

복합운동훈련이 신생 흰쥐의 알코올성 소뇌손상 후 운동기능 및 신경연접가소성에 미치는 영향

이선민

대구대학교 대학원 재활과학과

구현모

나사렛대학교 재활기기지역혁신 센터

권혁철

대구대학교 재활과학대학 재활공학과

Abstract

The Effects of Complex Motor Training on Motor Function and Synaptic Plasticity After Neonatal Binge-like Alcohol Exposure in Rats

Sun-min Lee, M.Sc., P.T.

Dept. of Rehabilitation Science, The Graduate School, Daegu University

Hyun-mo Koo, Ph.D., P.T.

Regional Innovation Center of Rehabilitation Technology, Nazarene University

Hyuk-cheol Kwon, Ph.D., P.T.

Dept. of Rehabilitation Technology, Daegu University

The purposes of this study were to test that complex motor training enhance motor function significantly, to test change in cerebellum, and to test the synaptic plasticity into the immunohistochemistry response of synaptophysin. Using an animal model of fetal alcohol syndrome - which equates peak blood alcohol concentrations across developmental period - the effects of alcohol on body weight during periods were examined. The effect of complex motor training on motor function and synaptic plasticity of rat exposed alcohol on postnatal days 4 through 10 were studied. Newborn rats were assigned to one of two groups: (1) normal group (NG), via artificial rearing to milk formula and (2) alcohol groups (AG), via 4.5 g/kg/day of ethanol in a milk solution. After completion of the treatments, the pups were fostered back to lactating dams, where they were raised in standard cages (two-and three animals per cage) until they were postnatal 48 days. Rats from alcohol group of postnatal treatment then spent 10 days in one of two groups: Alcohol-experimental group was had got complex motor training (learning traverse a set of 6 elevated obstacles) for 4 weeks. The alcohol-control group was not trained. Before consider replacing with "the experiment/study", (avoid using "got" in writing) the rats were examined during four behavioral tests and their body weights were measured, then their coronal sections were processed in rabbit polyclonal antibody synaptophysin. The synaptophysin expression in the cerebellar cortex was investigated using a light microscope. The results of this study were as follows: 1. The alcohol groups contained significantly higher alcohol concentrations than the normal group. 2. The alcohol groups had significantly lower body weights than the normal group. 3. In alcohol groups performed significantly lower than the normal group on the motor behavioral test. 4. In alcohol-control

group showed significantly decreased immunohistochemistic response of the synaptophysin in the cerebellar cortex compared to the normal group. These results suggest that improved motor function induced by complex motor training after postnatal exposure is associated with dynamically altered expression of synaptophysin in cerebellar cortex and that is related with synaptic plasticity. Also, these data can potentially serve as a model for therapeutic intervention.

Key Words: Complex motor training; Fetal alcohol syndrome; Motor function; Synaptic plasticity.

I. 서론

산모의 임신기간 동안의 알코올 남용은 발생 과정에 있는 태아의 뇌에 손상을 줄 수 있고, 이로 인해 인지 기능, 운동수행력, 사회 및 정서 행동 조절의 발달에 악영향을 미칠 수 있다(Climent 등, 2002; Hannigan과 Berman, 2000). Abel(1989)은 자궁내 알코올 노출로 인해 발생한 장애를 태아 알코올증후군(fetal alcohol syndrome: FAS)이라 하며, 진단에 필요한 세 가지의 기준 즉, 출생 전·후의 성장지연과 중추신경계의 손상 및 안면기형을 제시하였다. 그리고 태아 알코올증후군의 진단시 요구되는 안면기형과 같은 특징적인 증상을 보이지는 않지만 자궁내 알코올노출의 경험으로 인해 신경발달학적 장애를 나타내는 알코올관련 신경발달장애(alcohol-related neurodevelopmental disorder: ARDN)와 인지장애, 과활동성 및 운동장애를 동반하는 태아알코올영향(fetal alcohol effect: FAE) 등의 장애를 지닌 아동들도 있다(Coles 등, 1997; Klintsova 등, 2002).

우리나라에서는 태아 알코올증후군에 관한 연구가 미비한 실정이지만 미국의 경우 1000명당 .5명에서 5.6명으로 매우 높은 출생률을 보이고 있으며, 태아알코올영향이나 알코올관련 신경발달장애 아동의 출생률까지 포함한다면 신생아 100명당 1명 정도에 해당되는 많은 아동들이 태내의 알코올 노출로 인해 일생동안 장애를 안고 살아가고 있다(Cook, 2003; Sampson 등, 1997).

태아기 동안의 알코올 노출로 인해 정상적인 발달 프로그램에 손상을 입은 태아 알코올증후군 아동들과 알코올관련 신경발달 장애 아동들은 신경세포의 소실, 뇌의 부피감소, 소뇌의 형성부전(hypoplasia), 뇌량의 발육부전(agenesis) 및 생존한 신경 세포사이의 신호 전달 변화나 비정상적인 연결 및 가소성의 약화로 인해 지속적인 기능장애를 보인다(Climent 등, 2002; Goodlett과 Horn, 2001; Hannigan과 Berman, 2000). 특히 신경

의 취약성이 증가되어 있는 기간 동안의 알코올 노출은 지속적이고 유해한 신경독성(neuronal toxicity)을 유발하는데, 주목할 점은 뇌 발생 후기 동안의 알코올 노출로 인해 소뇌의 손상이 두드러지게 나타난다는 것이다(Heaton 등, 1999; Maier와 West, 2001). 이러한 중추신경계의 손상은 지능의 저하, 집중력 결손, 과잉행동, 학습과 기억의 손상, 균형 및 손-눈 협응력의 장애와 보행의 장애와 같이 광범위한 기능적 문제점으로 나타나며, 뇌성마비나 정신지체로 이어질 확률이 높다(Coles 등, 1997). 최근 MRI를 이용한 연구에 따르면 태내 알코올 노출로 인한 태아 알코올증후군 아동들은 대조군에 비해 소뇌의 손상이 두드러지게 나타나며, 소뇌의 부피 감소가 10명 중 8명에서 발견된다고 한다(Mattson와 Riley, 1996; Mattson 등, 1996). 또한 알코올에 노출된 경험이 있는 아동들은 태아 알코올증후군의 진단에 필요한 증상의 유·무에 관계없이 소뇌별레(vermis)의 중간시상(midsagitta) 영역에서 전엽(anterior lobe)의 감소가 두드러지게 나타난다(Sowell 등, 1996).

소뇌의 기능은 운동의 조절과 관련이 있다. 즉 소뇌는 운동을 개시하기 전에 근육군의 적절한 협응을 통해 근육 긴장을 억제함으로써 운동 과정을 원활하게 하며 운동 방향의 편위나 동요를 억제하는 것으로 알려져 있다. 운동학습 과정이나 연관학습에 있어 소뇌의 중요성은 운동 기술을 학습할 때 그 기술에 대한 일반적인 사실을 배우면서 점차 기술이 완전하게 습득됨에 따라, 처음에 서술성이었던 운동 기억(declarative memory)이 비서술성 기억(procedural memory)으로 변화되어 소뇌에 부호화됨으로써 자동적으로 운동이 수행될 수 있다는 사실이 밝혀지면서 인식되기 시작하였다(임재형과 정성태, 1996).

최근 운동기술학습(motor skill learning)이나 복잡한 동훈련(complex motor training)을 통하여 소뇌 및 대뇌에서 신경연접의 증가와 신경회로망의 재구성이 유발

된다는 사실이 전자현미경적 분석에 의해 밝혀지고 있다(Anderson 등, 1996; Kleim 등, 1998). 신경연접가소성(synaptic plasticity)은 학습에 의한 기억형성시 일어나는 일련의 현상으로 알려져 있으며 이러한 가소성은 신경연접형성(synaptogenesis) 및 분포의 변화와 관련이 있다. 특히 연접전 신경세포의 축삭 말단 부위에 있는 여러 단백질들은 연접소포(synaptic vesicle)의 결합이나 융합(fusion) 과정에 참여(Luscher 등, 2000)하여 신경연접형성과 신경돌기의 확장(neurite elongation)에 관여한다(Catsicas 등, 1991; Steward와 Worley, 2002).

Synaptophysin은 38-kDa 개재 막당단백(integral membrane glycoprotein) 혹은 p38로 알려져 있는 연접단백질로 연접전 형질막(presynaptic plasma membrane)에 가장 풍부하게 존재하는 단백질이다. 또한 신경연접의 기능적인 표지자일 뿐만 아니라 동물 모델과 환자들의 신경연접형성을 연구하기 위해 이용되기도 한다(Hinz 등, 2001). 발달 과정에서 소뇌피질의 축삭 확장(axonal elongation)이나 연접부 형성에 관여하는 synaptophysin의 발현 분포 증가는 축삭말단의 연접소포의 축적과 소뇌의 신경연접증가를 반영하는 표지자로서 이용되기도 한다(Leclerc 등, 1989).

신경계의 기능은 뇌의 발생 과정동안 신경세포들이 서로 연결되어 형성되는 복잡한 신경망 구조에 따라 달라질 수 있다. 그러므로 학습이나 기억 및 운동행동학적 훈련은 신경세포들을 연결하는 신경연접의 연결강도를 변화시켜 기존의 신경망이 더욱 강화할 뿐만 아니라 새로운 신경망을 형성하기도 한다.

뇌손상으로 인한 신경행동학적 장애를 치료하기 위한 다양한 중재들이 이루어지고 있으나 태아 알코올중후군 아동들에게 적용할 적절한 치료적 중재의 개발과 연구가 시급한 실정이다. 또한 운동훈련을 통한 치료적 중재가 어떤 기전으로 기능적 회복에 기여하는지를 운동행동학적 측면 및 조직학적 측면에서의 연구를 통하여 객관적으로 규명할 필요가 있다. 이에 본 연구에서는 중추신경계의 발생시기 동안의 알코올 노출로 인해 소뇌의 발생에 손상을 입은 흰쥐에게 협응력과 균형 및 운동 학습력을 증진시킬 수 있는 복합운동훈련을 적용하여 훈련을 통한 조기중재가 운동기능과 소뇌의 발달에 미치는 효과에 대한 치료적 근거를 마련할 뿐만 아니라 새로운 치료적 운동프로그램에 접근할 수 있는 토대를 마련하고자 한다.

II. 연구방법

1. 실험동물

본 연구에서는 생후 8~10주, 체중 250~300 g의 건강한 자성 흰쥐에서 태어난 생후 4일된 Sprague-Dawley 계 신생 흰쥐를 사용하였다. 임신연령 22일인 출생일, 즉 생후 0일을 기준으로 생후 4일된 흰쥐에게 생후 10일까지 7일 동안 알코올을 경구적으로 주입하였다. 실험 기간 중 알코올을 주입하는 시간을 제외하고는 모성 흰쥐와 함께 사육하여 스트레스를 최소화하였고, 실험실의 온도는 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, 습도는 $50\pm 2\%$ 로 유지하였다. 1일 광주기와 암주기를 각각 12시간으로 조절하였다. 그리고 각 실험동물을 정상적인 발달과정을 거치고 복합운동훈련을 받지 않은 정상군과 생후 4일에서 10일 사이에 알코올을 투여한 후 생후 20일부터 복합운동훈련을 받은 알코올-실험군 및 알코올을 투여한 후 복합운동훈련을 받지 않은 알코올-대조군으로 나누어 실험을 실시하였다.

2. 실험방법

1) 알코올 적용

출생일을 생후 0일로 하여 생후 4일에 알코올-실험군 및 알코올-대조군에게 경구적으로 알코올을 투여하였다. 알코올 주입방법은 Klintsova 등(2002)과 Hsiao 등(2002)의 연구에서 사용한 방법을 수정하여 11%(v/v)의 에탄올이 포함된 우유 유동식(4.9 g/kg/day)을 하루에 두 번 2시간 간격으로 경구용 종대를 이용하여 주입하였다. 알코올은 7일간 투여하였으며, 생후 6일에 두 번째 알코올을 주입 하고 90분이 경과한 후 혈중알코올농도(blood ethanol concentrations: BECs)를 측정하기 위해 각 군당 3마리씩의 혈액을 수집하였다. 혈액은 심장천자로 수집하였으며 정상군도 동일한 방법으로 수집하였다.

2) 복합운동훈련

본 실험에 이용된 복합운동훈련 프로그램은 권도윤(2001)과 Kleim 등(1998)의 연구에서 사용된 운동학습 모델을 수정하여 운동학습력과 균형 및 협응력을 증진시킬 수 있는 훈련 과제들로 구성하였다. 먼저 훈련을 시작하기 전 3일 동안 적응기간을 갖게 하여 스트레스를 줄이는데 노력하였다. 훈련은 하루에 1회씩 실시하

고 과제는 쉬운 과제에서 어려운 과제 순으로 실시하였다. 만약 실험동물이 한 장소에 10초 이상 멈추어 있다면 실험자는 부드러운 강하나 소리으로써 자극을 가하여 훈련이 원활히 이루어지도록 하였다. 본 연구에 이용된 복합운동훈련은 6가지의 과제로 구성하였다(표 1).

표 1. 복합운동훈련의 구성

과제	장애물	치수
1	막대	직경: 5 & 3 cm, 길이: 100 cm
2	밭줄	직경: 4 & 2 cm, 길이: 100 cm
3	사다리	간격: 5 cm, 길이: 80 cm
4	금속체인	직경: 3 cm, 길이: 100 cm
5	평행봉	직경: 1.2 & 2 cm, 길이: 80 cm
6	격자판	간격: 2~3 cm, 사각형

3. 결과 측정

1) 혈중알코올농도

생후 6일에 11%(v/v)의 에탄올이 포함된 우유 유동식(4.9 g/kg/day)을 두 번째 주입 하고 90분이 경과한 후 혈중알코올농도(blood ethanol concentrations: BECs)의 측정을 위해 수집된 혈액을 분석하였다.

2) 체중의 변화

각 집단들은 일반적인 성장지표로 고려되는 체중의 변화를 살펴보았다. 체중은 알코올을 처치하기 직전 즉, 생후 4일과 알코올을 마지막으로 처치한 생후 10일에 각각 측정하였다. 그리고 복합운동훈련을 실시하기 시작한 날과 훈련이 끝난 4주 후에 각각 측정하여 변화를 살펴보았다.

3) 운동기능검사

(1) Horizontal ladder beam 검사

Soblosky 등(1997)과 Klintsova 등(1998)의 연구에서 사용한 검사방법을 수정한 것으로 체지 배치의 정확성과 움직임의 협응성을 검사하기 위해 실시하였다. 바닥에서 45 cm높이의 의자 두개를 연결하여 나무를 이용하여 제작된 직경 .48 cm, 길이가 100 cm인 Horizontal ladder beam을 설치하였다. 또한 Horizontal ladder beam 끝에는 20 cm×25 cm×25 cm 크기의 암실을 연결

하여 실험동물을 유인하였다. ladder beam 사이의 간격을 0 cm, 2 cm 및 4 cm로 하여 평가하였으며 2 cm간격의 ladder beam을 사용하여 전 훈련을 실시하였다. 전 훈련을 실시한 후 0 cm와 2 cm 및 4 cm의 간격 순으로 검사를 실시하여 과제를 완성하는 시간을 측정하였다. 최대 시간은 20초로 하였다.

(2) Rota rod 검사

본 연구에서는 Rota rod(IITC, Serise B)를 이용하여 균형 및 협응력을 평가하였다. 본 연구에 이용된 Rota rod 기구는 길이 5 cm, 직경 10 cm의 회전하는 rod가 1 m 높이에 현수되어 있다. 최대 RPM을 15로 하여 전 훈련을 실시한 후 6, 15 및 25RPM으로 검사를 실시하였다. 검사자는 최대 RPM에 도달하기까지 낙하하거나 검사자가 낙하를 방지하여 잡아준 횟수를 포함한 미끄러진 회수를 측정하였다. 낙하 횟수는 최대 5회로 하였고 6, 15 및 25RPM에서 각 3회씩 검사를 실시하였다.

4) 조직학적검사

(1) 심장 관류 및 조직 처리

각 실험동물들은 운동행동학적 검사를 모두 실시한 후 전신마취제를 복강내 주사(2 ml/kg)하여 마취한 후 .9% NaCl로 관류 수세한 후 4% paraformaldehyde를 이용하여 관류 전고정을 실시하였다. 이후 뇌신경을 제거한 뇌를 적출하여 소뇌를 분리한 후 4% paraformaldehyde 용액에 4℃에서 24시간 동안 침전시켜 후고정을 실시하였다. 후고정이 끝난 조직은 30% sucrose 용액에서 24시간동안 침전시킨 후 탈수(dehydration)과정과 청명(clearing)과정을 실시한 후 파라핀 포매(paraffin embedding)를 실시하였다. 이후 파라핀 블록(paraffin block)을 제작하고 5 μm 두께로 슬라이드를 제작하여, 건조기에 24시간 동안 건조시켰다.

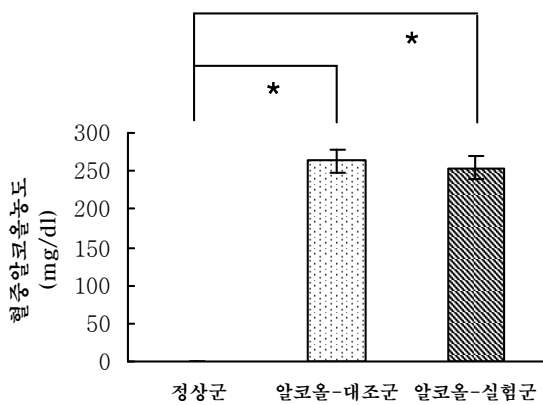
(2) 면역조직화학적 검사

5 μm 두께로 관상면에서 제작된 소뇌 절편은 synaptophysin 단백질의 발현을 관찰하기 위해 면역조직화학반응 검사를 실시하였다. 모든 과정은 동일한 환경에서 실시하였으며, 항체의 수세와 희석은 .01M PBS를 이용하였다. 먼저 제작된 절편을 탈파라핀(deparaffin)과 함수(hydration)과정을 거친 후, 조직내의 비특이적인 면역반응을 최소화하기 위하여 5% normal goat se-

rum(Sigma)으로 실온에서 30분간 전처리를 실시하였다. 항체가 포함된 모든 용액에 2.5% normal goat serum을 첨가하였으며 전처리가 끝난 조직은 ABC(avidin-biotin complex)법을 이용하여 다음과 같이 실시하였다. 먼저 1:200로 희석된 1차 항체인 monoclonal antibody against synaptophysin 용액을 사용하여 4°C에서 24시간동안 배양하였다. 이후 .01M PBS로 조직을 수세한 후 2차항체인 goat anti-mouse IgG(1:150)로 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 다시 수세한 후 3차항체로 Vectastatin Elite ABC Regent(Vector, USA)로 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 수세하였으며, 수세가 끝난 조직은 0.01M PBS용액에 .03%의 H₂O₂가 포함된 .3%의 DAB(3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) 용액에 담궈 실온에서 10분간 발색과정을 거친 후 .01M PBS로 수세하였다. 이후 대조염색을 실시한 후 탈수(dehydration)와 청명(cleaning)과정을 거친 후 마지막으로 permounting media(PMM)인 clarion(Biomed, USA)을 이용하여 cover glass로 봉입하였다.

(3) 항체 양성반응 세포 수 분석

면역조직반응 처리과정을 거친 절편들은 반응을 측정하기 위하여 영상분석 프로그램인 Image-Pro Plus version 4.0β 프로그램을 사용하여 단위 면적당 synaptophysin반응을 측정하였다.



*p<.05
그림 1. 각 집단의 혈중알코올농도

4. 결과처리 및 분석

각 검사에서 얻어진 결과는 기술통계학적 분석을 통해 각 집단에서의 측정값을 평균 및 표준오차로 분석하였다. 그리고 운동행동학적 검사 및 조직학적 검사의 결과는 각 집단간의 차이를 살펴보기 위하여 일원배치 분산분석을 실시하였다. 모든 통계처리는 윈도우용 SPSS version 10.0을 이용하여 실시하였으며 유의수준 α는 .05로 하였다. 그리고 Duncan의 다중범위검정(Duncan's multiple range test)을 이용하여 사후검정을 실시하였다.

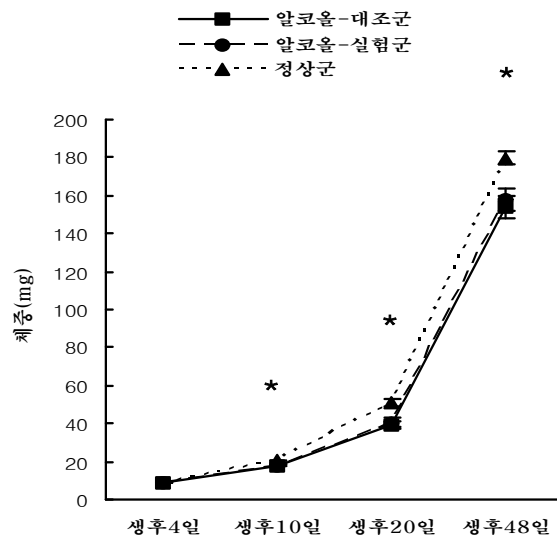
III. 결과

1. 실험동물의 혈중알코올농도

각 집단에서 측정된 혈중알코올 농도값은 그림 1과 같다. 정상군은 .42±.03 mg/dl로 나타났으며, 알코올-대조군은 263.23±15.2 mg/dl 이고 훈련을 받은 알코올-실험군은 254.52±14.7 mg/dl 나타났다. 그리고 알코올-대조군과 알코올-실험군 사이에서는 유의한 차이가 나타나지 않았다(p>.05)

2. 실험동물의 체중변화

정상군과 알코올-실험군 및 알코올-대조군을 대상으로



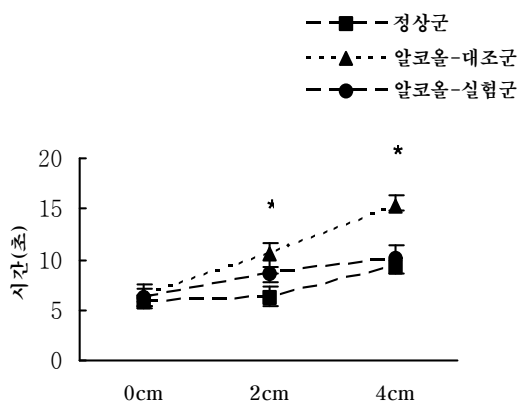
*p<.05
그림 2. 각 집단의 체중 변화

로 일반적인 성장지표로 고려되는 체중의 변화를 살펴본 결과는 그림 2와 같다. 그리고 세 집단 사이의 통계학적 유의성을 검정하기 위하여 일원배치 분산분석을 실시한 결과 알코올을 주입하기 전인 생후 4일에는 유의수준이 .826으로 나타나 세 집단 사이에서 유의한 변화가 관찰되지 않았다($F=1.193, p>.05$). 그러나 알코올 주입이 끝난 생후 10일에는 유의수준이 .00으로 나타나 정상군에 비해 알코올-대조군과 알코올-실험군의 체중이 유의하게 작은 것으로 나타났으며($F=45.859, p<.05$), 복합운동훈련을 시작한 생후 20일($F=47.623, p<.05$)과 훈련이 끝난 생후 48일($F=40.652, p<.05$)에도 유의수준이 .00으로 나타나 동일한 양상을 보였다. 그리고 Duncan의 다중 범위 검정을 이용하여 사후 검정을 실시한 결과 정상군과 알코올-대조군 및 알코올-실험군 간에는 유의한 차이가 있었으나, 알코올-대조군과 알코올-실험군 사이에서는 유의한 차이가 관찰되지 않았다(그림 2).

3. 운동행동학적 검사

1) Horizontal ladder beam 검사

체지 배치의 정확성과 움직임의 협응성을 검사하기 위해 horizontal ladder beam 검사를 실시한 결과 0 cm에서는 세 집단간에 유의수준이 .462($F=0.814, p>.05$)로 나타나 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나, 간격이 2 cm에서는 유의수준이 .00($F=23.92, p<.05$)으로 나타나 통계학적으로 유의한 차이를 나타냈다. 그리고



* $p<.05$

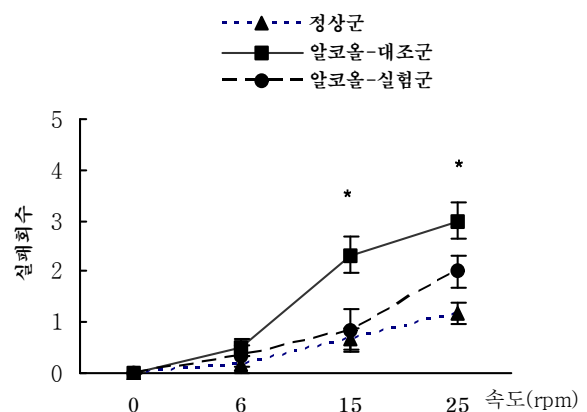
그림 3. Horizontal ladder beam 검사

간격이 4 cm 일때도 유의수준이 .00($F=48.17, p<.05$)으로 세 집단 사이에서는 유의한 차이를 나타냈다.

그리고 사후검정을 실시한 결과 간격이 2 cm일때는 정상군과 알코올-대조군 및 실험군 간에 유의한 차이를 보였을 뿐만 아니라, 알코올-대조군과 알코올-실험군 사이에서도 유의한 차이를 보여 복합운동훈련의 적용으로 운동기능의 향상을 나타냈다. 또한 간격이 4 cm 일 때 사후 검정을 통하여 각각의 집단간의 유의성을 살펴본 결과 정상군과 알코올-대조군사이에서는 유의한 차이를 보였으나 알코올-실험군 간에는 유의한 차이를 보이지 않았다. 그리고 알코올-대조군과 알코올-실험군 간에는 유의한 차이를 나타냈다(그림 3).

2) Rota rod 검사

운동의 협응성과 균형능력을 검사하기 위하여 Rota rod 검사를 실시한 결과 실험동물들은 RPM이 올라갈수록 낙하 회수가 증가하였으며 알코올-실험군에 비해 알코올-대조군의 증가폭이 크게 나타났다. 6RPM에서는 유의수준이 .521($F=0.682, p>.05$)으로 나타나 세 집단사이에 통계학적인 유의성이 관찰되지 않았으나, 15RPM에서는 유의수준($F=7.982, p<.05$)이 0.004로 나타나고, 25RPM에서는 유의수준이 .003($F=8.585, p<.05$)으로 나타나 세 집단간에 통계학적으로 유의한 차이를 보였다(그림 4). 또한 사후검정을 실시한 결과 15RPM에서는 정상군과 알코올-대조군사이에서는 유의한 차이가 나타났으나 알코올-실험군 사이에서는 유의한 차이가 나타나지 않았다. 그리고 복합운동훈련에 따른 차



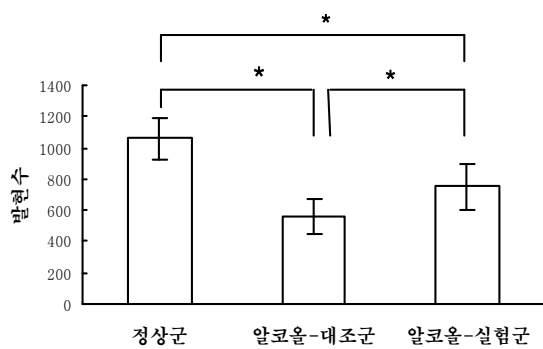
* $p<.05$

그림 4. Rota rod 검사

이를 검정하기 위하여 알코올-대조군과 알코올-실험군 사이의 유의성을 살펴본 결과 통계학적으로 유의한 차이를 보였다. 과제의 난이도를 올려 25RPM에서 검사를 실시한 결과 정상군과 알코올-대조군 및 알코올-실험군 사이에서는 유의한 차이를 보였으나, 알코올-대조군과 알코올-실험군 사이에서는 유의한 차이를 관찰할 수 없었다(그림 4).

4. 소뇌 피질의 Synaptophysin의 발현 양상

소뇌 신경연접단백질인 synaptophysin의 발현 양상을 살펴본 결과는 그림 5와 같다. 소뇌 피질의 synaptophysin의 발현양상을 살펴보면 정상군은 알코올-대조군이나 알코올-실험군에 비해 synaptophysin의 발현이 현저하였고, 알코올-대조군에 비해 알코올-실험군에서 더욱 현저한 synaptophysin의 발현양상을 관찰할 수 있었다. 그리고 세 집단 사이에서는 유의수준이 .00($F=22.23$ $p<.05$)으로 나타나 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다. 또한 synaptophysin은 소뇌의 피질 영역중 가장 안쪽의 과립층(granular layer)에서 가장 많은 발현 양상을 보이고 있다(그림 6). Duncan의 사후검정을 통하여 각 집단간의 유의성을 살펴본 결과 정상군과 알코올-대조군 및 알코올-실험군 간에 유의한 차이가 있는 것으로 나타났을 뿐만 아니라 알코올-대조군에 비해 알코올-실험군 간에도 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다(그림 5)(그림 6).



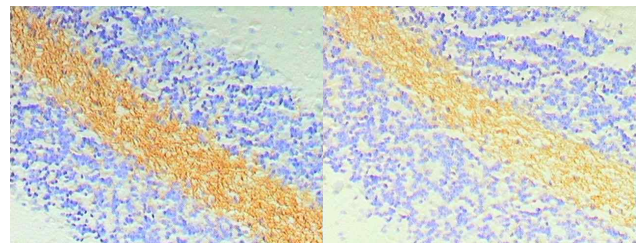
* $p<.05$

그림 5. Synaptophysin 발현 결과

IV. 고찰

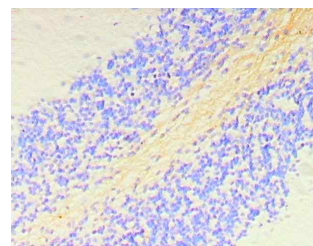
뇌 성장기의 알코올 독성에 대한 노출은 중추신경계의 세포사를 통한 신경변성을 유발시켜 중추신경계의 발달에 악영향을 미친다. 태내 알코올 노출이 신경병리 현상에 영향을 미칠 수 있는 조건들로는 저산소증(hypoxic), 저혈당증(hypoglycemic)이나 태아 환경내의 허혈, 과도한 산소유리기의 생성 및 내인성 항산화(endogenous protective antioxidants)의 감소등을 들수 있다(Agarwal 등, 1999; Andrews 등, 1999). 또한 세포 손상이나 세포사를 유발할수 있는 갑축 항상성의 변화와 세포의 대사 변화(DNA hypomethylation) 및 에탄올의 대사물질인 아세트알데하이드의 유해성으로 인한 손상이 있다. 임신기간 동안 알코올에 의한 태반 혈관의 수축으로 영양분 공급의 감소 및 정상적인 발달과정에 필요한 비타민 A와 엽산(folic acid)의 저하 및 CYP2E에 의한 과산화반응 등도 원인으로 제시되고 있다(Copani 등, 2001; Schoedel 등, 2001). Obernier 등(2002)의 연구에 의하면 알코올에 노출된 경험이 있는 흰쥐의 경우 정상적인 뇌 발달시기에 세포사하는 세포수의 15배 정도에 해당하는 뇌 세포가 파괴된다고 한다.

흰쥐는 생후 초기 발달기 동안 두뇌의 급속한 성장



정상군

알코올-실험군



알코올-대조군

그림 6. 소뇌피질내의 synaptophysin 발현양상

이 이루어지는데 특히 소녀의 발달은 생후 4일에서 10일경에 이루어진다. 이 시기는 사람의 임신 마지막 3기에 해당하는 시기로서 태아 알코올중후군의 동물 모델에서 알코올을 투여하는 시기로 이용된다. 흰쥐의 생후 10일경의 뇌 발달은 사람의 제태 36주에서 40주령 유아의 뇌 발달에 해당되며 생후 30일의 흰쥐는 사람의 아동기에 해당되는 시기이다(Bayer 등, 1993; Goodlett과 Eilers 1997). Bonthius과 West(1990)는 생후 4~9일 동안 매일 하루에 4회 및 2회에 걸쳐 4.5 g/kg/day 용량의 알코올을 투여시킨 저용량 집단과 6.6 g/kg/day의 알코올을 투여한 고용량 집단을 비교한 결과, 매일 저용량의 알코올을 투여시킨 흰쥐가 고용량의 알코올을 주여시킨 흰쥐보다 뇌중량이 더욱 감소되고 뇌신경세포의 손상이 더욱 심각하다고 보고하였다. 본 연구에서는 신생흰쥐에게 알코올성 뇌 손상을 유발시키기 위하여 생후 4일된 신생흰쥐에게 7일간, 즉 생후 4일에서 10일까지 11%(v/v)의 에탄올이 포함된 우유 유동식(4.9 g/kg/day)을 경구 투여한 후 심장천자를 통해 혈액을 채취하여 혈중 알코올 농도를 측정하였다. 알코올을 투여하지 않은 정상군은 알코올을 투여한 대조군과 실험군의 평균 혈중 알코올 농도를 측정된 결과 알코올-대조군과 알코올-실험군은 각각 263.23±15.2 mg/dl, 254.52±14.7 mg/dl로 나타났다. 이 수치는 선행연구자들의 결과와 일치하는 것으로 복합운동훈련을 적용하기에 앞서 동일한 조건의 알코올성 손상이 유발되었음을 의미한다. 또한 일반적인 신체 발달의 지표로서 이용될 수 있는 체중을 측정한 결과 알코올이 주입된 알코올-대조군 및 알코올-실험군은 정상군에 비해 체중 증가가 유의하게 작은 것으로 나타났는데 이러한 결과는 태아알코올중후군의 진단 기준인 신체발달의 지연으로 볼 수 있다. 생후 4일에서 9일 사이에 10.2%(v/v)의 에탄올을 실험동물에게 투여하여 체중을 연구한 Goodlett과 Eilers(1997)의 연구에서 보고된 결과는 본 연구에 비해 체중 감소가 크게 나타났는데 이러한 차이는 본 연구에서는 1일 4.9 g/kg/day의 양을 주입한 반면 선행연구자들은 6.5 g/kg/day의 고용량을 투여하여 나타난 결과로 사료된다.

복합운동훈련은 조롱박세포의 가지돌기 가지치기(dendritic branching)와 신경연접전 소포를 증가시키고 신경연접형성을 촉진하여 기억 및 학습능력을 향상에 관여한다. 최근 운동기술학습이나 복합운동훈련을 통해 신경세포와 신경연접의 가소성이 촉발되어 새로운 신경

연접이 형성되고 신경연접 종말의 성장을 도와 신경연접간의 접촉수를 증가시킨다는 보고들이 있어(Sanes, 2003) 운동학습이나 운동훈련의 중요성이 부각되고 있다.

본 연구에 적용된 훈련방법은 운동 학습력과 균형 및 협응력을 증진 시킬 수 있는 과제들로 구성하였다. 훈련 과제들은 권도윤(2001)과 Kleim 등(1998)의 연구에서 사용된 운동학습 모델을 수정하여 사용하였으며 이러한 훈련과제들은 선행연구자들의 연구결과를 통해 그 효과가 검증된 과제들이다. 본 연구에서는 복합운동 훈련이 운동기능에 미치는 효과를 살펴보기 위하여 다양한 운동기능검사를 실시하였다. 먼저 체지 배치의 정확성과 움직임의 협응성을 평가하기 위해 선행연구자들이 사용한 검사 방법을 수정하여 실시한 Horizontal ladder beam 검사에서 정상군과 알코올-대조군 및 알코올-실험군간에 유의한 차이를 보였다. 또한 Rota rod 검사의 결과 운동과제가 쉬운 과제일 경우에는 유의한 차이가 관찰되지 않았으나 과제의 난이도가 어려워질수록 정상군과 운동훈련을 적용받은 알코올-실험군에 비해 훈련을 받지 않은 알코올-대조군의 운동기능이 더욱 나쁜 것으로 관찰되었다.

운동기능의 향상은 신경계 회복의 행동학적 증거로 볼 수 있는데, 이러한 신경계의 회복 기전에는 신경연접의 강화를 비롯한 신경연접가소성이 포함된다. 따라서 소녀의 신경연접가소성을 검증하기 위하여 본 연구에서는 신경연접단백질인 synaptophysin의 발현양상을 관찰하였다. Synaptophysin은 발달과정동안 신경연접의 형성 정도와 비례하여 증가하고, 신경연접의 분포(synaptic profile distribution)와도 일치하므로 해부학적인 재구성(anatomical remodeling)이나 신경 발달의 연구에 있어 신경연접의 증가나 감소를 측정하는데 지표로서 많이 이용되고 있는 단백질이다(Cabalka 등, 1990; Calhoun 등, 1996; Liu 등, 1996; Masliah 등, 1991, 1993). 특히 synaptophysin은 신경세포체의 세포질 내부보다는 축삭 말단부에 집중적으로 분포하여 신경연접부형성에 관여하며, 신경연접부형성이 이루어지는 생후 4일에서 14일까지 가장 높은 발현양상을 보인다.

복합운동훈련을 적용시킨 Frick 등(2003)은 환경적인 강화가 주어진 흰쥐에서 공간기억력이 향상될 뿐만 아니라 신경연접전 단백질인 synaptophysin이 증가되고, 김성수(2002)는 수중미로를 이용하여 공간학습을 실시한 흰쥐에서 운동학습기간 동안 synaptophysin mRNA가 점차적으로 증가하는 양상을 나타내며 이러한 변화

들은 신경연접의 특성을 변화시킨다는 선행자들의 연구들도 있다. 본 연구의 결과에서는 알코올-실험군은 알코올-대조군에 비해 synaptophysin의 발현이 유의하게 높은 것으로 나타났으며 이러한 양상은 소뇌의 여러 부위에서 동일한 양상으로 나타났다. 그리고 알코올에 노출되지 않은 정상군은 신생기동안 알코올에 노출된 군들에 비해 synaptophysin의 발현이 높게 나타났다. 특히 소뇌의 과립세포층에서 그 발현이 매우 뚜렷이 관찰되었는데 이는 과립세포층에서 여러 세포들의 연접이 이루어지기 때문으로 사료된다. 과립세포층 중 바깥과립세포층은 과립세포가 안쪽과립세포층으로 이동됨에 따라 생후 20에서 25일에 완전히 사라지며 생후 21일에는 안쪽과립세포층이 형성되고 생후 30일까지 과립세포가 골지세포 및 이끼섬유와 함께 사구를 형성하는 것으로 알려져 있다.

많은 선행연구들에 의하면 복합운동기술훈련은 소뇌 피질의 PML에서 연접형성을 촉진시키고 운동수행력의 장애를 개선시키는 것으로 알려지고 있다(이계주, 2001; Klintsova 등, 2002). Anderson 등(1996)은 정상 성숙원 쥐를 대상으로 하여 다양한 넓이의 막대와 사다리, 체인 및 시소 등으로 이루어진 장애물들을 이용하여 운동학습, 균형 및 협응력을 향상시킬 수 있는 운동기술학습을 30일간 적용한 결과 운동학습집단이 소뇌 조롱박세포의 신경연접수가 80% 이상 증가하였음을 보고한 바 있다.

많은 선행연구자들과 본 연구의 결과를 종합하여 볼 때 정상적인 발달과정에 손상을 입은 실험동물에게 지속적이고 효과적인 자극을 이용한 복합운동훈련을 적용하면 균형과 협응력 및 운동 학습력을 증진되는 것으로 확인되었다. 또한 소뇌의 신경연접에 관여하는 synaptophysin의 발현이 더욱 현저함을 확인할 수 있었다. 복합운동훈련이 소뇌의 신경연접가소성을 강화시켜, 운동기능의 향상에 기여함을 알 수 있었다. 신경연접가소성은 신경세포들을 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 신경연접가소성으로 인해 기존의 신경망이 더욱 강화될 뿐만 아니라 새로운 신경망이 형성될 수 있다. 따라서 정상적인 중추신경계의 발달과정이나 태내 알코올 노출로 인하여 정상적인 발달 과정에 손상을 입은 뇌에 지속적이고 효과적인 자극을 통하여

다양한 운동훈련을 제공한다면 중추신경계의 신경연접가소성과 운동기능의 발달에 긍정적인 효과를 미칠 수 있을 것이다.

더 나아가 다양한 운동학습이나 운동훈련을 통한 다양한 재활 치료적 접근 방법이 중추신경계의 발달에 긍정적인 효과를 미칠 뿐 아니라, 중추신경계 발달에 손상을 입은 아동의 중추신경계 가소성에 긍정적인 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결론

균형 및 협응력과 운동학습력을 증진시킬 수 있는 복합 운동 훈련이 태내 알코올 노출로 인한 소뇌 손상에 미치는 효과를 알아보기 위하여 실험을 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세 집단의 혈중 알코올 농도를 측정한 결과 알코올-대조군 및 알코올-실험군은 정상군에 비해 혈중 알코올농도가 유의하게 높았으나($p < .05$), 알코올-대조군과 알코올-실험군 사이에서는 유의한 차이가 나타나지 않았다($p > .05$).

2. 일반적인 성장지표로 이용될 수 있는 체중의 변화를 살펴본 결과 세 집단 간에는 유의한 차이가 관찰되었다($p < .05$). 정상군에 비해 알코올-대조군과 알코올-실험군의 체중이 유의하게 적게 나타났으나, 알코올-대조군과 알코올-실험군 사이에서는 차이가 관찰되지 않았다.

3. 운동기능을 평가한 결과 세 집단간에는 유의한 차이가 관찰되었다($p < .05$).

4. 소뇌의 신경연접단백질인 synaptophysin의 발현양상을 관찰한 결과 세 집단간에 유의한 차이가 관찰되었다($p < .05$). 정상군에 비해 알코올-대조군과 알코올-실험군의 synaptophysin 발현이 현저히 낮았으며, 알코올-실험군 이 알코올-대조군에 비해 높은 발현양상을 나타냈다.

위의 결과를 종합하여 볼 때 중추신경계 발생시기 동안의 알코올 노출은 소뇌의 발달을 저해시키는 것으로 나타났다. 그리고 발달기 동안 적용된 복합운동훈련으로 신경연접단백질인 synaptophysin의 발현에 영향을 미쳐 신경연접형성을 포함한 신경연접가소성이 야기되었으며 이로 인해 운동기능의 향상이 초래되었으므로 사료된다.

인용문헌

- 권도윤. 흰쥐 소뇌에서 cDNA microarray를 이용한 운동학습관련 유전자 발굴. 고려대학교, 석사학위논문, 2001.
- 김성수. 공간기억학습이 흰쥐 해마의 신경연접소포 단백질 유전자 변화에 미치는 영향 연구. 고려대학교, 석사학위논문, 2002.
- 임재형, 정성태. 쥐의 점프 운동학습이 소뇌 퍼킨제 세포의 신경연접 효율성에 미치는 영향. 운동과학. 1996;5(1):13-23.
- 이계주. Specific synaptic plasticity between parallel fibers and purkinje cell dendritic spines in the cerebellar cortex following motor skill learning. 고려대학교, 석사학위논문, 2001.
- Abel EL. Fetal alcohol syndrome: Fetal alcohol effect. New York; Plenum Press, 1989.
- Agarwal R, Gupta A, Shukla GS. Developmental pattern of reactive oxygen species generation and antioxidative defense machinery in rat cerebral microvessels. *Int J Dev Neurosci*. 1999;17:673-679.
- Anderson BJ, Alcantara AA, Greenough WT. Motor-skill learning: Changes in synaptic organization of the rat cerebellar cortex. *Neurobiol Learn Mem*. 1996;66:221-229.
- Andrews DL, Williams GS, Mahoney JC, et al. DNA fragmentation during exposure of rat cerebella to ethanol under hypoxia imposed in vitro. *J Neurobiol*. 1999;38:82-92.
- Bayer SA, Altman J, Russo RJ, et al. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology*. 1993;14:83-144.
- Bonthius DJ, West JR. Alcohol-induced neuronal loss in developing rats: Increased brain damage with binge exposure. *Alcohol Clin Exp Res*. 1990;14(1):107-118.
- Catsicas S, Larhammar D, Blomqvist A, et al. Expression of a conserved cell-type-specific protein in nerve terminals coincides with synaptogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88(3):785-789.
- Climent ME, Pascual M, Renau-Piqueras J, et al. Ethanol exposure enhances cell death in the developing cerebral cortex: Role of brain-derived neurotrophic factor and its signaling pathways. *J Neurosci Res*. 2002;68(2):213-225.
- Coles CD, Platzman KA, Raskind-Hood CL, et al. A comparison of children affected by prenatal alcohol exposure and attention deficit, hyperactivity disorder. *Alcohol Clin Exp Res*. 1997;21(1):150-161.
- Cook JD. Biochemical markers of alcohol use in pregnant women. *Clin Biochem*. 2003;36(1):9-19.
- Copani A, Uberti D, Sortino MA, et al. Activation of cell-cycle-associated proteins in neuronal death: A mandatory or dispensable path? *Trends Neurosci*. 2001;24(1):25-31.
- Frick KM, Fernandez SM, Stephanie M. Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiol Aging*. 2003;24(4):615-626.
- Goodlett CR, Eilers AT. Alcohol-induced Purkinje cell loss with a single binge exposure in neonatal rats: A stereological study of temporal windows of vulnerability. *Alcohol Clin Exp Res*. 1997;21(4):738-744.
- Goodlett CR, Horn KH. Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. *Alcohol Res Health*. 2001;25(3):175-184.
- Hannigan JH, Berman RF. Amelioration of fetal alcohol-related neurodevelopmental disorders in rats: Exploring pharmacological and environmental treatments. *Neurotoxicol Teratol*. 2000;22(1):103-111.
- Hinz B, Becher A, Mitter D, et al. Activity-dependent changes of the presynaptic synaptophysin-synaptobrevin complex in adult rat brain. *Eur J Cell Biol*. 2001;80(10):615-619.
- Hsiao SH, Parrish AR, Nahm SS, et al. Effects of early postnatal ethanol intubation on GABAergic synaptic proteins. *Dev Brain Res*. 2002;138(2):177-185.
- Kleim SA, Swain RA, Armstrong KA, et al. Selective synaptic plasticity within the cerebellar cortex following complex motor skill learning.

- Neurobiol Learn Mem. 1998;69(3):274-289.
- Klintoova AY, Scamra C, Hoffman M, et al. 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 Res.* 2002;937(1-2):83-93.
- Klintoova A, Briones T, Hussain A, et al. Plasticity of neurons in motor cortex after neonatal exposure to ethanol: Effect of motor activity alone and complex motor learning. *Soc Neurosci Abstr.* 1998;24:1983
- Leclerc N, Beesley PW, Brown I, et al. Synaptophysin expression during synaptogenesis in the rat cerebellar cortex. *J Comp Neurol.* 1989;280(3):197-212.
- Luscher C, Nicoll RA, Malenka RC, et al. Synaptic plasticity and dynamic modulation of the post-synaptic membrane. *Nat Neurosci.* 2000;3(6):545-550.
- Maier SE, West JR. Regional differences in cell loss associated with binge-like alcohol exposure during the first two trimesters equivalent in rat. *Alcohol.* 2001;23(1):49-57.
- Mattson SN, Riley EP. Brain anomalies in fetal alcohol syndrome. In: Ernest LA. *Fetal alcohol syndrome: From mechanism to prevention.* London, UK, CRC-Press, 1996;51-68.
- Mattson SN, Riley EP, Sowell ER, et al. A decrease in the size of the basal ganglia children with fetal alcohol syndrome. *Alcohol Clin Exp Res.* 1996;20(6):1088-1093.
- Obernier JA, White AM, Swartzwelder HS, et al. Cognitive deficits and CNS damage after a 4-day binge ethanol exposure in rats. *Pharmacol Biochem and Behav.* 2002;72(3):521-532.
- Sampson P, Streissguth AP, Bookstein FL, et al. Incidence of fetal alcohol syndrome and prevalence of alcohol-related neurodevelopmental disorder. *Teratology.* 1997;56:317-326.
- Sanes JN. Neocortical mechanisms in motor learning. In: *Current Opinion in Neurobiology.* London, UK, Current Biology Ltd, 2003.
- Schoedel KA, Sellers E.M, Tyndale RF. Induction of CYP2B 1/2 and nicotine metabolism by ethanol in rat liver but not rat brain. *Biochem Pharmacol.* 2001;62(8):1025-1036.
- Soblosky JS, Colgin LL, Chorney-Lane D, et al. Ladder beam and camera video recording system for evaluating forelimb and hindlimb deficits after sensorimotor cortex injury in rats. *Neurosci Methods.* 1997;78(1-2):75-83.
- Sowell ER, Jernigan TL, Mattson SN, et al. Abnormal development of the cerebellar vermis in children prenatally exposed to alcohol: Size reduction in lobules I-V. *Alcohol Clin Exp Res.* 1996;20:31-34.
- Steward O, Worley P. Local synthesis of proteins at synaptic sites on dendrites: Role in synaptic plasticity and memory consolidation? *Neurobiol Learn Mem.* 2002;78(3):508-527.

논문접수일 2005년 8월 4일

논문게재승인일 2005년 8월 28일