가하고(Nanda와 Mack, 2000), 연결 가소성이 증가되어, 강화된 뇌의 구조적, 기능적 변화를 일으킨다(Schuman, 1999). 그리고 해마에서 신경세포를 생성시키고(Czurko 등, 1999), 장기강화(long-term potentiation)가 증가되어 기억 능력을 향상시킨다(Ahmadiasl 등, 2003). 이러한 선행연구들은 정상인이나 뇌 손상 환자들에게 적절

한 자극이 뇌 신경세포를 생성시키며 기능을 회복시킬 수 있다는 가능성을 보여주고 있다.

수영은 유산소 운동의 한 형태로 뇌손상 환자들에게 신체에 가해지는 충격을 완화하여 상대적으로 신체에 적은 스트레스를 유발하고 신체 움직임에 따라 저항이 균등하게 작용하여 전신근육을 동원할 수 있기 때문에 재활치료 시 임상적으로 널리 행하여지고 있다(Chu 등, 2004; Magder 등, 1981). 쥐를 8시간 고정(immobilization)한 후 2시간의 수영운동을 시킨 결과 고정으로 인한 해마 조직의 산화적 손상이 회복되고 인지기능이 정상화 되었으며(Radak 등, 2001), 쥐를 대상으로 1년 동안 주 5일 매일 1시간씩 수영 운동을 시킨 결과 노화와 관련이 있는 SEPs(somatosensory evoked potentials)의 형태적 변화를 방지 하였다고 보고하였다(Senturk 등, 2000). 반면에 van Praag 등(1999b)은 30일간 일일 2회, 1회 12~40초 동안 수영을 쥐에게 시킨 결과 해마 치아이랑에서 세포생성에 유의한 영향을 주지 못했다고 보고하였다.

그러나 선행 연구들은 수영 훈련(swimming training)이 뇌허혈 시 해마 치아이랑에서 신경세포생성과 신경학적 운동 능력에 미치는 영향과 서로의 상관관계 대해서는 아직 연구가 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구의 목적은 뇌허혈이 유발된 흰쥐를 대상으로 수영 훈련 시 해마 치아이랑에서 뇌신경세포 생성과 신경학적 운동행동에 미치는 영향에 대해 알아보았다.

II. 연구방법

1. 연구대상

체중이 280~310 g인 7주된 Sprague-Dawley계열 수컷 흰쥐 20마리를 전 실험기간 동안 항온(23±2°C), 항습(60%), 12시간은 밝게, 12시간은 어둡게 조정된 사육실에서 고형사료와 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였고, 체중은 매일 조사하여 건강 지표로 하였다(Duncan 등, 1998). 각 동물들은 일주일간의 적응 기간을 거친 후 각 각 5마리씩 MCAO-운동군(ME)와 MCAO-대조군(MC), SHAM-운동군(SE)와 SHAM-대조군(SC)의 4집단에 무선배정 하였다.

2. 실험방법 및 내용

가. 국소 뇌 허혈 유발

본 연구에서 사용한 국소 뇌 허혈(focal cerebral ischemia) 모델은 운동장애 등 실제 임상증상과 유사하므로 본 연구에 적절할 것으로 사료되어 Longa 등(1989)의 방법에 따라 근위부 뇌허혈 기법을 시행하였다. 사전에 마취된 쥐 전경부 중앙선을 따라 피부를 절개하여 경동맥을 노출시키고, 미세혈관용 클립(clip)을 이용하여 내경동맥과 경동맥의 혈행을 완전히 차단하였다. 내경동맥을 묶고 외경동맥 분지의 근위부를 결찰한 후 Poly-L-lysine으로 끝부분이 둥글게 코팅된 4~0 nylon monofilament(2.8 mm)를 외경동맥에서부터 삽입하였다. 수술실은 경동맥과 내경동맥의 분지로부터 최소 19~20 mm까지 들어가도록 삽입하였다. SHAM 집단은 MCAO와 동일한 수술과정을 거쳤으며, 수술실 삽입은 분지로부터 15 mm로 제한하였다(이정필, 2004; Jin 등, 2001). 이후 전경부의 피부를 봉합, 소독하고 마취에서 깨어난 후 자유롭게 움직이게 하였다. 수술 후 뇌허혈 유발은 반대측 앞다리가 굴곡, 내전, 내회전되고, 뒷다리는 내전, 내회전되고, 흰쥐의 꼬리를 잡고 들었을 때 환측으로 회전했을 때로 선정하였고(Zhang 등, 2002), 뇌허혈을 확정 짓기 위해 운동은 5일째부터 일주일간 실시하였다.

나. 수영 훈련

수영 훈련(swimming training)은 직경이 50 cm인 플라스틱 재질의 원통형 수조에서 실시하였다. 수영 중 쥐가 꼬리로 체중을 바닥에 지지할 수 없도록 하기 위해 수심은 50 cm로 하고, 수온은 30~35°C로 유지하였다. 운동량은 쥐를 대상으로 수영 효과를 검증했던 선행연구(최송화 등, 2000; Kim 등, 2000)를 기초로 VO₂max의 50~65% 강도로 보고된 무부하 상태의 자유 수영을 실시했고, 3일간의 운동 적응기를 거친 후 뇌 허혈 후 5일째부터 11일째까지 일주일간 매일 30분씩 실시하였다.

3. 신경학적 운동 행동 검사

뇌허혈 유발이후 신경학적 운동장애를 나타내는 정도를 여러 가지 행동 검사를 통해 4일째 12일째 측정하였다. 검사는 각 집단에 대한 정보가 없는 검사자에 의해 평가되었고 3회 실시 후 평균값을 기록하였다.

가. 체지 배치 검사(limb placing test)

De Ryck 등(1989)의 검사를 수정한 것인데 쥐의 앞발과 뒷발의 촉각, 고유수용감각, 근력을 평가하는 검사로써 40 cm 높이의 나무 막대기(폭 3 cm, 길이 1.5 cm)에 쥐를 매달리게 하여 나무막대기에서 떨어질 때까지의 시간을 측정하였다.

나. 막대 균형 검사(balance beam test)

Puurunen 등(2001)의 검사를 수정한 것인데 쥐의 전정운동기능을 평가하는 검사로써 40 cm 높이의 나무 막대기(폭 3 cm, 길이 1.5 cm)에 쥐를 매달리게 하여 30초 동안에 행동을 측정하였다. 점수는 쥐가 30초 내에 나무막대기에서 떨어지면 0점, 쥐가 30초 동안 나무막대기에 머무는데 다른 움직임 없으면 1점, 쥐가 나무막대기에서 오른쪽 혹은 왼쪽으로 방향변화를 시도하면 2점, 쥐가 나무막대기에서 오른쪽 혹은 왼쪽으로 방향을 틀어 나무막대기 위에 걸을 때 환측 뒷발이 50% 이상 미끌어지면 3점, 쥐가 나무막대기에서 오른쪽 혹은 왼쪽으로 방향을 틀어 나무막대기 위에 걸을 때 환측 뒷발이 50% 이하로 미끌어지면 4점, 쥐가 막대 위를 걸을시 단 한번만 뒷발이 미끌어지면 5점, 쥐가 막대 위를 걸을시 뒷발이 전혀 미끌어지지 않으면 6점으로 하였다.

다. 실족 검사(foot fault test)

Hernandez와 Schallert(1988)의 검사를 수정한 것인데 쥐의 협응력, 운동통합능력을 평가하는 검사로써 철사로 만든 격자 표면(폭 50 cm, 길이 150 cm, 높이 2.5 cm, 격자철사직경 2 mm)위에 쥐를 올려놓고 60초 동안 걷게 했을 때 철사 사이로 발이 실족되는 비율을 측정하였다(실족 걸음/전체 걸음).

4. BrdU 투여

5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU)를 14일간 실험기간 동안 뇌허혈 후 4일 째와 12일 째 모든 집단에서 1일 1회 운동 30분 전에 복강 내로 투여하였다(50 mg/kg in saline)¹⁾.

5. 뇌적출 및 조직처리

Ketamine과 Rompun(.1 ml/kg)으로 마취 시킨 후 흉강을 열고 좌심실을 통하여 .05 M phosphate-buffer saline(PBS)을 5분간으로 주입하였다. 계속해서 .1 M의 phosphate buffer(PB)에 녹인 4% paraformaldehyde(PFA) 용액을 4°C에서 10분간 관류시킨 후 뇌를 적출하고, 동일한 방법으로 24시간 침전시킨 후 고정하였다. 고정된 뇌를 30% sucrose 용액에 일주일간 침전시킨 후 microtome²⁾으로 bregma -3.0 mm범위에서 2mm의 두께로 연속관상 절편을 제작하였다.

6. 면역조직화학법

각 집단에서 crycut 1800³⁾으로 뇌 절편을 최소 6장 선택하여 .05 M PBS에서 3분씩 3번 세척한 후 .3% Triton X-100으로 20분간 incubation 시켰다. 그 다음 .05 M PBS에서 3분씩 3번 세척한 후, 50% formamide-2 X standard saline citrate(SSC) 용액에 조직을 넣고 65°C의 수조에서 2시간 동안 shaking incubation시켰으며, 다시 2 X SSC 용액으로 5분간 2번 세척한 후, 2N HCl에 조직을 옮겨 30분간 incubation 시켰다. 계속해서 .1 M sodium borate(pH 8.5)로 25°C에서 10분 이상 중화시키고, .05 M PBS에서 3분씩 3번 세척한 후 1시간 동안 1% BSA와 100% horse serum 그리고 3% Triton X-100으로 고정하였다.

고정 후 BrdU primary antibody(1:600)⁴⁾로 24시간 incubation시키고, .05 M PBS에서 3분씩 3번 세척한 후 실온에서 1시간 동안 secondary antibody(1:200)⁵⁾로 반응시켰다. 다시 .05 M PBS에서 3분씩 3번 세척한 후 1시간 동안 ABC용액으로 처치하였다. .05 M PBS에서 3분씩 3번 세척한 다음 조직을 DAB발색용액으로 반응시킨 후 표본을 gelatin-coating된 슬라이드에 놓고 탈수시킨 후 고정시켰다.

7. BrdU 양성반응 세포 수 측정

각각의 항체들과 면역 반응이 일어난 세포들은 광학현미경⁶⁾을 이용하여 관찰하였고, 해마의 과립세

1) Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, U.S.A.
2) Harvard Instrument Large Rat Brain, U.S.A.
3) Leica Instruments, Germany.
4) Roche, Mannheim, Germany.
5) Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.
6) BX-51, Olympus, Japan.

포층의 면적을 영상 분석기⁷⁾를 사용하여 측정하였으며, BrdU 양성 세포수를 정량적으로 분석하였다.

8. 분석 방법

본 연구에서 얻어진 모든 자료는 윈도우용 SPSS version 11.0 통계프로그램을 이용하여 기술 통계치(평균, 표준편차)를 산출하였다. 통계적 분석방법은 각 집단간의 BrdU 양성세포수의 차이를 검정하기 위해 one-way ANOVA를, 각 집단간의 신경학적 운동행동 점수의 차이를 검정하기 위해 repeated measured two-way ANOVA를, 각 집단의 수영훈련 전과 후의 차이는 paired t-test를, BrdU 양성세포수와 신경학적 운동행동 점수간의 상관성을 보기 위해 Pearson's correlation을 실시하였고, Tukey's post hoc test로 사후 검정을 실시하였다. 통계적 유의수준은 $p < .05$ 로 하였다.

III. 결과

1. MCAO/SHAM 집단의 체중변화

체중은 1일째부터 13일째까지 측정하였다(그림 1). 모든 집단에서 수술 후 첫 3일 동안 체중이 감소하였다. SHAM 집단은 3일까지 약 30 g 감소하였지만 11일째에는 거의 원래 체중에 도달했다. ME 집단은 6일째까지는 급격하게 체중이 감소하였지만 그 이후 꾸준히 증가하였고, MC 집단은 9일째까지 체중이 감소하였지만 그 이후 변화는 없었다.

2. 수영이 신경학적 운동행동에 미치는 영향

1) 각 집단의 수영 전·후 체지 배치 검사

수영 전·후 체지배치시간은 ME 집단(10.89±2.92 sec)이 MC 집단(5.03±.89 sec)보다 유의하게 길었고($p < .05$), SE 집단(7.50±1.44 sec)이 SC 집단(1.25±1.32 sec)보다 유의하게 길었다($p < .01$). 각 집단의 수영훈련 전·후간 비교에서는 ME 집단과 MC 집단이 수영 전보다 수영 후에 유의하게 길었고($p < .01$), SE 집단이 수영 전보다 수영 후에 유의하게 길었다($p < .001$)(그림 2).

2) 각 집단의 수영 전·후 막대 균형 검사

수영 전·후 막대 균형 점수는 ME 집단(.24±.06

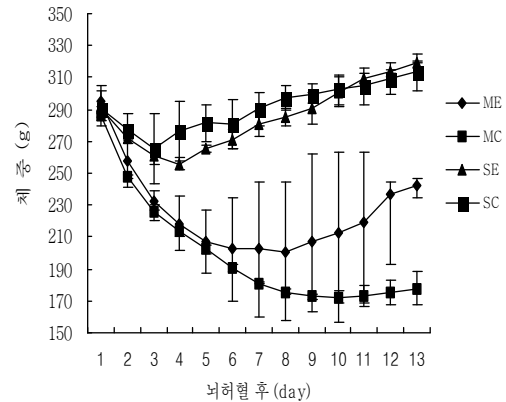


그림 1. MCAO/SHAM 집단의 체중변화

ME: MCAO-운동군($n_1=5$); MC: MCAO-대조군($n_2=5$);
SE: SHAM-운동군($n_3=5$); SC: SHAM-대조군($n_4=5$)
Data=평균±표준편차

points)이 SE 집단(-.02±.09 points)보다 높고, MC 집단(.10±.60 points)이 SC 집단(.0±.18 point)보다 높았으나 유의한 차이가 없었다. 그리고 각 집단의 수영훈련 전·후간 비교에서도 모든 집단에서 유의한 차이가 없었다(그림 3).

3) 각 집단의 수영 전·후 실족 검사

수영 전·후 실족비율은 ME 집단(-8.66±4.36%)은 MC 집단(-4.50±1.46%)과 SE 집단(-1.30±.67%)보다 유의하게 낮고($p < .001$), SE 집단(-1.30±.67%)은 SC 집단(-.42±.21%)보다 유의하게 낮았다($p < .001$). 각 집단의 수영훈련 전·후간 비교에서는 ME 집단과 SE 집단이 수영 전보다 수영 후에 유의하게 낮았다($p < .05$)(그림 4).

3. 각 집단의 BrdU 양성 세포수

ME 집단(57.20±.71/mm²)은 MC 집단 (21.0±3.54/mm², $p < .001$)과 SE 집단(41.0±.71/mm², $p < .01$)보다 유의하게 증가하였고, MC 집단과 SE 집단은 SC 집단(2.80±1.41/mm², $p < .001$)보다 유의하게 증가하였다(그림 5).

4. 각 집단의 신경학적 운동능력과 뇌신경세포생성간의 상관관계

LP와 BrdU 양성 세포수 간에는 $r=.807$ 로서 $p < .001$ 에서 상관관계가 있고, FF와 BrdU 양성 세포수 간에는

7) Fullerton, CA, U.S.A.

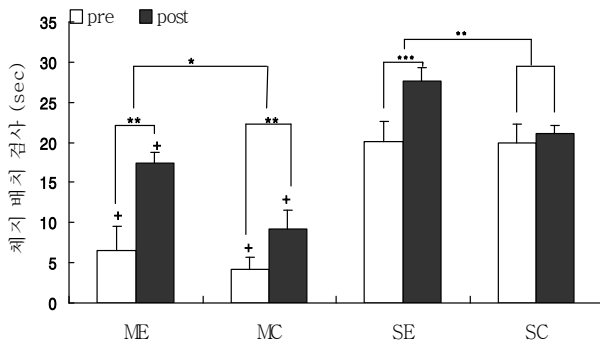


그림 2. 각 집단의 수영 전·후 체지 배치 검사
ME: MCAO-운동군($n_1=5$); MC: MCAO-대조군($n_2=5$);
SE: SHAM-운동군($n_3=5$); SC: SHAM-대조군($n_4=5$)
Data=평균±표준편차
+ $p<.001$ vs SHAM; * $p<.05$, ** $p<.01$, *** $p<.001$

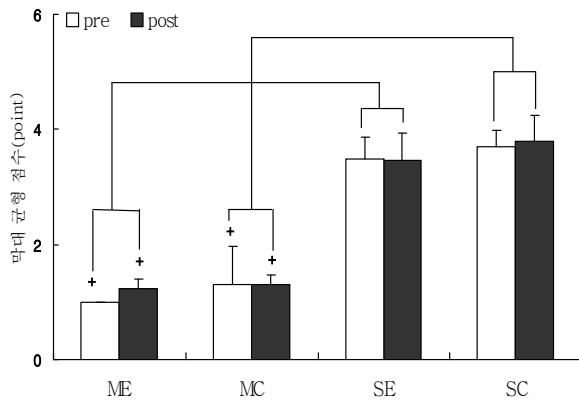


그림 3. 각 집단의 수영 전·후 막대 균형 검사
ME, MCAO-운동군($n_1=5$); MC, MCAO-대조군($n_2=5$);
SE, SHAM-운동군($n_3=5$); SC, SHAM-대조군($n_4=5$)
Data=평균±표준편차
+ $p<.001$ vs SHAM

$r=-.503$ 으로서 $p<.05$ 에서 상관관계가 있다. 그러나 BB와 BrdU 양성 세포수 간에서는 상관관계가 없었다(표 1).

표 1. 각 집단의 신경학적 운동능력과 뇌신경세포생성간의 상관관계

Source(Mean difference)	LP	BB	FF
BB	-.196		
FF	-.503*	-.083	
Number of BrdU-positive cells	.807***	.108	-.523*

LP: 체지 배치 검사, BB: 막대 균형 검사, FF: 실족 검사
* $p<.05$, *** $p<.001$

IV. 고찰

운동은 뇌신경세포생성을 증가시키고(Trejo 등 2001; van Praag 등, 1999a), 뇌 가소성을 향상시켜 중추신경계 질환자들의 뇌 기능을 회복시키는 치료의 한 방법으로 많이 사용되고 있다(Felling과 Levison, 2003). Vaynman 등(2004)은 능동적 운동은 BDNF를 포함한 신경성장인자(nerve growth factor)의 발현을 증가시켜 신경발생을 자극하고, 뇌손상에 대한 저항성을 증가시키며 학습과 정신적 활동을 증가시킨다고 하였다. 그 중에서 수영(swimming)은 뇌졸중(stroke) 환자의 감각운동기능(sensorimotor function)향상을 위해 널리 이용되고 있다(Wakayoshi 등, 1993). 따라서 본 연구는 뇌허혈(cerebral ischemia)이 유발된 흰쥐를 대상으로 수영 훈련(swimming training)에 따른 뇌기능의 변화를 연구하기 위해 BrdU 면역조직화학법(immunohistochemistry)으로 해마의 치아이랑(hippocampal dentate gyrus)에서 뇌신경세포생성(neurogenesis)과 신경학적 운동행동검사(neurological motor behavioral test)로 각 집단간 신경학적 운동 능력에 미치는 영향을 검정하고자 하였다.

체중(body weight)은 뇌허혈 손상의 간접적 지표(indirect index)로 이용되고 있다(Garcia와 Liu, 1996). 본 연구에서는 모든 집단에서 수술 후 첫 3일 동안 체중이 감소하였는데 이것은 다른 연구(Gibson과 Murphy, 2004; Marin 등, 2003)와 마찬가지로 뇌허혈 시 전 시상하부(anterior hypothalamus)에 이차적인 영향을 주어 식욕이 감퇴하여 체중이 감소한 것으로 보이고, 수영을 한 ME와 SE 집단에서 체중이 증가한 이유는 수영 훈련이 식욕증추에 영향을 주어 체중이 증가된 것으로 사료된다.

뇌허혈 유발 흰쥐의 신경학적 운동능력검사는 쥐의 앞발과 뒷발의 촉각, 고유수용감각, 근력을 평가하기 위해 체지 배치 검사(limb placing test)를, 쥐의 전정운동

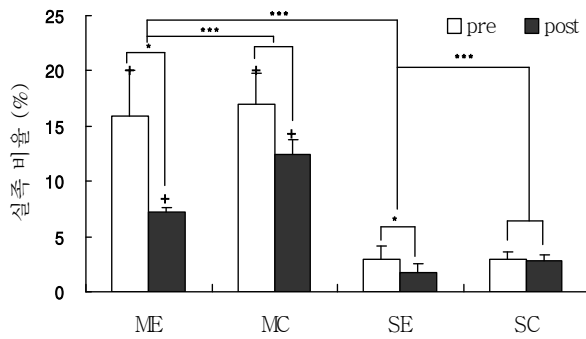


그림 4. 각 집단의 수영 전·후 실족 검사

ME: MCAO-운동군($n_1=5$); MC: MCAO-대조군($n_2=5$);
SE: SHAM-운동군($n_3=5$); SC: SHAM-대조군($n_4=5$)
Data=평균±표준편차
+ $p<.001$ vs SHAM; * $p<.05$, *** $p<.001$

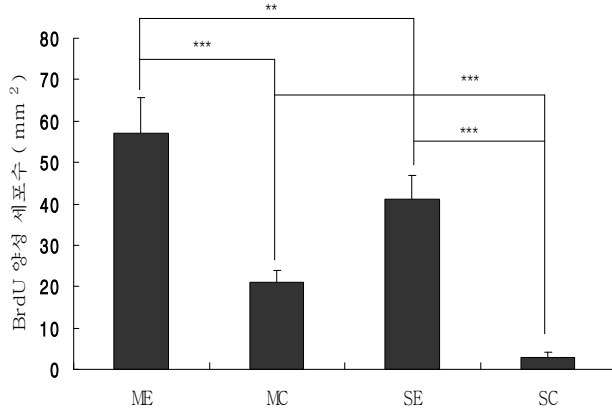


그림 5. 각 집단의 BrdU 양성 세포수

ME: MCAO-운동군($n_1=5$); MC: MCAO-대조군($n_2=5$);
SE: SHAM-운동군($n_3=5$); SC: SHAM-대조군($n_4=5$)
Data=평균±표준편차
** $p<.01$, *** $p<.001$

기능을 평가하기 위해 막대 균형 검사(balance beam test)를, 그리고 쥐의 협응력, 운동통합능력을 평가하기 위해 실족 검사(foot fault test)를 실시했다.

신경학적 운동행동검사로 각 집단간 신경학적 운동 능력에 미치는 영향을 연구한 결과 수영 훈련 전·후 체지 배치 검사 시 시간은 ME 집단은 MC 집단 보다 유의하게 길었고, SE 집단은 SC 집단 보다 유의하게 길었다. 이 결과는 수영집단이 대조군보다 쥐의 앞발과 뒷발의 축각, 고유수용감각, 근력이 향상되어 체지 배치 시간(limb placing time)이 증가되었음을 의미한다.

수영 훈련 전·후 막대 균형 검사시 점수(point)는

ME 집단은 SE 집단 보다 높고, MC 집단은 SC 집단 보다 높았으나 유의한 차이는 없었다. 그리고 각 집단의 수영훈련 전·후간 비교에서는 모든 집단에서도 유의한 차이가 없었다. 이 결과는 MCAO 집단이 SHAM 집단 보다 막대 균형 점수(balance beam point)가 향상되었으나 수영훈련이 전정운동기능 회복에는 큰 영향을 미치지 않았음을 의미한다. 수영 훈련 전·후 실족 검사시 비율(%)는 ME 집단은 SE 집단과 MC 집단보다 유의하게 낮았고, SE 집단은 SC 집단보다 유의하게 낮았다. 이 결과는 수영집단이 대조군보다 실족 비율(foot fault Index)이 낮게 나타나 협응력과 운동통합능력이 향상되었음을 의미한다. 또한 ME와 MC 집단이 뇌허혈 이후 일주일간 운동기능이 급격히 저하되었지만, 그 이후 운동기능이 서서히 회복된 것은 Yang 등(2003)과 Ding 등(2003)의 연구와 마찬가지로 뇌손상 후 연결 재조직화가 형성되어 회복 기전에 의한 것으로 보인다. 결론적으로 수영 훈련은 뇌허혈 유발 흰쥐의 전정운동기능보다 협응력, 고유수용감각, 근력향상에 큰 영향을 미친것으로 사료된다. 이와 같이 운동기능향상은 신경계 회복의 행동학적 증거로 볼 수 있는데 신경계의 회복 기전에는 뇌신경 생성에 따른 가소성(plasticity)이 원인이다(Celnik와 Cohen, 2004). Parent 등(2002)은 뇌허혈시 신경전구세포인 신경아세포(neuroblast)가 해마의 치아이랑에서 생성되어 손상된 부위로이동하여 발아하고 연결하여 뇌세포가 생성된다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 뇌신경세포의 생성을 연구하기 위해 뇌세포가 분열할 때 S주기에 핵 내로 삼입하여 증식하고 있는 세포를 표지하는 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)를 이용하였다(유병규, 2001; Cameron과 Mckay, 2001). 뇌허혈 부위 해마의 치아이랑에서 생성된 BrdU 양성 세포수는 ME 집단에서는 MC 집단과 SE 집단보다 유의하게 증가하였고, MC 집단과 SE 집단은 SC 집단 보다 유의하게 증가하였다. 그림 6에서보면 뇌허혈 동측부위의 해마 치아이랑에서 BrdU 양성 세포의 생성이 관찰되었는데 해마의 치아이랑에서 ME 집단이 SE 집단에 비해 BrdU 양성 세포수가 증가 되었고, MC 집단은 약간의 BrdU 양성 세포수가 관찰되었고, SC 집단은 거의 적은양의 BrdU 양성 세포수가 관찰 되었다. 이와 같이 수영을 한 집단에서 대조군보다 해마의 치아이랑에서 BrdU 양성 세포가 더 많이 생성되었음을 보여준다. 이 결과는 수영훈련이 뇌신경세포생성(neurogenesis)에 대하여 유

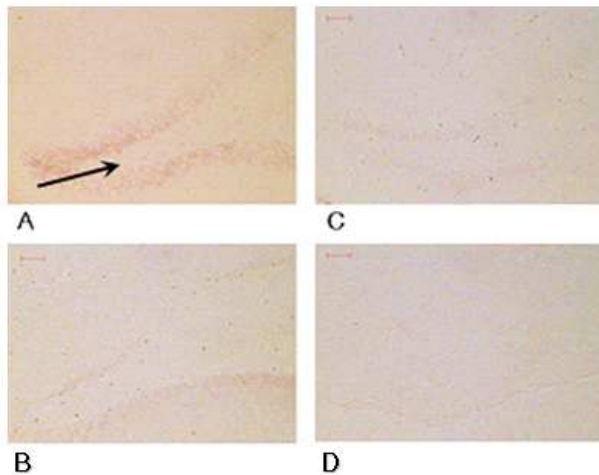


그림 6. 각 집단의 치아이랑에서 BrdU 양성 세포의 발현
A: MCAO-운동군($n_1=5$); B: MCAO-대조군($n_2=5$);
C: SHAM-운동군($n_3=5$); D: SHAM-대조군($n_4=5$)
화살표: BrdU 양성 세포 발현, 척도막대: 5 μ m.

의한 영향을 미쳤음을 알 수 있으며, 운동으로 인한 뇌 신경세포생성으로 기능적 능력이 회복될 수 있다는 가능성을 제시한 Neeper 등(1995)의 연구와 일치하였다. 또한, MC 집단이 SC 집단보다 BrdU 양성 세포수가 증가되었는데 이는 선행 연구(Liu 등, 1998; Nakayama 등, 1994)에서와 같이 허혈로 유발된 세포생성은 허혈로 인한 과도한 세포사멸(apoptosis)에 대한 보상적 적응기전으로 인해 신경전구세포(neuronal progenital cell)가 활성화되어 신경세포생성이 증가한 것으로 사료된다. ME 집단이 SE 집단보다 BrdU 양성 세포수가 증가되었는데 이는 뇌허혈과 운동이 뇌신경세포 증가를 더욱 자극한 것으로 추정된다. 이 같은 결과는 뇌허혈 이후 수영 훈련으로 인해 뇌손상 주위에 신경세포가 발아하여 새로운 시냅스를 형성하여 신경세포생성을 증가시켜서 손상된 부위의 기능을 대체한다는 선행 연구와 일치함을 보여 준다(Ding 등, 2004; Nudo 등, 2001). Van Praag 등(1999b)은 수영이 뇌신경세포생성을 증가시키는데 충분하지 않다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 수영 훈련시 뇌허혈 유발 흰쥐의 치아이랑에서 새로운 신경세포가 생성되었다. 이는 수영방법의 차이인 것으로 보인다. 즉, 위의 연구에서는 일일 2회 1회 수영시간이 12~40초로써 유산소 운동이 중추신경계의 변화를 유발하기에는 다소 짧은 지속시간을 사용하였으나 본 연구에서는 1회 수영시간이 30분으로써 선행연구에 비해 4~5배 길었기 때문인 것으로 보인다.

수영훈련에 의한 뇌 허혈 유발 흰쥐의 뇌신경세포생성이 운동기능 향상에 어떤 영향을 미치는지는 보기 위해 신경학적 운동 능력과 해마의 치아이랑에서 뇌신경세포생성 간의 상관관계를 분석한 결과, 체지 배치 시간과 BrdU 양성 세포수 간에는 양의 상관관계가 있었고, 실족 비율과 BrdU 양성 세포 수간에는 음의 상관관계가 있었다. 그러나 막대 균형 점수와 BrdU 양성 세포수 간에서는 상관관계가 없었다. 이 결과는 수영 훈련시 해마 치아이랑에서 증가된 BrdU 양성세포에 의해 뇌허혈 유발 흰쥐의 신경학적 운동기능이 향상된 것으로 추정되며, 운동기능 중 전정운동기능보다 오히려 협응력과 고유수용감각, 근력이 향상된 것으로 사료된다. 그러나 Schabitz 등(2004)은 Forced Arm Use(FAU) 같은 강한 운동(forced exercise)을 했을 때 오히려 신경영양인자가 증가하여 전정기능도 증가되었다고 보고 하였다. 허미정(1993)의 연구에서는 중증뇌성마비아동에게 다양한 전정기능 훈련 프로그램을 실시하였을 때 전정운동기능 개선에 효과가 있다고 하였다. 이들 선행연구들을 유추해 볼 때 본 연구는 수영 운동 같이 부하가 적은 운동은 전정운동기능 향상에는 크게 영향을 주지 않고, 전정기관을 자극시키는 다양한 운동 프로그램 적용 시 전정운동기능을 향상시킬 수 있을 것으로 보인다. 따라서 뇌손상 이후 운동으로 유발된 뇌신경세포가 운동기능회복에 미치는 역할과 범위를 제시할 수 있을 것이다. 본 연구는 수영 훈련이 뇌손상 후 뇌신경세포생성으로 기능회복을 하는데 적합한 것으로 판단되어 앞으로 재활 치료 시 실험적 자료가 될 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구의 목적은 뇌 허혈이 유발된 흰쥐를 대상으로 수영 훈련에 따른 뇌기능의 변화를 연구하기 위해 BrdU 면역조직화학법으로 해마의 치아이랑에서 뇌신경세포생성과 신경학적 운동행동 검사로 각 집단간 신경학적 운동 능력에 미치는 영향을 검정하고자 하였다. 결과는 다음과 같다.

1. 수영훈련 전·후 체지 배치 시간에 대한 결과는 ME 집단은 MC 집단보다 유의하게 길고($p<.05$), SE 집단은 SC 집단보다 유의하게 길었다($p<.01$).
2. 수영훈련 전·후 막대 균형 점수에 대한 결과는

ME 집단은 SE 집단보다 높고, MC 집단은 SC 집단보다 높았으나 유의한 차이는 없었다.

3. 수영훈련 전·후 실족 비율에 대한 결과는 ME 집단은 SE 집단과 MC 집단보다 유의하게 낮고($p<.001$), SE 집단은 SC 집단보다 유의하게 낮았다($p<.001$).

4. 해마의 치아이랑에서 생성된 BrdU 양성 세포수는 ME 집단은 MC 집단($p<.001$)과 SE 집단($p<.01$)보다 유의하게 증가하였고, MC 집단과 SE 집단은 SC 집단보다 유의하게 증가하였다($p<.001$).

5. 수영훈련에 있어서 뇌 허혈 유발 흰쥐의 신경학적 운동 능력과 해마의 치아이랑에서 뇌신경세포생성 간의 상관관계를 분석한 결과, 체지 배치 시간과 BrdU 양성 세포수 간에는 $r=.807$ 로서 $p<.001$ 에서 상관관계가 있었고, 실족 비율과 BrdU 양성 세포수 간에는 $r=-0.503$ 로서 $p<.05$ 에서 상관관계가 있었다. 그러나 막대 균형 점수와 BrdU 양성 세포수 간에서는 상관관계가 없었다.

결론적으로 수영훈련으로 인해 뇌 허혈 유발 흰쥐의 해마의 치아이랑에서 뇌신경세포가 증가되었으며, 그로 인해 운동 기능능력 또한 향상되었다. 운동행동기능에서는 전정운동기능보다 오히려 협응력 고유수용감각, 근력이 향상 되었다. 추후 뇌허혈시 운동과 뇌신경세포가 전정운동기능에 미치는 영향에 대해서는 폭넓은 연구가 되어야 할 것으로 사료된다.

인용문헌

김신호. Treadmill exercise increases neurogenesis in dentate gyrus of Sprague-Dawley rats. 경희대학교, 박사학위논문, 2001;20-26.
위대한. 흰쥐의 일과성 전뇌 허혈-재순환 손상에서 초기 유전자와 BDNF mRNA 발현에 대한 Melatonin의 효과. 원광대학교, 박사학위논문, 2001;5-8.
유병규. 어린 흰쥐 해마의 치상회에서 운동과 감각자극 적용이 뇌 신경세포 생성에 미치는 영향. 고려대학교, 박사학위논문, 2001;23-24.
이정필. Effect of electro-acupuncture and exercise on muscle composition and angiogenesis in stroke-prone rats. 한국체육대학교, 박사학위논문, 2004;12-18.
최송화, 이서은, 황문종 등. 흰쥐의 좌골신경 손상 후

운동과 전기자극이 비복근의 회복에 미치는 영향. 한국체육학회지. 2000;39(4):638-644.

통계청. 사망원인통계. 2004.

허미정. 전정기능 훈련프로그램을 통한 중증뇌성마비 아동의 운동교육효과. 대구대학교, 석사학위논문, 1993;102-103.

Ahmadiasl N, Alaei H, Hanninen O. Effect of exercise on learning, memory and levels of epinephrine in rats' hippocampus. J Sports Sci and Med. 2003;2:106-109.

Cameron HA, Mckay RD. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. J Comp Neurol. 2001;435(4):406-417.

Celnik PA, Cohen LG. Modulation of motor function and cortical plasticity in health and disease. Restor Neurol Neurosci. 2004;22(3):261-268.

Chu KS, Eng JJ, Dawson AS, et al. Water-based exercise for cardiovascular fitness in people with chronic stroke: A randomized controlled trial. Arch Phys Med Rehabil. 2004;85(6):870-874.

Czurko A, Hirase H, Csicsvari J, et al. Sustained activation of hippocampal pyramidal cells by 'space clamping' a running wheel. Eur J Neurosci. 1999;11(1):344-352.

De Ryck M, Van Reempts J, Borgers M, et al. Photochemical stroke model: Flunarizine prevents sensorimotor deficits after neocortical infarcts in rats. Stroke. 1989;20(10):1383-1390.

Ding Y, Li J, Lai Q, et al. Motor balance and coordination training enhances functional outcome in rat with transient middle cerebral artery occlusion. Neuroscience. 2004;123:667-674.

Ding Y, Li J, Clark J, et al. Synaptic plasticity in thalamic nuclei enhanced by motor skill training in rat with transient middle cerebral artery occlusion. Neurol Res. 2003;25:189-194.

Dombovy ML, Bach-y-Rita P. Clinical observations on recovery from stroke. Adv Neurol. 1988;47:265-276.

Duncan ND, Williams DA, Lynch GS. Adaptations in rat skeletal muscle following long-term resistance exercise training. Eur J Appl Physiol

- Occup Physiol. 1998;77(4):372-378.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 1998;4:1313-1317.
- Felling RJ, Levison SW. Enhanced neurogenesis following stroke. *J Neurosci Res.* 2003;73(3):277-283.
- Garcia JH, Liu KF. Brain parenchymal responses to experimental focal ischemia: Cellular inflammation. In: Kriegstein J, ed. *Pharmacology of Cerebral Ischemia.* Stuttgart, Germany, Medpharm Scientific Publishers, 1996:379-384.
- Gibson CL, Murphy SP. Progesterone enhances functional recovery after middle cerebral artery occlusion in male mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004;24(7):805-813.
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, et al. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci.* 1999;2:260-265.
- Gu W, Brannstrom T, Wester P. Cortical neurogenesis in adult rats after reversible photothrombotic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000;20(8):1166-1173.
- Hattori K, Lee H, Hurn PD, et al. Cognitive deficits after focal cerebral ischemia in mice. *Stroke.* 2000;31:1939-1944.
- Hernandez TD, Schallert T. Seizures and recovery from experimental brain damage. *Exp Neurol.* 1988;102:318-324.
- Jin K, Minami M, Lan JQ, et al. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rats. *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98:4710-4715.
- Johansson BB. Brain Plasticity and Stroke Rehabilitation. *Stroke.* 2000;31(1):223-230.
- Johansson BB, Ohlsson AL. Environment, social interaction and physical activity as determinants of functional outcome after cerebral infarction in the rat. *Exp Neurol.* 1996;139(2):322-327.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature.* 1997;386:493-495.
- Kim CS, Nakajima D, Yang CY, et al. Prolonged swimming exercise training induce hypophosphatemic osteopenia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). *J Physiol Anthropol Appl Human Sci.* 2000;19(6):271-277.
- Kirsi P. The effects of pharmacotherapy and training on functional recovery after global and focal cerebral ischemia in rats. Department of neurology series of reports No 58. University of Kuopio, 2001:13-14.
- Liu J, Solway K, Messing RO, et al. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci.* 1998;18:7768-7778.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989;20(1):84-91.
- Magder S, Linnarsson D, Gullstrand L. The effect of swimming on patients with ischemic heart disease. *Circulation.* 1981;63:979-986.
- Marin R, Williams A, Hale S, et al. The effect of voluntary exercise exposure on histological and neurobehavioral outcomes after ischemic brain injury in the rat. *Physiol Behav.* 2003;80(2-3):167-175.
- Moseley AM, Stark A, Cameron ID, et al. Treadmill training and body weight support for walking after stroke. *Stroke.* 2003;34:3006.
- Nakayama H, Jorgensen HS, Raaschou HO, et al. Recovery of upper extremity function in stroke patients: The Copenhagen stroke Study. *Arch Phys Med Rehabil.* 1994;75(4):394-398.
- Nanda SA, Mack KJ. Seizures and sensory stimulation result in different patterns of brain derived neurotrophic factor protein expression in the barrel cortex and hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000;78:1-14.
- Neeper SA, Gomez-Pinilla F, Choi J, et al. Exercise and brain neurotrophins. *Nature.* 1995;373:109.
- Nudo RJ, Plautz EJ, Frost SB. Role of adaptive plasticity in recovery of function after damage to motor cortex. *Muscle Nerve.* 2001;24(8):1000-1019.
- Paganini-Hill A, Ross RK, Henderson BE. Postmenopausal estrogen treatment and stroke:

- A prospective study. *BMJ*. 1988;297:519-522.
- Parent JM, Vexler ZS, Gong C, et al. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann Neurol*. 2002;52(6):802-813.
- Puurunen K, Jolkkonen J, Sirvio J, et al. An alpha (2)-adrenergic antagonist, atipamezole, facilitates behavioral recovery after focal cerebral ischemia in rats. *Neuropharmacology*. 2001;40(4):597-606.
- Radak Z, Sasvari M, Nyakas C, et al. Single bout of exercise eliminates the immobilization-induced oxidative stress in rat brain. *Neurochem Int*. 2001;39(1):33-38.
- Schabitz WR, Berger C, Kollmar R, et al. Effect of brain-derived neurotrophic factor treatment and forced arm use on functional motor recovery after small cortical ischemia. *Stroke*. 2004;35(4):992-997.
- Schuman EM. Neurotrophin regulation of synaptic transmission. *Curr Opin Neurobiol*. 1999;9(1):105-109.
- Senturk UK, Aktekin B, Kuru O, et al. Effect of long-term swimming exercise on somatosensory evoked potentials in rats. *Brain Res*. 2000;887(1):199-202.
- Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor 1 mediates exercise induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci*. 2001;21:1628-1634.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, et al. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*. 2002;415:1030-1034.
- van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, et al. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999a;96:13427-13431.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*. 1999b;2(3):266-270.
- Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Exercise induces BDNF and synapsin 1 to specific hippocampal subfields. *J Neurosci Res*. 2004;76(3):356-362.
- Wakayoshi K, Yoshida T, Ikuta Y, et al. Adaptations to six months of aerobic swim training. Changes in velocity, stroke rate, stroke length and blood lactate. *Int J Sports Med*. 1993;14(7):368-372.
- Yang YR, Wang RY, Wang PS. Early and late treadmill training after focal brain ischemia in rats. *Neurosci Lett*. 2003;339:91-94.
- Zhang L, Schallert T, Zhang ZG, et al. A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Methods*. 2002;117(2):207-214.

논문접수일 2005년 4월 17일

논문게재승인일 2005년 7월 25일