

허혈성 뇌졸중 유발 백서에서 수중운동이 하지근 및 대뇌의 HSP 70 발현에 미치는 영향

김기도, 김은정, 천진성, 김경윤, 김계엽
동신대학교 물리치료학과
유영대
광주 원광한방병원 물리치료실

Abstract

Effects of Swimming Exercise on Hind-Limb Muscles and HSP 70 Expression in the Ischemic Stroke Model of Rats

Gi-do Kim, M.Sc., P.T.
Eun-jung Kim, M.Sc., P.T.
Jin-sung Chun, B.S., P.T.
Kyoung-yoon Kim, M.Sc., P.T.
Gye-yeop Kim, Ph.D., D.V.M.

Dept. of Physical Therapy, Dongshin University

Young-dae Yoo, Ph.D., P.T.

Dept. of Rehabilitation Medicine, Wonkwang University Medical Center

Ischemic stroke results from a transient or permanent reduction in cerebral blood flow that is restricted to the territory of a major brain artery. Thus, this study was performed to examine (1) the effects of swimming exercise on the improvement of muscle atrophy, and (2) exercise and HSP 70 expression in an ischemic stroke model induced by middle cerebral artery occlusion. The results of this study were as follows: One week after ischemic stroke was induced, changes appeared in the muscle weight of the gastrocnemius muscle due to muscle atrophy in the affected side. Group II showed statistically significant difference from group III eight weeks after ischemic stroke was induced. ($p < .05$). One week and eight weeks after ischemic stroke was induced there was significant decrease in the relative muscle weight of the gastrocnemius muscle in each group except Group IV, while there was statistically significant increase in group II eight weeks after ischemic stroke was induced, compared to group III ($p < .05$). For neurologic exercise behavior tests, Group II generally had the highest score, compared to other groups. In immunohistochemical observations, Group II showed a decrease in HSP 70. The above results suggest that swimming exercise improved muscle atrophy, changed the HSP 70 expression of ischemic stroke in rats, and contributed to the improvement of exercise function.

Key Words: Heat Shock Protein 70; Ischemic stroke; Swimming exercise.

I. 서론

뇌졸중(stroke)은 일명 뇌혈관 질환으로 뇌에 혈액을 공급하는 뇌동맥의 병변으로 국소적 혹은 전반적인 신

경학적 결손의 증상이 24시간 이상 지속되는 것으로 (Shah, 2006), 뇌혈관의 파열 혹은 폐색에 의한 비외상성 뇌손상에 의해 초래되는 운동조절 능력의 상실, 감각 소실, 인지 및 언어 장애, 평형 장애 등의 증상이 특

정적으로 나타나는 돌발적 신경학적 결손이라 할 수 있다(이성재, 2000). 특히 편마비로 인한 활동이나 운동의 저하, 혈액 공급의 감소, 영양 섭취의 감소, 호르몬에 의한 자극의 감소, 신경 자극의 감소는 골격근 장애를 초래하며(McCance과 Heuther, 1994), 활동이 저하됨으로써 점차 근원섬유 숫자가 감소하고 근섬유 횡단면적이 작아져 근 질량이 소실되는 근위축이 발생된다(Scelsi 등, 1984).

뇌졸중으로 인한 근위축을 경감시키기 위해 물리치료분야에서는 여러 가지 운동 방법들이 연구되어지고 있다. 적당한 강도, 기간, 빈도에 의한 운동훈련은 골격근의 비대, 근력의 증가, 유산소 대사 능력의 증가 및 지구력의 증진을 가져오며, 지구력 훈련에 대한 적응으로 골격근의 산화능력이 커진다고 보고되었다(박상갑, 2000). 뇌허혈로 인한 뇌신경의 손상과 관련하여 지구성 운동은 신경재생(neurogenesis)의 중요한 자극 방법으로 알려져 있으며, 이중 수중운동은 가장 일반적인 유산소성 운동 중 하나로, 근위축 후 골격근 세포의 퇴행성 미세구조 변화를 억제하고, 빠른 회복을 도와주며, 뇌 기능에 있어서도 다양한 변화를 야기한다고 알려져 있다. Radak 등(2001)은 쥐를 대상으로 한 연구에서 고정화 후 1회의 수중운동이 산화적 스트레스 제거 뿐 아니라 인지기능을 정상화 시켰다고 보고하였고, Senturk 등(2000)은 장기간의 수중운동이 노화(aging)와 관련된 체성감각의 변화를 예방한다고 하였다.

뇌손상의 방에 관여하는 물질과 허혈성 뇌손상에 의한 뇌세포 손상에서 다양한 유전자의 활성변화 및 단백질 생성의 변화가 유도 되는 것으로 알려졌는데, 뇌 허혈 후 발현이 증가되는 유전자로 초기유도 유전자, 열충격 단백질(heat shock protein, HSP), 신경 성장 인자, 인슐린 유사 성장 인자 등이 있고 감소하는 유전자로는 뉴트로핀 3, GABA A 수용체 등이 있다(Sharp와 Sager, 1994). 이중 HSP는 스트레스유발 단백질의 일종으로 열 충격이나 허혈 또는 각종 스트레스 등 변성 단백질을 생산하는 모든 스트레스에 대한 반응에 의해 그 발현이 증가되며(Abe 등, 1993), 세포의 항상성 유지와 변형된 단백질 복원에 중요한 기능을 수행한다(Georgopoulos와 Welch, 1993). 또한 HSP는 각종 외부 자극에 대한 뇌의 반응지표로 사용되고 있으며 국소 뇌 허혈이 유발될 경우 뇌혈류가 매우 낮은 부위를 제외한 모든 허혈세포에서 HSP mRNA가 발현된다고 보고되었다(Yenari 등, 1998).

특히 분자량이 70kDa인 hsp70 family는 hsc70(heat shock cognate), hsp70, grp78 등으로 구성되며(Marcuccilli와 Miller, 1994), 고체온, 허혈, 경련과 조직 손상 등의 자극에 반응하기 때문에 세포손상의 표지물질로 인식되고 있다(Gonzale 등, 1989).

따라서 본 연구에서는 허혈성 뇌졸중 유발 후 수중운동이 근위축 및 운동기능 회복에 미치는 효과를 알아보기 위하여 정량적 분석으로 근 무게 측정과 HSP70 발현 변화정도를 비교분석하고, 운동기능회복평가를 통해 기능회복 정도를 관찰하여 뇌졸중 후 수중운동의 임상적 효율성을 평가하는데 중요한 자료로 제공하고자 한다.

II. 연구방법

1. 실험시기 및 동물

본 실험에서는 Sprague-Dawley계 수컷 백서를 8주 동안 각 군당 5마리씩 할당하여 20마리를 사용하였으며, HSP 70 발현 및 면역조직화학적 검사를 위해 40마리를 사용하였다. 사육실의 온도는 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 10\%$ 를 유지하였으며, 명암은 12시간 주기로 하였다. 고형사료와 물은 자유롭게 먹도록 하였다. 실험군의 분류는 표 1과 같으며, 허혈성 뇌졸중 유발 후 자세반사 검사를 통해 신경학적인 증상이 나타나는 개체만을 가지고 실험을 실시하였다.

표 1. 실험군의 일반적인 분류

군	처치
I (n=15)	중대뇌동맥 폐쇄후 무부하 수중운동
II (n=15)	중대뇌동맥 폐쇄후 10% 체중 부하 수중운동
III (n=15)	중대뇌동맥 폐쇄
IV (n=15)	허위 수술군

2. 뇌졸중 유발

Longa 등(1989)의 방법에 따라 근위부 뇌허혈 기법을 시행하였다. 70% N_2O 와 28.5% O_2 가스에 1.5% enflurane을 혼합한 마취가스로 흡입 진신마취를 시킨 후 내경동맥을 분리하여 미세혈관용 클립으로 내경동맥과 총경동맥의 혈행을 완전히 차단하였다. 내경동맥을 묶고 외경동맥 분지의 근위부를 절찰한 후 미세하게 절개를 하고 4-0 나일론 봉합사에 실리콘¹⁾으로 코팅하여

1) Xantopren, Bayer Dental, Germany.

만든 probe를 외경동맥에서부터 총경동맥과 내경동맥의 분지로 들어가도록 삽입하였다. 허위 수술군은 뇌혈류를 차단하지 않고 피부를 절개한 후 봉합, 소독하고 마취에서 깨어난 후 자유롭게 움직이게 하였다.

3. 수중운동

수중운동은 직경이 50 cm인 플라스틱 원통형 수조에서 실시하였다. 수중운동 중 쥐의 꼬리가 바닥에 닿아 쉬는 일이 없도록 하기 위해 수심은 50 cm로 하고, 수온은 30~35℃로 유지하였다. 운동량은 뇌졸중 쥐를 대상으로 수중운동 효과를 검증했던 선행연구(최송화 등, 2000; Kim 등, 2000)를 기초로 VO_{2max} 의 50~65% 강도로 보고된 무부하 상태의 자유유영인 저강도 수중운동과 체중 10% 부하 상태의 자유유영인 고강도 수중운동으로 나누어 8주 동안 실시하였고, 운동시간은 Hachisuka 등(1997)의 방법에 따라 1회 30분씩 주 5회 실시하였다.

4. 실험방법

가. 체중 측정과 하지근 무게 측정

각 군의 체중은 실험 시작과 실험 종료 후 전자저울²⁾을 이용하여 측정하였다. 또한 각 군의 하지근 무게 측정은 우측 비복근을 절제하여 생리식염수로 세척 후 지방조직과 결합조직을 잘라내고 무게를 측정하였다. 상대근 무게는 식이섭취량이 근육의 무게에 미치는 영향을 배제하기 위해 근육 절제 직전 체중에 대한 뒷다리근의 절대 무게 비율(mg/g)로 산출하였다(Kobayashi 등, 1997).

나. 신경학적 운동행동 검사(Neurological motor behavioral test)

뇌허혈 유발 이후 신경학적 운동장애를 나타내는 정도를 여러 가지 행동 검사를 통해 측정하였다. 검사는 뇌졸중 유발 1일, 1, 4, 8주 후 각 3회 반복 측정한다음 평균값을 기록하였다.

(1) 자세반사 검사(Postural reflex test)

Bederson 등(1986)의 검사를 수정한 것으로 정상적인 백서는 양쪽 앞발을 탁자를 향해 뻗어주는 반면, 손상을 받은 백서에서는 손상된 반구의 반대쪽 앞발이 굴

곡되는 것을 볼 수 있다. 행동검사 척도는 양쪽 앞발을 신전시키면 3점, 마비측 앞발은 굴곡 되지만 다른 비정상적인 반응을 보이지 않으면 2점, 자유롭게 움직이도록 두었을 때에 마비측을 향해 원을 그리면 1점을 주었다.

(2) 체지배치 검사(Limb placement test)

De Ryck 등(1989)의 검사를 수정한 것으로 행동검사 척도는 즉각적으로 정확하게 앞발을 배치시키면 3점, 불완전하지만 2초 이상 지연된 이후 내려놓으면 2점, 한쪽 앞발만 내려놓으면 1점, 전혀 내려놓지 않으면 0점을 주었다.

(3) 막대걷기 검사(Beam walking test)

Goldstein과 Davis(1990)의 검사를 수정한 것으로 운동의 통합과 협응성을 검사하기 위해 실시하였다. 행동검사 척도는 올려놓자마자 바닥으로 떨어지면 0점, 막대를 건너갈 수는 없지만 그 위에 앉아 있으면 1점, 걷다가 떨어지면 2점, 막대를 건너지만 전진하는데 마비측 다리를 거의 사용하지 않으면 3점, 50% 이상 미끄러지면서 건너면 4점, 조금만 미끄러지면서 건너면 5점, 전혀 미끄러지지 않으면서 건너면 6점을 주었다.

(4) 철사잡기 검사(Horizontal wire test)

Balduini 등(2000)의 연구를 수정한 것으로, 양쪽 앞발이 철사를 다 잡고 지속적으로 유지하면 3점, 처음에는 양손을 다 잡았다가 꼬리를 당기면 손상두부의 반대쪽 앞발의 힘이 약해져 철사를 놓게 되면 2점, 처음에는 양쪽 앞발로 잡았다가 꼬리를 당기기도 전에 금방 손상두부의 반대쪽 앞발을 놓게 되면 1점, 처음부터 손상두부의 반대쪽 앞발로는 잡을 수 없으면 0점을 주었다.

다. 조직학적 검사

조직학적 검사는 뇌졸중 유발 후 3일, 1주, 8주에 각 군당 5마리씩 할당하여 측정하였다. 고정된 실험동물로부터 뇌조직을 분리한 후 탈수(dehydration)와 청명 과정을 거쳐 파라핀 포매를 실시하였다. 제작된 파라핀 블록은 미세절단기³⁾를 이용하여 4 μ m 두께로 절단한 후에 hematoxylin & eosin 염색을 실시하여 슬라이드를 제작하였다. 근육형태학적 관찰은 광학현미경⁴⁾을

2) Mettler instrument AG CH-8606, Zurich, Swiss.

3) Sakura 2004, Japan.

4) Olympus Bx 50, Japan.

이용하여 현미경에 장착된 CCD 카메라⁵⁾로 관찰하였다.

라. 면역조직화학적 관찰

면역조직학적 검사는 뇌졸중 유발 후 3일, 1주, 8주에 각 군당 5마리씩 할당하여 검사하였다. 선택한 뇌조직을 1% H₂O₂에서 약 15분간 반응시킨 후 10% normal horse serum⁶⁾과 bovine serum albumin⁷⁾이 포함된 phosphate buffer saline에 1시간 동안 반응 시키고, HSP 70 anti-body⁸⁾를 1:200의 비율로 희석시켜 4°C에서 반응시켰다. 인산완충용액으로 세척한 후, NiCl₂·H₂O를 혼합한 diaminobenzidine tetrachloride⁹⁾에서 발색시키고, 탈수, 봉합하여 조직표본을 제작하였다. HSP 70의 발현 정도는 면역조직화학적 방법으로 처리한 조직절편을 광학현미경에서 반정량적 방법으로 구분하여 평가하였다(Trieb 등, 2001).

마. Western blot

뇌졸중 유발 후 3일, 1주, 8주에 각 군당 5마리씩 할당하여 뇌조직을 얻었다. Protein을 추출하기 위하여 조직에 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tri-HCl(pH8.0), 1%-NP 40, 1 mM aprotinin, .1 mM leupeptin, 1mM pepstatin가 함유된 용액을 첨가하여 용해한 다음 14,000 rpm에서 30분 동안 원심 분리하였다. Protein(20 µg)은 10% SDS-polyacrylamidegels을 이용한 전기영동을 통해 변성된 후 polyvinyl difluoride membrane에 전이되었다. Membrane은 PBS에 5% skin milk가 첨가된 용액에서 blocking되었다. 그 다음 antibody HSP 70¹⁰⁾이 첨가된 용액에서 1시간 동안 반응시킨 후 PBS에 .1% tween-20이 함유된 용액에서 세척하였다. Membrane은 rabbit IgG conjugated secondary antibody가 첨가된 용액에서 1시간 동안 반응시킨 다음 관찰하였다.

5. 분석방법

본 연구의 모든 통계는 SPSS version 12.0을 사용하였다. 실험 결과 값은 평균과 표준편차로 나타내었으며, 해당 실험군의 환측 및 건측 근육무게 간의 비교는 짝 비교 t-검정을 하였다. 각 실험군들간의 체중 및 근육무게 변화의 차이를 알아보려고 one-way ANOVA를 실

시하여 Turkey방법으로 사후검정을 실시하였다. 분석 시 유의수준 α=.05로 설정하여 검정하였다.

III. 결과

1. 체중과 근육계의 변화

가. 체중의 변화

각 실험군의 체중의 변화는 표 2와 같다. 각 실험군의 실험 시작 시 20마리의 평균 체중은 266.33±15.78 g으로 각 군 간에 차이가 없는 것으로 나타났다. 실험 8주 후 각 실험군의 근육 절제 직전의 체중은 실험 시작 시 체중보다 각각 30.08%, 23.90%, 31.18%, 38.62%가 증가하는 경향을 나타냈다. 또한 실험 1주 후 각 실험군의 근육 절제 직전의 체중은 실험 시작 시 체중보다 각각 3.44%, 2.58%, 1.92%, 3.40%가 증가하는 경향을 나타냈으며 실험 3일 후 각 실험군의 근육 절제 직전의 체중은 실험 시작 시 체중과 큰 차이를 보이지 않았다.

나. 환측과 건측의 근육 무게 변화

실험 8주 후 각 실험군의 비복근 환측과 건측의 무게는 III군의 환측이 건측에 비해 15.80±5.23 mg 작은 것으로 나타났다. I군과 II군의 환측과 건측의 무게차이는 각각 I군이 9.00±2.45 mg, II군이 4.80±2.45 mg으로 환측이 건측보다 무게가 적었으며 III군과 비교해 볼 때 I군과 II군의 환측과 건측의 차이가 감소하는 경향을 알 수 있었으며, I군과 III군에서 환측과 건측의 무게가 통계적으로 유의한 차이를 보였다(p<.05). 실험 1주 후 각 실험군의 비복근 환측과 건측의 무게는 III군의 환측이 건측에 비해 7.00±4.33 mg 적은 것으로 나타났다. I군과 II군의 환측과 건측의 무게차이는 각각 I군이 6.00±5.23 mg, II군이 6.00±4.61 mg으로 환측이 건측보다 무게가 작았으며 통계적으로 유의한 차이를 보였다(표 3)(표 4).

5) Toshiba, Japan.

6) Vectastain, U.S.A.

7) Sigma, U.S.A.

8) Mouse monoclonal IgG, Santacruz, U.S.A.

9) Sigma, U.S.A.

10) Mouse monoclonal IgG, Santacruz, U.S.A.

표 2. 각 군간 체중의 변화

단위: g

군	8 주			1 주			3 일		
	실험 전	실험 후	후/전(%)	실험 전	실험 후	후/전(%)	실험 전	실험 후	후/전(%)
I	246.00±10.84 ^a	320.00±12.25	130.08	262.00±10.37	271.00±11.40	103.44	280.00±7.91	279.00±10.25	99.64
II	251.00±11.94	311.00±16.36	123.90	271.00±11.94	278.00±12.55	102.58	279.00±9.62	279.00±12.94	100.00
III	263.00±10.37	345.00±10.00	131.18	269.00±9.62	274.17±10.25	101.92	281.00±9.62	282.00±5.70	100.36
IV	246.00±7.42	341.00±8.22	138.62	265.00±10.00	274.00±7.42	103.40	283.00±10.37	283.00±10.37	100.00

^a평균±표준편차

표 3. 각 군간의 건측과 환측의 비복근의 무게

단위: mg

군	3 일		1 주		8 주	
	건측	환측	건측	환측	건측	환측
I	142.60±6.50 ^a	142.20±7.33	140.20±2.26	134.20±2.61*	159.60±10.01	150.60±10.01*
II	144.60±5.46	144.60±4.88	143.60±6.28	137.60±6.44*	155.00±9.80	149.20±9.52
III	144.60±6.88	144.60±6.50	142.00±6.11	136.00±6.30*	171.60±4.33	155.80±6.46*
IV	143.80±7.19	144.00±7.24	145.20±4.85	146.00±4.56	172.60±4.61	172.60±5.13

^a평균±표준편차

* p<.05

표 4. 각 군간의 건측과 환측의 절대무게

단위: mg/g

군	3 일		1 주		8 주	
	건측	환측	건측	환측	건측	환측
I	.51±.01 ^a	.51±.01	.52±.02	.50±.02 [†]	.50±.02	.47±.02
II	.52±.03	.52±.02	.52±.02	.51±.03 [†]	.50±.02	.48±.02 [†]
III	.51±.02	.51±.01	.52±.01	.50±.02 [†]	.50±.01	.45±.01 [†]
IV	.51±.02	.51±.02	.53±.01	.53±.01	.51±.01	.51±.01

^a평균±표준편차

[†] 허위수술군과의 유의성(p<.05)

[‡] 중대뇌동맥 폐쇄군과의 유의성(p<.05)

2. 운동기능회복의 변화

자세반사 검사(그림 1A)는 실험 1주 후 I군과 II군이 2점, III군이 1.4점을 각각 나타내었으며, 실험 4주 후 I군이 2.4점, II군이 2.6점, III군이 2.2점을 나타내어 시간이 경과함에 따라 II군이 정상에 가까운 자세반사를 보였다. 체지배치 검사(그림 1B)는 실험 4주 후 I군이 2.6점, II군이 2.4점, III군이 2.2점을 나타내어 시간이 경과함에 따라 I군이 정상에 가까운 체지배치 반사를 보였다. 두 검사에서 실험 8주 후 검사 결과 I군과 II군

에서는 정상에 가까운 반응을 보였으나 III군은 2.5점으로 여전히 비정상적인 체지배치 반사를 보였다. 막대걷기 검사(그림 1C)와 철사잡기 검사(그림 1D)에서 실험 4주일 후 시간 경과에 따라 I군과 II군이 정상에 가까운 검사 결과를 보였으며, 실험 8주 후 I군과 II군에 비해 III군은 여전히 비정상적인 반응을 보였다.

3. 뇌의 형태학적 변화

실험 종료 후 뇌조직의 H & E 염색결과 허혈성 뇌

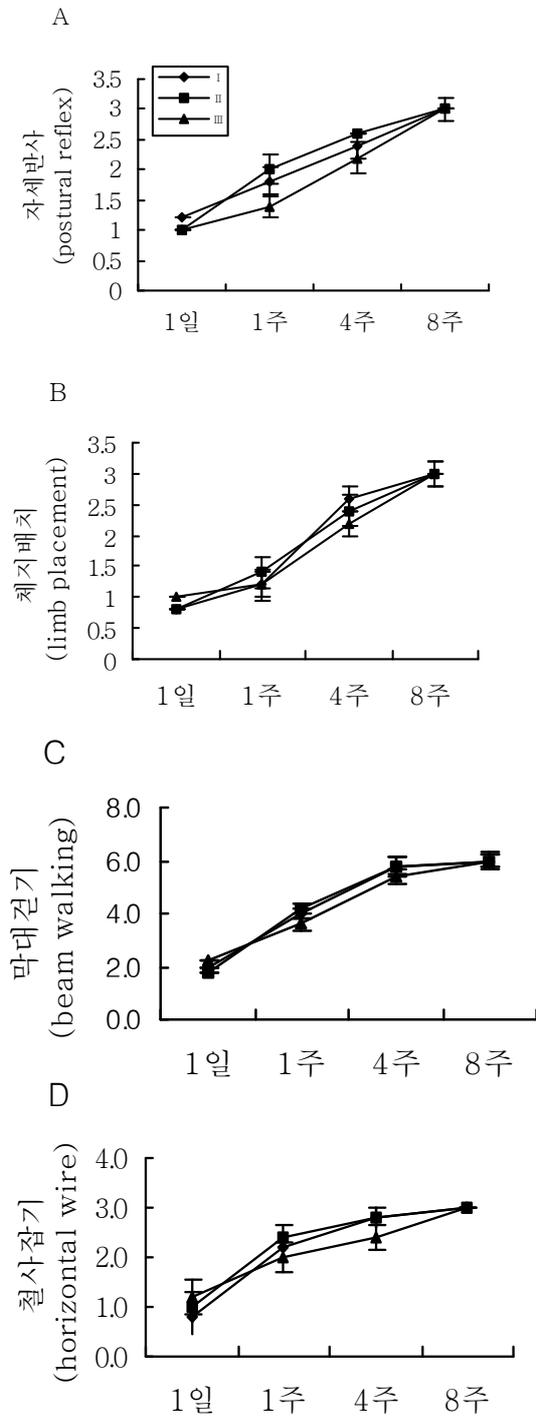


그림 1. 각 군간 운동기능 회복의 변화
A: 자세반사 검사(postural reflex test)
B: 체지배치 검사(limb placement test)
C: 막대걸기 검사(beam walking test)
D: 철사잡기 검사(horizontal wire test)

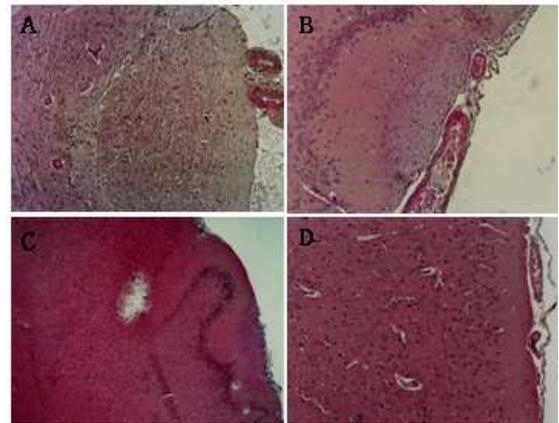


그림 2. 뇌의 형태학적인 변화
A: I 군(저강도 수중운동군, ×100)
B: II 군(고강도 수중운동군, ×100)
C: III 군(실험 대조군, ×40)
D: IV 군(허위 수술군, ×100)

졸중 유발 1주일 후 I 군, II 군, III 군에서 IV 군에 비해 뇌 조직의 신경세포 파괴와 감소, 연화반응 등을 관찰할 수 있었으며 I 군과 II 군에서는 III 군에 비해 뇌조직의 변성과 연화반응이 호전되었음을 관찰할 수 있었다. 특히 II 군에서는 III 군에 비해 신경세포의 변성과 파괴가 호전되어 IV 군과 비슷한 뇌조직의 형태를 관찰할 수 있었다(그림 2).

4. 면역조직학적 검사

대뇌피질에서 발견되는 HSP 70을 면역조직화학적 방법으로 염색한 표본에서 면역반응 양성구조는 대뇌피질의 핵에 짙은 갈색 과립상으로 나타났다. 허혈성 뇌졸중 유발 1주일 후 반정량적으로 평가한 결과 I 군과 II 군에서는 HSP 70 면역반응 양성 세포가 드물게 관찰되었으며, III 군에서는 IV 군에 비해 HSP 70 면역반응 양성 세포가 현저히 증가함을 관찰할 수 있었다. 또한 I 군과 II 군에서는 III 군에 비해 HSP 70 면역반응 양성 세포가 감소하였음을 관찰할 수 있었다(그림 3)(표 5).

표 5. 대뇌에서의 HSP 70의 면역 조직화학적 변화

군	HSP 70 신경세포 발현
I	+
II	+
III	++
IV	-

-: 음성, +: 약한 양성, ++: 강한 양성

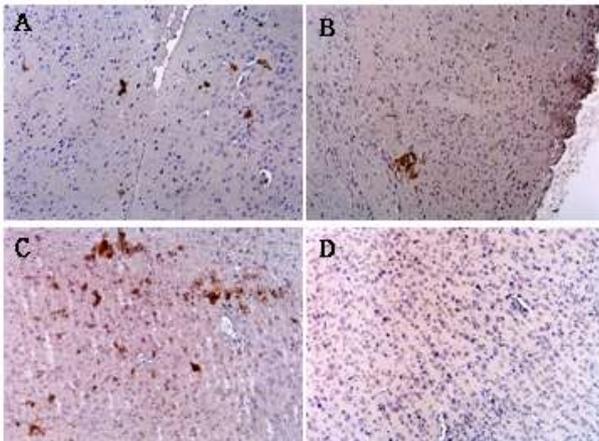


그림 3. 대뇌 피질에서의 HSP 70의 면역조직화학적 변화

- A: I군(저강도 수중운동군, ×100)
- B: II군(고강도 수중운동군, ×100)
- C: III군(실험 대조군, ×100)
- D: IV군(허위 수술군, ×100)

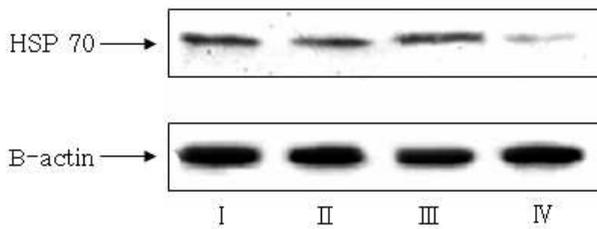


그림 4. 각 군간 HSP 70의 단백질 발현 변화(1주)

5. HSP 70 단백질 발현

뇌조직의 HSP 70 western blotting 결과 허혈성 뇌졸중 유발 1주일 후 III군에서 IV군에 비해 HSP 70 단백질 발현이 현저히 증가함을 관찰할 수 있었으며 I군과 II군에서는 III군에 비해 HSP 70 발현이 감소하였음을 관찰할 수 있었다(그림 4).

IV. 고찰

뇌허혈(cerebral ischemia)은 뇌혈관질환(cerebral vascular disease)의 하나인 뇌졸중에서 가장 많이 나타나는 형태로서, 신경세포를 손상시켜 신경학적 결손을 초래하여 신체마비, 인식장애, 시각 또는 언어장애 등 심각한 문제를 일으키는 질환으로 주로 내경동맥 혹은 중대뇌동맥(middle cerebral artery)의 폐쇄가 가장 큰

원인이 되고 있다. 뇌졸중환자는 신경계 활성 감소, 영양상태 저하(Axelsson 등, 1984), 신체활동 및 운동저하(Duncan, 1994)등의 요인에 의해 근육의 발달과 유지가 어려워 근위축을 초래하게 된다. 뇌졸중 환자에서 나타나는 이러한 근위축은 뇌졸중 동물모델에서도 특징적으로 나타나며, 뇌졸중 유발 백서를 대상으로 이루어진 안경주 등(2000)의 연구에서는 뇌허혈 발생 7일 후에 환측의 가자미근, 족척근 및 비복근 근육무게가 각각 2.7%, 21.5%, 13.2%가 감소하였다고 발표하였으며, 또한 Musacchia 등(1983)은 동물실험에서 활동저하 7일 후에 근육질량이 35%, 14일 후에는 45%가 저하되었다고 보고하였다. 본 연구에서도 허혈성 뇌졸중 유발 후 환측과 건측의 비복근 무게측정 결과 실험대조군인 III군의 환측 비복근이 건측 비복근에 비해 8주와 1주 후에서 각각 15.80±5.23 g 과 7.00±4.33 g 정도 작은 것으로 관찰되었으며, 환측의 상대근 무게측정 결과 8주 후 III군의 환측 상대근이 IV군에 비해 .06±0.01 g 정도 작은 것으로 관찰되었다. 또한 근육의 형태학적 관찰결과 8주 후 IV군에 비해 III군에서 근섬유의 변성과 염증반응, 근위축 등이 관찰되었다. 이와 같은 결과는 허혈성 뇌졸중으로 인한 신경지배의 상실 및 근육 사용의 저하로 근질량이 감소됨을 의미하며 뇌허혈 유발 백서의 환측 비복근에 위축이 발생됨을 나타낸 것이다. 근육질량의 상실은 근육 단백질의 이화작용에 의한 음성질소균형의 발생과도 연관되며(Musacchia 등, 1981), 뇌졸중으로 인한 근위축은 신경지배의 상실 및 근육 사용의 저하로 근위축이 초래된다는 선행연구 결과와도 일치된다(Dattola 등, 1993; Kenji 등, 1997). 뇌허혈이 유발되었을 경우 능동적 운동훈련은 뇌허혈 영역과 기능 소실을 줄이고, 개선된 내피근육에 기인한 혈관확장과 대뇌혈류량을 증가시킨다고 하였다(Endres 등, 2003). 본 연구에서 자세반사 검사, 체지배치 검사, 막대걷기 검사, 철사잡기 검사를 통해 운동행동 평가를 실시한 결과 실험 1일후에는 각 군간 큰 차이를 보이지 않았지만, 1주와 4주에서는 III군에 비해 수중운동을 실시한 I군과 II군에서 더 향상된 반응을 보였다. 실험 8주 후에는 I군과 II군이 거의 정상에 가까운 반응을 보이는 반면, III군은 여전히 비정상적인 반응을 보였다. 결과적으로 허혈성 뇌졸중 유발 후 수중운동을 실시함으로써 편마비측 앞다리의 기능이 향상되고, 네발을 이용한 이동 시 동적 자세 균형 잡기와 협응력이 증가하였으며, 마비측 앞발의 파악력 또한 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이

러한 결과를 토대로 뇌손상 이후 운동기능을 강화할 수 있는 기능훈련이나 운동학습이 매우 중요하다고 생각되어진다. 뇌의 형태학적 변화를 관찰한 결과 허혈성 뇌졸중 유발 1주일 후 III군에서 심각한 뇌조직의 신경세포 파괴와 감소, 연화반응을 관찰할 수 있었으나, 수중운동을 실시한 I군과 II군에서는 III군에 비해 신경세포의 파괴와 연화반응이 완화되어 뇌조직의 변성이 호전되었음을 관찰할 수 있었다. 이는 수중운동이 운동기능향상 뿐만 아니라 뇌 손상 부위에도 영향을 준 것으로 생각되어진다. HSP 70은 산화적 스트레스나 대사적 변화에 의해 발현이 유도되어 세포질에서 단백질의 안정적인 3차 구조(folding)를 형성하도록 할뿐만 아니라 미토콘드리아 막을 통한 단백질의 수송이 원활히 진행되도록 하는 중요한 기능을 담당한다(Kiang과 Tsokos, 1998). HSP 70은 자극을 받았을 때 급격하고 민감하게 반응하여 상당한 양의 증가를 보이고 회복시기에는 가장 먼저 감소한다고 알려져 있다(Welch 등, 1993). 허혈성 뇌졸 중 유발 1주 후 뇌조직에서 HSP 70 면역조직화학적 및 western blotting 검사 결과 IV군에 비해 다른 실험군들에서 HSP 70 발현이 증가하였음을 관찰하였다. 특히 III군에서 HSP 70 발현이 현저히 증가함을 관찰하였으며, I군과 II군에서는 III군에 비해 HSP 70 발현이 감소하였음을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 대뇌 국소허혈에 의해 뇌 조직에서의 HSP 70의 발현이 유도된다는 선행연구 결과와 부합하였다(Fredduzzi 등, 2001). 본 연구에서는 실험적으로 중대 뇌동맥을 폐쇄시켜 유발된 허혈성 뇌졸중 모델 백서를 대상으로 수중운동이 근위축 및 운동기능 향상정도, HSP 70 단백질발현에 미치는 영향을 분석·관찰하여 근위축 경감과 운동기능 향상을 위한 물리치료방법으로써 수중운동의 임상적 효율성을 평가하는데 중요한 자료로 제공하고자 하였다.

V. 결론

1. 비복근의 무게 측정결과 허혈성 뇌졸중 유발 1주와 8주 후 실험군들의 환측에서 근위축을 확인할 수 있었으며, 유발 8주 후 III군에 비해 II군에서 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p < .05$).
2. 신경학적 운동행동 검사결과 허혈성 뇌졸중 유발 1일 후에는 각 실험군 간의 큰 차이를 보이지 않았

나, 허혈성 뇌졸중 유발 1, 4주 후 II군에서 가장 좋은 점수를 나타내었으며, 허혈성 뇌졸중 유발 8주 후에는 III군에 비해 I군과 II군에서 정상에 가까운 반응을 나타냈다.

3. 근육의 형태학적 변화에서 유발 허혈성 뇌졸중 유발 8주 후 IV군을 제외한 모든 실험군에서 근섬유 변성, 염증반응, 근위축등의 소견이 관찰되었으며, 특히 III군에서 가장 심한 소견이 나타났다.

4. 뇌의 형태학적 관찰 결과 허혈성 뇌졸중 유발 8주 후 IV군을 제외한 모든 실험군에서 뇌조직의 신경세포 파괴와 감소, 변형, 연화반응 등의 소견이 관찰되었으며, 특히 III군에서 가장 심한 소견이 나타났다.

5. 뇌의 HSP 70 면역조직화학적 관찰결과 허혈성 뇌졸중 유발 1주 후 IV군에 비해 I, II, III군에서 HSP 70 발현이 관찰 되었으며, 특히 III군에서 현저한 HSP 70 발현을 관찰할 수 있었다. II군에서는 I, III군에 비해 HSP 70 발현이 감소함을 관찰 할 수 있었다.

인용문헌

- 박상갑, 윤영학, 김복주. Rat의 유영훈련이 심근의 α - β -MHC·mRNA 농도에 미치는 영향. 대한스포츠 의학회지. 2000;18(1):101-108.
- 안경주, 이윤경, 임지희 등. 지구력 운동이 급성기 뇌졸중 쥐의 뒷다리근 질량에 미치는 영향. 대한기초간호자연과학회지. 2000;2(2):67-80.
- 이성재. 노인 뇌혈관 질환의 재활과 운동요법. 대한스포츠 의학회. 대한노인병학회 공동 연수강좌 자료집. 2000:119-132.
- 최송화, 이서은, 황종문 등. 흰쥐의 좌골신경 손상 후 운동과 전기자극이 비복근의 회복에 미치는 영향. 한국체육학회지. 2000;39(4):638-644.
- Abe K, Lee TH, Aoki M, et al. Preferential expression of HSP70 heat shock mRNA in gerbil heart after transient brain ischemia. J Mol Cell Cardiol. 1993;25(10):1131-1135.
- Axelsson K, Notberg A, Asplund K. Eating after a stroke. Towards an integrated view. Int J Nurs Stud. 1984;21(2):93-99.
- Balduini W, De Angelis V, Mazzoni E, et al. Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats.

- Brain Res. 2000;859(2):318-325.
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*. 1986;17(3):472-476.
- Dattola R, Girlanda P, Vita G, et al. Muscle re-arrangement in patients with hemiparesis after stroke: An electrophysiological and morphological study. *Eur Neurol*. 1993;33(2):109-114.
- De Ryck M, Van Reempts J, Borgers M, et al. Photochemical stroke model: Flunarizine prevents sensorymotor deficits after neocortical infarcts in rats. *Stroke*. 1989;20(10):1383-1390.
- Duncan PW. Stroke disability. *Phys Ther*. 1994;74(5):399-407.
- Endres M, Gertz K, Lindauer U, et al. Mechanisms of stroke protection by physical activity. *Ann Neurol*. 2003;54(5):582-590.
- Fredduzzi S, Mariucci G, Tantucci M, et al. Generalized induction of 72-kDa heat-shock protein after transient focal ischemia in rat brain. *Exp Brain Res*. 2001;136(1):19-24.
- Georgopoulos C, Welch WJ. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu Rev Dev Cell Biol*. 1993;9:601-634.
- Goldstein LB, Davis JN. Post-lesion practice and amphetamine-facilitated recovery of beam-walking in the rats. *Restor Neurol Neurosci*. 1990;1:311-314.
- Gonzalez EA, Blanco J, Blanco M, Garabal JI, Alonso MP. Enterotoxic, cytotoxic, necrotic and lethal activities in cell-free extracts of *Salmonella* strains isolated from humans. *Zentralbl Bakteriol*. 1989;271(3):281-292.
- Kawanaka K, Tabata I, Higuchi M. More tetanic contractions are required for activating glucose transport maximally in trained muscle. *J Appl Physiol*. 1997;83(2):429-433.
- Hachisuka K, Umezu Y, Ogata H. Disuse muscle atrophy of lower limbs in hemiplegic patients. *Arch Phys Med Rehabil*. 1997;78(1):13-18.
- Kiang JG, Tsokos GC. Heat shock protein 70kDa: Molecular biology, biochemistry and physiology. *Pharmacol Ther*. 1998;80(2):183-201.
- 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.
- Kobayashi J, Mackinnon SE, Watanabe O, et al. The effect of duration of muscle denervation on functional recovery in the rat model. *Muscle Nerve*. 1997;20(7):858-66.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20(1):84-91.
- Marcuccilli CJ, Miller RJ. CNS stress response: too hot to handle? *Trends Neurosci*. 1994;17(4):135-138.
- McCance KL, Heuther SE. *Pathophysiology*. Mosby, St Luise, 1994.
- Musacchia XJ, Steffen JM, Deavers DR. Rat hindlimb muscle responses to suspension hypokinesia/hypodynamia. *Aviat Space Environ Med*. 1983;54(11):1015-1020.
- 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.
- Scelsi R, Lotta G, Lommi G, et al. Hemiplegic atrophy. Morphological findings in the anterior tibial muscle of patients with cerebral vascular accidents. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1984;62(4):324-331.
- 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.
- Shah MV. Rehabilitation of the older adult with stroke. *Clin Geriatr Med*. 2006;22(2):469-89.
- Sharp FR, Sager SM. Alterations in gene expression as an index of neuronal injury: Heat shock and the immediate early gene response. *Neurotoxicology*. 1994;15(1):51-59.
- Trieb K, Dirnhofer S, Krumböck N, et al. Heat shock protein expression in the transplanted hu-

man kidney. *Transpl Int.* 2001;14(5):281-286.

Welch WJ. How cells respond to stress. *Sci Am.* 1993;268(5):56-64.

Yenari MA, Fink SL, Sun GH, et al. Gene therapy with HSP 72 is neuroprotective in rat models of stroke and epilepsy. *Ann Neurol.* 1998;44(4):584-591.

논문접수일 2006년 7월 4일

논문게재승인일 2006년 8월 12일