

중등도 외상성 뇌손상 흰쥐에서 天麻藥鍼이 운동조정 및 인지 기능회복에 미치는 효과

김경윤 · 정현우¹ · 김계엽*

동신대학교 물리치료학과, 1: 동신대학교 한의학과

Effects of Gastrodiae Elata Pharmacopuncture at GB20 on Motor Control and Cognitive Function in Mild TBI Rats

Kyung Yoon Kim, Hyun Woo Jeong¹, Gye Yeop Kim*

Department of Physical Therapy, 1: Department of Oriental Medicine, Dongshin University

This study was designed to investigate the effects of Gastrodiae Elata Pharmacopuncture at GB20 on motor control and cognitive dysfunction recovery after mild traumatic brain injury in rats. Rats were divided into three groups; (1) no treatment after traumatic brain injury(experiment I), (2) Treatment with NPA after traumatic brain injury(experiment II), (3) Treatment with GEP after traumatic brain injury(experiment III). In our study, we carried out behavioral test(Rotarod, Morris water maze) and immunohistochemistry study of the change BDNF in the hippocampus(pre, 7th, 14th day). In Rotarod test(motor control function) was significantly increased in the experimental group III as compared with experimental group I, II on 7th(p<0.01) and 14th day(p<0.001). In Morris water maze test(cognitive function) was significantly decreased in the experimental group III as compared with experimental group I, II on 14th day(p<0.001). In immunohistochemistic response of BDNF in the hippocampus, the experimental group III was more immune response than the other groups on 14th day. These results imply that Gastrodiae Elata Pharmacopuncture at GB20 can play a role in facilitating recovery of motor control and cognitive function after mild traumatic brain injury in rats.

Key words : gastrodiae elata pharmacopuncture(GEP), motor control, cognitive function, rotarod test, morris water maze, brain-derived neurotrophic factor(BDNF)

서 론

외상성 뇌손상(traumatic brain injury; TBI)은 퇴행성이나 선천성 원인이 아닌 외부의 역학적 힘에 의해 발생된 뇌손상으로 인해 의식의 변화나 저하가 일시적 혹은 영구적인 신체적, 정신 사회적, 인지적, 행동학적 장애와 동반되어지는 것을 의미한다¹⁾. 외상성 뇌손상에 대한 수많은 연구가 이뤄져 왔으며 그에 대한 이해도 역시 많이 향상되어졌음에도 불구하고 심각한 두부 손상으로 인한 사망률과 유병률은 여전히 높은 수준을 나타내고 있다²⁾.

뇌손상 환자에서 인지적 결함이 가장 흔하게 나타나는 후유 장애로서 해마(hippocampus) 뇌 조직의 손상이 주요한 원인으

로 알려져 있다³⁾. 해마는 학습과 기억의 형성과정에 관여하는 중요한 뇌 영역이며, 신경의 발생기관뿐만 아니라 성장 후에도 신경세포생성이 활발하게 일어난다⁴⁾. 해마와 전두엽의 피라미드 세포층과 과립 세포층에서 BDNF(Brain-derived Neurotrophic Factor) 농도는 신경세포생성의 조절 및 인지기능과의 관련성이 높다^{5,6)}. BDNF는 신경성장인자의 하나로 신경전달물질을 조절하고, 기억과 학습을 통한 신경 연결부 가소성(synaptic plasticity) 변화에 중추적으로 관여한다⁷⁾.

한편, 風池(GB20)는 足少陽膽經의 경혈로 祛風開竅, 解表清熱의 穴性⁸⁾이 있으며, 天麻(Gastrodiae elata; GA)는 平肝潛陽, 熄風止癱, 祛風濕止痺의 효능⁹⁾이 있어 진전, 두통, 신경통, 현훈, 불면증, 심번, 소아경련, 간질, 치매, 지체마목(肢體麻木), 풍습비통(風濕痺痛) 등의 질환에 사용되어 온 난과(蘭科) 식물이다¹⁰⁾. 天麻에 관한 실험적 연구로 박성혜 등(2005)¹¹⁾은 국소 뇌혈류량

* 교신저자 : 김계엽, 전남 나주시 대호동 252, 동신대학교 물리치료학과

· E-mail : redbead7@daum.net, · Tel : 061-330-3395

· 접수 : 2009/09/17 · 수정 : 2009/09/28 · 채택 : 2009/10/08

과 혈압에 관한 효능을 한찬규 등(2003)¹²⁾은 수축기혈압 강하를 김경민 등(2003)¹³⁾은 혈청지질, 체지방축적 감소, 최유선 등(2002)¹⁴⁾은 신경독성 보호효과를 보고하였다.

天麻에 대한 약리학적 연구로는 천마추출물과 p-hydroxybezy alcohol(HBA) 및 vanillin의 antioxidant 작용¹⁵⁾, HBA의 serotonergic receptor antagonist 작용¹⁶⁾, 천마추출물과 gastrodin의 진정작용¹⁷⁾, gastrodin과 HBA의 기억력 증강작용¹⁸⁾, vanillin의 항경련작용¹⁹⁾, gastrodin과 HBA의 GABA agonist작용²⁰⁾, glutamate 저해작용²¹⁾ 등이 보고되어 있다.

외상성 뇌손상으로 인한 병태생리가 차츰 밝혀지면서 韓醫學에서도 이 분야에 대한 관심과 연구가 이루어지고 있다. 현재 뇌 손상의 병리에 대한 상당한 진전으로 인해 다양한 치료방법들이 제시되고 있음에도 불구하고, 안정성과 효율성 측면에서 뇌 손상 환자에게 효과적인 치료방법은 확인되지 못하고 있는 실정이다²²⁾. 최근 韓醫學系에서는 외상성 뇌손상 모델을 대상으로 김정길(2007)²³⁾의 홍삼의 효과, 조주현(2009)²⁴⁾의 냉성어혈약침의 효과, 하영준(2008)²⁵⁾의 자하거의 효과, 지용철(2005)²⁶⁾의 인삼의 효과 등의 논문들이 발표되고 있으나 風池(GB20)와 약침이 외상성 뇌손상 질환에서 학습 및 기억의 인지능력에 대한 연구는 전무한 실정이다.

이상과 같은 보고들을 토대로 본 연구자들은 외상성 뇌손상에 따른 운동조정능력과 기억 및 인지능력 저하에 대하여 天麻藥鍼을 風池(GB20)에 시술 시 그 효과를 입증하고자 Rotarod 검사와 Morris 수중미로(Morris water maze)를 사용하여 인지적 및 신경학적 운동행동평가와 조직화학적기법(histochemistry)을 이용하여 손상된 해마 부위에서 BDNF의 발현 양상을 관찰하여 인지능력과 운동기능회복에 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 실험동물

본 실험에서는 체중 250±50 g의 Sprague-Dawley계 백서(8~10주령, 웅성, 대한실험동물) 총 35마리를 사용하였다. 실험동물은 항온항습 장치가 부착된 사육실(온도 25±1 °C, 습도 55±10%, 12시간 dark/light)에서 고형사료(삼양사, Korea)와 물을 자유롭게 식이하여 생활습성을 유지하도록 하였다. 외상성 뇌손상을 실험적으로 일으킨 후 무작위로 다음과 같이 세 group으로 나누어 실험군 I(Control, n=10), 실험군 II(Needle-Prick Acupuncture, n=10), 실험군 III(Gastrodiae Elata Pharmacopuncture, n=10)으로 나누었다(Table 1).

2) 약침액 제조

天麻(Gastrodiae elata; GA) 300 g을 ultra pure water (3차 증류수기 Ultra Pure 900, U.S.A.)에 세척하여 증류수 1,000 ml와 함께 24시간 동안 증류수를 계속 보충해가며 끓인 다음 여과지로 여과한 후, 원심분리기(Centricon T-42K, Italy)로 5,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액은 rotary

evaporator(Buchi, Netherland)로 수분을 증발시켜 100 ml로 감압 농축하였으며, 농축된 검액을 동결건조기(삼원주식회사, 한국)로 -70 °C에서 동결건조시켜 최종적으로 얻어진 검액의 양은 16.1 g이었다. 이를 소분하여 생리식염수로 희석하였으며, pH Meter(ORIN, U.S.A.)를 사용하여 Na₃PO₄(Sodium phosphate)를 첨가하여 pH 7.25~7.35, 약전소금(NaCl)을 첨가하여 염도 0.98% 등장액이 되도록 염도계(DEMTRA, Japan)로 조절하였다. 이후 filter 장치를 준비하고 여과지 0.45 μm→0.2 μm→0.1 μm cellulose 여과지(Whatman, Germany)로 음압을 이용하여 여과하고 고압 증기멸균기(high pressure sterilizer, 신진, Korea)에 넣어 30분간 121 °C, 1.5기압으로 고압멸균한 후 냉장보관 하였다가 시술에 사용하였다.

Table 1. Classification of Experimental Groups

Groups	Intervention	Day of examination	
		7th day	14th day
I	No treatment after traumatic brain injury	5	5
II	Treatment with NPA after traumatic brain injury	5	5
III	Treatment with GEP after traumatic brain injury	5	5

NPA : Needle-Prick Acupuncture, GEP : Gastrodiae Elata Pharmacopuncture (0.0007 mg/ml/g)

2. 방법

1) 외상성 뇌손상 유발

외상성 뇌손상을 유발하기 위해 weight-drop 형태의 기구를 사용한 Marmarou (1994)²⁷⁾등의 연구방법을 이용하였다. 실험동물의 전신 마취를 유도하기 위하여 마취 챔버(Royal medical, Korea)에 넣고 70% N₂O와 28.5% O₂가스에 1.5% 엔플루란(enflurane)을 혼합시킨 마취가스로 흡입전신마취 후 탄성력이 있는 foam bed 위에 흰쥐의 전신을 올려놓아 고정시켰다. 두부를 삭모하고 피부를 절개하여 두개골을 노출시키고 bregma와 lambda 사이에 직경 10 mm, 두께 3 mm의 stainless steel disc를 고정하였다. Plaxiglas tube를 흰쥐의 두부에 있는 stainless steel disc에 수직으로 고정하고, 450 g의 추를 1 m 높이에서 관을 통해 자유 낙하시켜 유발하였다. 실험이 이루어지는 동안 흰쥐의 직장 내 체온을 측정하고, 발열 패드를 이용하여 36.5 °C~37.5 °C를 유지시켰다.

2) 天麻藥鍼의 적용

風池(GB20)은 인체에 상응하는 부위로 흰쥐의 흥쇄유돌근의 유양돌기 종지부 내측 함요처²⁸⁾를 취하였다. 외상성 뇌손상 유발 24시간 후부터 시작하여, 각 군들을 14일간 1일 1회씩(오전 10시) 총 14회를 흰쥐의 환측인 좌측 風池(GB20)에 insulin syringe(29 G × 12.7 mm, 유일, 한국)를 이용하여 0.2 ml 주입하였다.

3. 측정

1) 실험모델의 적절성 확인

실험모델의 적절성 확인을 위해 신경학적 증상이 나타나는 개체만 선별하기 위해 다음과 같은 두가지 방법으로 확인하였다. 먼저, Garcia 등(1995)²⁹⁾이 제시한 신경학적 검사는 6개의 항목으로 케이지 내에서 백서의 움직임, 공중에서 꼬리를 잡았을 때 다

리의 평형적 움직임, 앞발이 지면에 닿았을 때 앞발의 움직임, 철망을 오르는 모습, 몸통 자극에 대한 반응, 콧수염 자극에 대한 반응으로 구성되어 있고, 앞의 세 항목은 최하 0점에서 최고 3점, 뒤에 세 항목은 최하 1점에서 최고 3점을 줄 수 있어 전체 점수가 3점에서 18점까지로 표시되어 있다.

2) 신경학적 운동행동 검사(Neurological motor behavioral test)

외상성 뇌손상 유발 전, 유발 7일 후, 유발 14일 후에 신경행동학적 평가(rotarod test, Morris water maze test)를 실시하였다.

(1) Rotarod test

Rotarod test(rod: 직경 7.5 cm, 길이 10 cm, 높이 35 cm)는 흰 쥐의 운동 결손과 균형유지를 평가하기 위해 사용되었다. 처음 4 rpm으로 시작하여 10초당 4 rpm씩 가속하여 20 rpm에서 떨어지지 않고 몇 초간 버티는지(최대 60초까지) 측정하였으며, 3회 측정하여 평균값을 비교하였다.

(2) 공간학습 및 기억력 평가(spatial learning and memory ability test)

공간학습 및 기억력 평가를 위해 수중미로검사(Morris water maze test)를 실시하였다. 수조는 직경이 150 cm, 높이가 50 cm인 원형 통으로 온도가 25±1℃로 유지되는 물을 28 cm 높이로 채웠다. 수중미로의 주변은 비디오카메라 실험대, 그리고 실험대 위에 있는 수온 조절용 장치 등 공간 단서들을 일정하게 유지시켰다. 도피대(escape platform)는 직경 15 cm, 높이 30 cm인 원형 투명 아크릴에 받침대를 부착하고, 수면보다 2 cm 낮게 위치시켰다. 수조 내의 물은 흰색 물감을 풀어서 도피대를 보이지 않게 하여 시각단서를 사용할 수 없게 하였다. 수중미로는 4개의 동일한 사분원으로 나누어져서 북동(NE), 북서(NW), 남동(SE), 남서(SW)로 구분되고, 이중 남서 사분원의 중심부에 도피대를 놓고, 나머지 중 하나를 출발위치로 하였다.

실험에 사용된 흰쥐는 외상성 뇌손상 유발 전, 하루에 180초간 4시행씩 6일간 훈련을 시켰다. 평가는 수조 안에 흰쥐가 출발에서부터 도피대로 올라가는데 걸린 시간을 측정하고, 그 행적을 SMART JUNIOR 프로그램(PanLab, Spain)을 이용하여 분석하였다.

3) 조직학적 검사(Histological assessment)

(1) Hematoxylin & Eosin과 Cresyl violet 염색

天麻藥鍼의 효과를 관찰하기 위해 외상성 뇌손상 유발 7일과 14일 후(각 시간대에 5마리씩)에 전신 마취제인 럽폰(Rompun, 바이엘코리아)으로 복강주사(0.6 mg/kg)하여 마취한 후, 심장관류를 통해 0.9% NaCl 용액으로 관류 수세하였다. 혈액이 제거된 후에는 4% 중성 파라포름알데하이드(prarormaldehyde)로 관류하여 조직 전고정을 실시하였고, 전고정된 실험동물로부터 뇌를 적출하여 24시간 동안 4% 파라포름알데하이드로 후고정을 실시하였다. 후고정이 끝난 조직은 에탄올을 이용한 탈수(dehydration)과정과 자일렌(xylene)을 이용한 청명(cleaning)과정을 거쳐 파라핀 포매(paraffin embedding)를 실시하였다. 제작된 파라핀 블록(paraffin block)은 미세절단기(Sakura 2040, Japan)를 이용하여 5 μm두께로 박절한 후 슬라이드에 mount하여 실온에서 건조시킨 후, Hematoxylin & Eosin (H & E)와 Cresyl violet 염색을 실시하였다.

(2) BDNF 면역조직화학 염색(Immunohistochemistry stain)

외상성 뇌손상 후 天麻藥鍼의 효과를 알아보기 위해 외상성 뇌손상 유발 7일과 14일 후에 해마(hippocampus)에서 BDNF의 면역조직화학 염색을 실시하였다. 먼저, 뇌 조직절편을 0.01 M PBS로 여러 번 세척한 후 남아 있는 고정액 성분을 제거하기 위하여 1% normal blocking serum sodium borohydride로 1시간 처리하였다. 면역조직화학염색을 위한 전처리과정으로 0.3%의 과산화수소(hydrogen peroxide) 용액에 20분간 처리하였다. 다시 0.01 M PBS로 여러 번 세척한 후 Novostain Super ABC Kit (Novocastra Lab., Benton Lane, UK)를 사용하여 20분간 반응시키고 1:500으로 희석한 anti-BDNF (AB1513, Chemicon, USA)로 4℃에서 24시간 처리한 후 0.01 M PBS로 수세하고, 희석된 바이오틴 이차항체액(diluted biotinylated secondary antibody solution)으로 30분간 배양하였다. 다시 PBS로 세척하고 Novostain Super ABC Reagent로 30분간 배양하고 PBS로 세척하였다. 발색을 위해 DAB (Serotec Ltd, BUF021B, UK)에 10분간 적용 후 Mayer's Hematoxyline (Sigma, MHS-32, USA)으로 대조염색(counterstaining)을 실시하였으며, 흐르는 물에 5분간 수세하고 슬라이드 표본을 건조시킨 후 통상의 탈수과정을 거쳐 봉입을 실시하였다. 봉입한 조직을 광학현미경(Olympus BX50, Olympus Optical Co., Japan)에 장착된 CCD 카메라(Foculus, Germany)와 개인용 컴퓨터를 연결시켜 Image-proplus ver 4.0 for windows(media cybernetics, USA)을 이용하여 관찰하였다.

4. 통계처리

본 연구의 통계학적 분석은 SPSS 12.0 ver. for windows®을 사용하였다. 각 군의 실험결과는 평균과 표준편차로 나타내었고, 24시간 후 외상성 뇌손상 유발 확인 검정과 시간에 따른 각 군간의 치료효과를 비교하기 위해 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였고, 사후검정은 Tukey's multiple range test를 실시하였다. 분석 시 유의수준 α=0.05로 설정하여 검정하였다.

실 험

1. 외상성 뇌손상 유발 확인

1) 신경학적 검사(Neurological examination)

외상성 뇌손상 유발 24시간 후 Garcia 등(1995)²⁹⁾이 제시한 신경학적 검사를 시행하였다. 정상군은 13.44±0.41점, 실험군 I은 11.07±0.64점, 실험군 II는 10.96±0.95점, 실험군 III은 11.14±0.68점으로 각 군에서의 24시간 후에 나타나는 신경학적 점수를 비교하기 위하여 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 실시한 결과 통계학적으로 유의한 차이를 보였다(p<0.001). 사후검정을 통한 각 군 비교에서는 정상군과 실험군 I, II, III군(p<0.001) 사이에서 각각 유의한 차이를 나타낸 반면, 실험군 I, II, III군 사이에서는 유의한 차이를 나타내지 않았다(Table 2).

2) 뇌 조직의 육안적 손상 확인

외상성 뇌손상 유발 후 H & E와 Cresyl violet 염색을 실시한 결과, 좌측 두정엽 및 전두엽에 출혈성 병변과 손상부위 주변

으로 미소공포형성, 핵과 세포질의 위축, 신경세포 주위의 신경교세포의 팽윤, 신경망의 공포형성 등의 신경병리학적 소견을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

Table 2. Comparison of neurological examination after 24 hours traumatic brain injury

Score###	Groups			
	Normal	I	II	III
	13.44±0.41	11.07±0.64***	10.96±0.95***	11.14±0.68***

All values are showed mean±SD Tested by One-way ANOVA(###: p<0.001) and Tukey's multiple range test. ***: p<0.001(Normal vs. I, II, III)

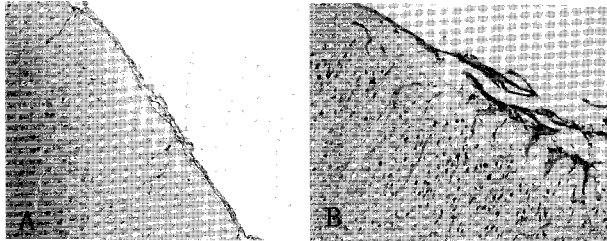


Fig. 1. Photomicrographs depicting coronal series of brain slices stained by H & E(A), Cresyl violet(B) after 72 hours ($\times 200$).

2. 신경학적 운동행동 검사

1) Rotarod test

외상성 뇌손상 후 風池(GB20)에 天麻藥鍼 적용의 효과를 알아보기 위해 Rotarod test를 실시하였다. 시간에 따른 각 군간의 치료효과에 대한 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실시한 결과 통계학적으로 유의한 차이를 보였다(7일; p<0.01, 14일; p<0.001). 사후검정을 통한 각 군 비교에서는 실험군 I과 실험군 II(14일; p<0.05), 실험군 I과 실험군 III(7일; p<0.01, 14일; p<0.001) 사이에서 유의한 차이를 나타냈다(Table 3).

Table 3. Change of score on Rotarod test following time lapsed between each groups (sec)

Groups	Day of examination		
	pre(base line)	7th day ^{###}	14th day ^{###2)}
I	56.57±0.68	22.18±0.93	25.03±1.55
II	56.37±1.36	24.75±1.53	28.29±1.34*
III	57.06±0.82	27.72±2.77**	35.26±1.56***

All values are showed mean±SD Tested by One-way ANOVA(##: p<0.01, ###: p<0.001) and Tukey's multiple range test. 1) 7th day **: p<0.01(I vs. III) 2) 14th day *: p<0.05(I vs. II), ***: p<0.001(I vs. III)

2) 수중미로검사(Morris water maze test)

외상성 뇌손상 후 風池(GB20)에 天麻藥鍼 적용의 효과를 알아보기 위해 공간학습 및 기억력 평가를 위하여 수중미로검사를 실시하였다. 시간에 따른 각 군간의 치료효과에 대한 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실시한 결과 통계학적으로 유의한 차이를 보였다(14일; p<0.001). 사후검정을 통한 각 군 비교에서는 실험군 I과 실험군 II(14일; p<0.05), 실험군 I과 실험군 III(14일; p<0.001) 사이에서 유의한 차이를 나타냈다(Table 4)(Fig. 2, 3).

3. 조직학적 평가

1) BDNF 면역조직화학 염색

외상성 뇌손상 후 風池(GB20)에 天麻藥鍼의 적용이 인지 기능으로 공간학습 및 기억력에 미치는 효과를 알아보기 위해 외상성 뇌손상 후 7일과 14일 후에 해마(hippocampus)에서 BDNF의 면역조직화학을 적용하여 조직학적 소견을 비교관찰하였다. 실험군 I과 II는 외상성 뇌손상 유발 7일에 감소된 면역양성반응을 보이다가 유발 14일에 다소 증가된 면역양성반응을 보였다. 실험군 III은 실험군 I과 II에 비해 유발 7일에 증가된 면역양성반응을 보이다가 유발 14일에 상당히 증가된 면역양성반응을 보였다(Fig. 4).

Table 4. Change of score on morris water maze test following time lapsed between each groups (sec)

Groups	Day of examination		
	pre(base line)	7th day	14th day ^{###}
I	120.00±6.08	84.00±7.58	71.20±5.93
II	119.60±7.89	81.40±5.77	63.40±4.04*
III	120.20±6.61	77.40±5.68	50.20±2.59***

All values are showed mean±SD Tested by One-way ANOVA(###: p<0.001) and Tukey's multiple range test. 1) 14th day *: p<0.05(I vs. II), ***: p<0.001(I vs. III)

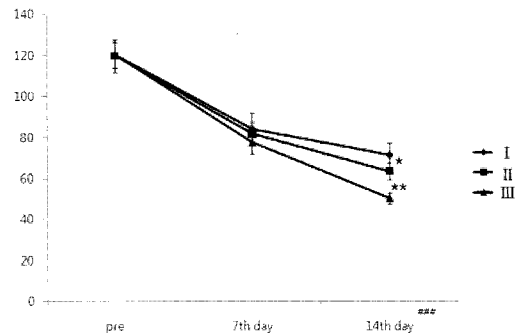


Fig. 2. Change of score on morris water maze test following time lapsed between each groups. Four trials day over 6d were performed for the acquisition test. Experimental III group were treated with Gastrodiae Elata Pharmacopuncture at GB20(7th day; n=5, 14th day; n=5) for 14 days after induction of traumatic brain injury. Experimental II group(7th day; n=5, 14th day; n=5) were Needle-Prick Acupuncture at GB20 for 14 days after induction of traumatic brain injury. Experimental I group(7th day; n=5, 14th day; n=5) were no treatment for 14 days after induction of traumatic brain injury. Tested by one-way ANOVA(###: p<0.001) and Tukey's multiple range test. 14th day *: p<0.05(I vs. II), ***: p<0.001(I vs. III)

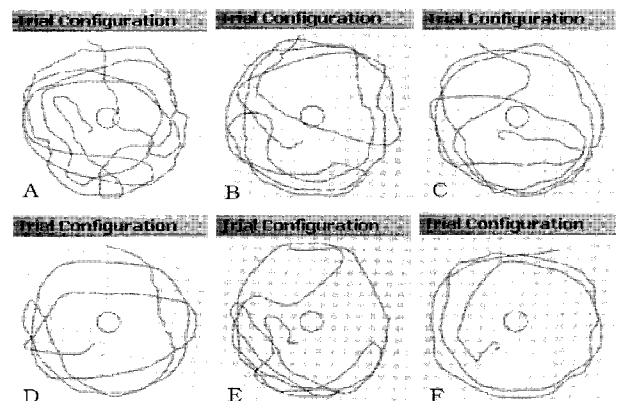


Fig. 3. Typical swim paths to find hidden platform according to the morris water maze test. A: Experimental I group after 7th day, B: Experimental I group after 14th day, C: Experimental II group after 7th day, D: Experimental II group 14th day, E: Experimental III group after 7th day, F: Experimental III after 14th day.

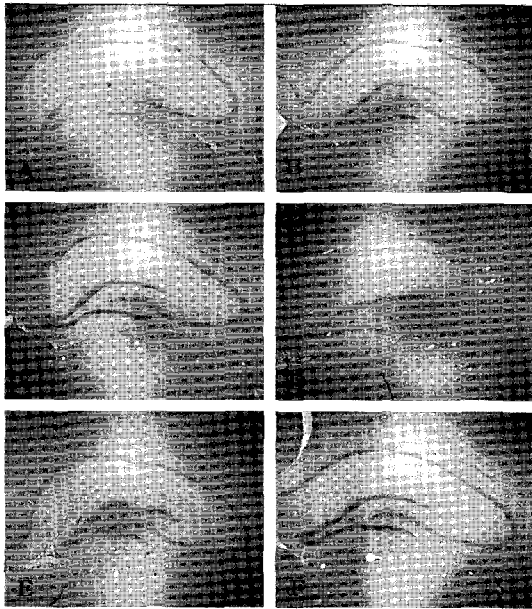


Fig. 4. Photomicrographs of BDNF antibody Immunoreactivity in rat hippocampus. A: Experimental I group after 7th day, B: Experimental II group after 7th day, C: Experimental III group after 7th day, D: Experimental I group after 14th day, E: Experimental II group 14th day, F: Experimental III after 14th day, × 40.

고찰

본 연구에서는 風池(GB20)와 天麻藥鍼의 효과를 입증하고자 Marmarou 등(1994)²⁷⁾의 방법을 이용하여 외상성 뇌손상에 따른 기억과 인지능력 저하에 대한 신경행동학적 평가로 Rotarod 검사와 Morris 수중미로를 실시하였고, 조직학적 평가로 해마부위에서의 BDNF의 발현 양상을 관찰하였다.

최근 20년간 외상성 뇌손상에 대한 실험들이 활발히 이루어지고 있으며, 그 결과 Marmarou 등(1994)²⁷⁾의 방법은 손상 후 혈압상승이 적고 일시적이어서 이차적인 혈관-뇌 장벽의 파괴 및 자동조절능의 저하 등 이차적 손상이 없으며 인체에서의 자연사와 매우 유사하다고 보고하였으며, Adams 등(1989)³⁰⁾은 인체에서의 외상성 뇌손상에서 보이는 소견과 매우 유사하며, 조직병리학적 소견도 상당한 재연성이 있음을 보고하였다.

이러한 실험방법을 토대로 임상적 기초자료로서 유용하려면 치료성적에 대한 병리조직학적 결과뿐 아니라 신경학적 변화에 대한 평가가 매우 중요하다 할 것이다. 감각운동(sensorimotor)은 근육과 감각기관의 연합으로 조절되는데 실험동물의 감각운동 능력을 평가하기 위해서 전정기관과 운동조정 신경의 능력에 의해 조절되는 rotarod test를 실시하였다. Rotarod는 동물을 회전하는 원통 위에 올려놓고 떨어지는 시간을 측정하는 방법으로 1957년 Dunham과 Miya³¹⁾가 개발한 방법으로 주로 신약개발에서 약제가 신경에 미치는 영향에 대한 기초검사로 사용되어 왔다. Hamm 등³²⁾은 drum 모양에 약간의 변화를 주고 전정-운동 능력평가방법으로 이용해 본 결과 기존에 주로 이용되던 balance beam test나 beam walking test에 비해 민감도가 높음을 보고하였는데, 이는 근래 들어 흔히 사용하는 평가방법들 중 하나이다³³⁾.

본 연구의 rotarod test에서 뇌손상 유발 전에는 각각 56.57±0.68초, 56.37±1.36초, 57.06±0.82초로 운동조정 신경능력이 서로 비슷하였으나 실험군 I과 실험군 II는 각각 7일째에 22.18±0.93초, 24.75±1.53초, 14일째에 25.03±1.55초, 28.29±1.34초로 운동조정 신경능력이 악화되었으나 실험군 III은 7일째에 27.72±2.77초, 14일째에 35.26±1.56초로 운동조정 신경능력이 다소 호전되었다. 측정 시기에 따른 각 군의 사후검정 결과, 7일째에는 風池(GB20)에 天麻藥鍼을 시술한 실험군 III은 아무런 처치를 하지 않은 실험군 I과 風池(GB20)에 일반 鍼을 시술한 실험군 II에 비해 통계학적으로 유의한 차이를 나타내었고(p<0.01), 14일째에서는 실험군 II(p<0.05)와 실험군 III(p<0.001)이 각각 유의한 차이를 나타내었다. 이는 風池(GB20)에 天麻藥鍼의 시술이 운동조정 신경능력에 대한 증진 효과를 나타낸 것으로 생각된다.

한편, 모리스수중미로검사(Morris water maze test)는 동물의 공간학습과 기억을 평가하기 위해 많이 사용되고 있으며, 공간정보 외의 단서들을 통제하기 쉽다는 장점 때문에 행동신경과학(behavioral neuroscience) 분야에서 자주 사용된다. 이는 동물의 주변에 있는 단서들을 사용하여 기억력 즉 공간기억(spatial memory)을 측정하는 실험이다^{34,35)}. 외부 정보를 학습하여 기억하고, 그 사실들의 시,공간적 위치를 근거로 행동하는 능력인데, 본 연구에서는 백서들을 물로 채운 수조 내에 숨겨진 도피대(escape platform)를 찾는 것을 학습한 다음 자신의 위치를 학습하게 하여, 숨겨진 도피대를 찾게 하였다. Clark 등(1995)³⁶⁾은 해마의 신경이 손상된 백서는 수중미로 실험에서 학습수행과 기억력이 떨어진다고 보고하였으며, Shear 등(2004)³⁷⁾의 연구에서는 외상성 뇌손상 모델은 1년 후까지 학습-기억 장애를 지속적으로 나타내는 것으로 보고하였다.

본 연구의 모리스수중미로검사에서 실험군 I은 뇌손상 유발 전 120.00±6.08초에서 7일째 84.00±7.58초, 14일째 71.20±5.93초로 도피대를 찾는 시간이 느린 반면, 실험군 II와 실험군 III은 각각 유발 전 119.60±7.89초, 120.20±6.61초에서 7일째 81.40±5.77초, 77.40±5.68초, 14일째 63.40±4.04초, 50.20±2.59초로 도피대를 찾는 시간이 비교적 빠르게 단축되었다. 측정 시기에 따른 각 군의 사후검정 결과, 14일째에서 아무런 처치를 하지 않은 실험군 I에 비해 風池(GB20)에 일반 鍼을 시술한 실험군 II(p<0.05)와 天麻藥鍼을 시술한 실험군 III(p<0.001)에서 통계학적으로 각각 유의한 차이를 나타내었다. 이는 風池(GB20)에 天麻藥鍼의 시술이 공간 인지 기억 학습 수행 능력에 대한 증진 효과를 나타낸 것으로 생각된다.

뇌손상 후 신경계의 회복기전에는 신경연접의 강화를 비롯한 신경연접가소성(synaptic plasticity)이 포함되는데, 학습에 의한 기억형성시 일어나는 일련의 현상으로 이러한 가소성이 일어나는 기전으로는 신경영양인자의 활성화, 신경전달물질의 방출, 연접 단백질 합성, 성장세포 변화 등이 연접재형성을 촉진시키고 수용기발현과 활성을 변화시킨다^{38,39)}. 인지기능과 학습능력에 가장 핵심적인 연관성을 지닌 신경영양인자로는 BDNF를 들 수 있는데, 신경발달 시 성장과 분화를 유도하고 신경손상 시 재생과 인지, 운동과 관련된 영향을 측정하는 중요한 지표로 이용

되어 진다⁴⁰⁾.

해마부위에서의 신경영양인자 BDNF의 면역조직화학 염색을 통한 면역반응검사에서는 실험군 I 과 II는 뇌손상 유발 7일째에 크게 감소되었다가 14일째에 실험군 II에서 다소 증가된 면역양성반응을 보인 반면, 실험군 III은 실험군 I 과 II에 비해 7일째에 증가된 면역양성반응을 보이다가 유발 14일째에 상당히 증가된 면역양성반응을 보였다. 이는 風池(GB20)에 天麻藥鍼의 시술이 외상성 뇌손상 유발로 인한 해마의 신경영양인자인 BDNF의 활성화에 상당한 영향을 준 것으로 생각된다.

이상의 실험결과를 종합해 보면, 외상성 뇌손상 백서에서 風池(GB20)에 天麻藥鍼의 시술은 운동조정 신경능력 및 공간 학습, 기억력 손상을 회복하는데 기여하였으며, 학습 및 기억의 인지능력과 관련된 해마의 신경영양인자 활성화에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 보아 임상적 활용 가치가 높은 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 외상성 뇌손상에 따른 운동조정 신경능력 및 기억과 인지기능 저하에 대한 風池(GB20)에 天麻藥鍼의 효과를 알아보기로 Rotarod test와 모리스수중미로(Morris water maze)를 사용하여 운동행동 평가와 조직화학적기법(histochemistry)을 이용하여 손상된 해마 부위에서 BDNF의 발현 양상을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

운동행동 평가로 Rotarod test와 모리스수중미로검사에서 실험군 I, II에 비해 風池(GB20)에 天麻藥鍼을 시술한 실험군 III은 7일째와 14일째에 각각 유의하게 호전된 차이를 확인할 수 있었다. 조직화학적기법을 통한 해마부위에서 BDNF의 발현양상은 실험군 I, II에 비해 실험군 III에서 7일째에서부터 14일째까지 현저하게 증가되는 면역양성반응을 확인할 수 있었다.

이상의 결과들에서 風池(GB20)에 天麻藥鍼을 시술은 외상성 뇌손상 이후 운동조정 신경능력과 인지기능에 중요한 역할을 하는 해마 부위에서의 BDNF의 발현 활성화에 상당한 영향을 미치는 것으로 생각되며, 향후 이에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Mitchell, N.A., Watkins, M.J. Rehabilitation after traumatic brain injury: A survey of client's needs and service provision in one English region. *Br J. Neurosci Nursing* 2(6):295-304, 2006.
- Thomas, K.E., Stevens, J.A., Sarmiento, K., Wald, M.M. Fall-related traumatic brain injury deaths and hospitalizations among older adults-United States, *J. Safety Res.* 39(3):269-272, 2008.
- Cohen, A.S., Pfister, B.J., Schwarzbach, E., Grady, M.S., Goforth, P.B., Satin, L.S. Injury-induced alterations in CNS electrophysiology. *Prog Brain Res.* 161: 143-169, 2007.
- Lie, D.C., Song, H., Colamarino, S.A., Ming, G.L., Gage, F.H. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 44: 399-421, 2004.
- Donovan, M.H., Yamaguchi, M., Eisch, A.J. Dynamic expression of TrkB receptor protein on proliferating and maturing cells in the adult mouse dentate gyrus. *Hippocampus* 18: 435-439, 2008.
- Vaynman, S., Ying, Z., Gomez-Pinilla, F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Eur J. Neurosci.* 20(10):2580-2590, 2004.
- Karege, F., Bondilfi, G., Gervasoni, N., Schwald, M., Aubry, J.M., Bertschy, G. Low brain-derived neurotrophic factor(BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet activity. *Biol Psychiatry* 57: 1068-1072, 2005.
- 全國韓醫科大學鍼灸·經穴學教室編著. 鍼灸學(上). 서울, 集文堂, pp 632-633, 2005.
- 辛民教編著. 臨床本草學. 서울, 永林社, pp 628-629, 1997.
- Kim, H.J., Moon, K.D., Oh, S.Y., Kim, S.P., Lee, S.R. Ether fraction of methanol extracts of *Gastrodia elata*, a traditional medicinal herb, protects against kainic acid-induced neuronal damage in the mouse hippocampus. *Neurosci Lett.* 314(1-2):65-68, 2001.
- 박성혜, 신미경, 한종현. 천마를 이용한 뇌혈관성 질환의 예방을 위한 양생약선의 개발을 위한 연구-(1) 천마열수 추출물이 국소 뇌혈류량과 혈압에 미치는 영향. *동아시아식생활학회지* 15(3):283-291, 2005.
- 한찬규, 이옥환, 김경임, 박정민, 김영찬, 이부용. 천마분말, 에탄올 및 열수추출물이 본태성고혈압(SHR)의 혈청지질과 혈압에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지* 32(7):1095-1101, 2003.
- 김경임, 한찬규, 성기승, 이옥환, 박정민, 이부용. 천마분말, 에탄올 및 열수추출물이 고지방식이를 급여한 흰쥐의 혈청 지질과 체지방에 미치는 영향. *한국식품과학회지* 35(4):720-725, 2003.
- 최유선, 이은미, 손영우, 이강창, 신용일, 송명수, 최영자, 최철규, 강형원, 임창용, 류지용, 박세홍, 박승택. 생쥐의 배양 대뇌신경세포에 대한 Hydrogen Peroxide의 세포독성 및 천마의 영향. *동의병리학회지* 16(5):928-931, 2002.
- Liu, J., Mori, A. Antioxidant and pro-oxidant activities of p-hydroxybenzyl alcohol and vanillin: effects on free radicals, brain peroxidation and degradation of benzoate, deoxyribose, amino acids and DNA. *Neuropharmacology* 32: 659-669, 1993.
- Hsieh, M.T., Wu, C.R., Hsieh, C.C. Ameliorating effect of

- p-hydroxybenzyl alcohol on cycloheximide-induced impairment of passive avoidance response in rats: interactions with compounds acting at 5-HT1A and 5-HT2 receptors. *Pharmacol Biochem Behav.* 60: 337-343, 1998.
17. Huang, J.H. Comparison studies on pharmacological properties of injectio *Gastrodia elata*, gastrodin-free fraction and gastrodin. *Chung Kuo I Hsueh Ko Hsueh Yuan Hsueh Pao.* 11: 147-150, 1989.
 18. Hsieh, M.T., Wu, C.R., Chen, C.F. Gastrodin and p-hydroxybenzyl alcohol facilitate memory consolidation and retrieval but not acquisition on the passive avoidance task in rats. *J. Ethnopharmacol.* 56: 45-54, 1997.
 19. Wu, H.Q., Xie, L., Jin, X.N., Ge, Q., Jin, H., Liu, G.Q. The effect of vanillin on the fully amygdala-kindled seizures in the rat. *Yao Hsueh Hsueh Pao* 24: 482-486, 1989.
 20. Guo, Z., Tan, T., Zhong, Y., Wu, C. Study of the mechanism of gastrodin and derivatives of gastrodigenin. *Hua Hsi I Ko Ta Hsueh Hsueh Pao* 22: 79-82, 1991.
 21. Andersson, M., Bergendorff, O., Nielsen, M., Sterner, O., Witt, R., Ai, J., Lu, A., Wang, A.M. Inhibition of kainic acid binding to glutamate receptors by extracts of *Gastrodia*. *Phytochemistry* 38: 835-836, 1995.
 22. Narayan, R.K., Michel, M.E., Ansell, B., Baethmann, A., Biegon, A., Bracken, M.B. Clinical trials in head injury. *J. Neurotrauma* 19: 503-557, 2002.
 23. 김정길. 홍삼투여가 흰쥐 외상성 뇌손상의 Bax 및 Bcl-2 발현에 미치는 영향. 경희대학교 동서의학대학원, 2008.
 24. 조주현. 냉성어혈약침이 외상성 뇌손상 흰쥐의 신경학적 회복과 BAX, BCL-2의 발현에 미치는 영향. 동신대학교 대학원, 2009.
 25. 하영준. 외상성 뇌손상 흰쥐에서 자하거의 신경세포 보호효과. 경원대학교 대학원, 2008.
 26. 지용철. 흰쥐의 실험적 외상성 뇌손상에서 Ginseng Total Saponins의 신경보호작용. 중앙대학교 대학원, 2005.
 27. Marmarou, A., Foda, M.A., van den Brink, W., Campbell, J., Kita, H., Demetriadou, K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I : Pathophysiology and biomechanics. *J. Neurosurg.* 80(2):291-300, 1994.
 28. 고희균. 흰쥐에서의 골도분촌에 의한 상응혈위. *대한침구학회지* 16(3):115-122, 1999.
 29. Garcia, J.H., Wagner, S., Liu, K.F., Hu, X.J. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats; Statistical validation. *Stroke* 26: 627-634, 1995.
 30. Adam, J.H., Doyle, D., Ford, I., Gennarelli, T.A., Graham, D.I., McLellan, D.R. Diffuse axonal injury in head injury: definition, diagnosis, and grading. *Histopathology* 15(1):49-59, 1989.
 31. Dunham, N.W., Miya, T.S. "A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice." *J. Am Pharm Assoc(Baltim)* 46(3):208-209, 1957.
 32. Hamm, R.J., Pike, B.R., O'dell, D.M., Lyeth, B.G., Jenkins, L.W. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 11(2):187-196, 1994.
 33. Hamm, R.J. Neurobehavioral assessment of outcome following traumatic brain injury in rats: an evaluation of selected measures. *J. Neurotrauma* 18(11):1207-1216, 2001.
 34. Jolkkonen, N.P., Gallagher, K., Zilles, K., Sivenius, J. Behavioral deficits and recovery following transient focal cerebral ischemia in rats: glutamatergic and GABAergic receptor densities. *Behav Brain Res.* 138(2):187-200, 2003.
 35. Yamazaki, M., Matsuoka, N., Kuratani, K., Ohkubo, Y., Yamguchi, I. FR121196, a potential antidementia drug, ameliorates the impaired memory of rat in the Morris water maze. *J. Pharmacol Exp Ther.* 272(1):256-263, 1995.
 36. Clark, A.S., Mitre, M.C., Brinck-Johnsen, T. Anabolic androgenic steroid and adrenal steroid effects on hippocampal plasticity. *Brain Res.* 679(1):64-71, 1995.
 37. Shear, D.A., Tate, M.C., Archer, D.R., Hoffman, S.W., Hulce, V.D., Laplaca, M.C., Stein, D.G. Neural progenitor cell transplants promote long-term functional recovery after traumatic brain injury. *Brain Res.* 1026(1):11-22, 2004.
 38. Johansson, B.B. Brain plasticity and stroke rehabilitation; The Willis Lecture. *Stroke* 31(1):223-230, 2000.
 39. Vernadakis, A. Glia-neuron intercommunications and synaptic plasticity. *Prog Neurobiol* 49(3):185-214, 1996.
 40. Cotman, C.W., Berchtold, N.C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 25(6):295-301, 2002.