

## 흥분독성 소뇌손상 백서모델에서 운동기술학습이 균형 및 협응력에 미치는 영향

김기도 · 민경옥<sup>1</sup> · 심재환<sup>2</sup> · 정재영<sup>2</sup> · 김용익 · 김경운 · 김계엽 · 심기철 · 김은정 · 남기원

동신대학교 물리치료학과, <sup>1</sup>용인대학교 물리치료학과, <sup>2</sup>서강정보대학 물리치료과

### Effects of Motor Skill Learning on Balance and Coordination in Excitotoxicity Induced Cerebellar Injury Model of Rat

Gi-do Kim, PT, PhD, Kyung-ok Min, PT, PhD<sup>1</sup>, Jae-hwan Shim, PhD<sup>2</sup>,  
Jae-young Jeong, PhD<sup>2</sup>, Young-eok Kim, MD, PhD, Kyung-yoon Kim, PT, PhD,  
Gye-yeop Kim, Vet, PhD, Ki-cheol Sim, PT, MS,  
Eun-jung Kim, PT, PhD, Ki-won Nam, PT, PhD

*Department of Physical Therapy, Dongshin University*

<sup>1</sup>*Department of Physical Therapy, Yongin University*

<sup>2</sup>*Department of Physical Therapy, Seokang college*

#### <Abstract>

**Purpose** : This study is intended to examine the motor skill learning on balance and coordination in the cerebellar injured rats by 3AP.

**Methods** : This study selected 60 Sprague-Dawley rats of 8 weeks. Experiment groups were divided into four groups and assigned 15 rats to each group. Group I was a normal control group(induced by saline); Group II was a experimental control group(cerebellar injured by 3AP); Group III was a group of motor skill learning after cerebellar injured by 3AP; Group IV was a group of treadmill exercise after cerebellar injured by 3AP. In each group, motor performance test, histologic observations, synaptophysin expression and electron microscopy observation were analyzed.

**Results** : In motor performance test, the outcome of group II was significantly lower than the group III, IV (especially group III)( $p < .001$ ). In histological finding, the experimental groups were destroy of dendrites and nucleus of cerebellar neurons. Group III, IV were decreased in degeneration of cerebellar neurons(especially group III). In immunohistochemistic response of synaptophysin in cerebellar cortex, experimental groups were

decreased than group I. Group III's expression of synaptophysin was more increased than group II, IV. In electron microscopy finding, the experimental groups were degenerated of Purkinje cell.

**Conclusion :** These result suggest that improved motor performance by motor skill learning after harmaline induced is associated with dynamically altered expression of synaptophysin in cerebellar cortex and that is related with synaptic plasticity.

**Key Words :** Cerebellar, 3AP, Motor performance, Motor skill learning, Synaptic plasticity

## I. 서 론

흥분독성(excitotoxicity)이라 함은 글루탐산이나 이와 구조적으로 유사한 아미노산에 중추신경세포가 과다하게 노출되었을 때 그 신경세포가 죽는 것을 말한다(Doble, 1999). 글루탐산은 뇌와 척수의 연결에서 주요 신경전달물질로 작용하여 중추신경계의 항상성과 밀접하게 연관되어 있지만(Javitt, 2007), 급작스러운 중추신경세포 손상을 일으키는 상황, 즉 저산소성 혈관 허탈, 지속적인 간질, 뇌 허혈, 외상성 뇌손상 등에서 과도하게 분비되면 흥분독성 유발을 통해 중추신경계의 발병기전인 신경세포 사멸(apoptosis)에 관여 한다고 보고되고 있다(Hollmann과 Heinemann, 1994). 따라서 흥분독성이 신경세포 사멸을 일으키는 기전에 대해 많은 연구가 진행되고 있으며, 흥분독성을 실험적으로 유발하여 각종 중추신경계 질환의 예방과 치료에 대한 새로운 장을 열고자 하는 많은 노력들이 시도되고 있다. 흥분독성을 야기하는 물질로는 ibotenate, domoate, harmaline, 3AP 등이 있으며, 소뇌손상과 관련된 대표적 흥분독성 물질로는 harmaline과 3AP가 잘 알려져 있다(Beitz와 Saxon, 2004). 3AP(3-Acetylpyridine, C7H7NO)는 퍼킨즈 세포로 향하는 하올리브핵을 선택적으로 파괴시키기 때문에 소뇌장애 특히, 운동학습의 장애와 소뇌실조에 대한 연구에 많이 사용되는 흥분독성 물질이다(Desclin과 Colin, 1980). 3AP를 복강주사 한 백서는 점진적으로 등반섬유의 과흥분성으로 인한 등반섬유의 파괴와 함께 아스파르트산 함량이 감소되고(Seoane 등, 2005), 심부핵으로 뻗은 퍼킨즈 세포의 축삭 말단에서 글루탐산 탈탄산 효소 활성도와 mRNA수가 현저히 증가 한다(Litwak 등, 1990).

소뇌는 운동기능 조절에 관여하는 중요한 기관으로 신체운동 기능을 자동적으로 조정하며, 근육의 긴장도를 조절하고 평형을 유지하는 역할을 할 뿐만 아니라 운동 기술의 학습과정에서 서술성 기억(declarative memory)을 비서술성 기억(procedural memory)으로 바꾸어 자동적으로 운동이 수행될 수 있도록 한다(Watson과 McElligott, 1984). 소뇌손상 시 나타나는 운동장애는 안구 진탕증(Anastasio, 2001), 협응운동 장애(Mauk 등, 2000), 실조성 보행(Newlands와 Perachio, 2003), 진전(Perciavalle 등, 1995), 등이 있으며, 특히 소뇌 손상의 대표적 임상 증상으로는 보행 및 신체평형의 장애가 나타난다(Morton과 Bastian, 2004). 따라서 소뇌손상 환자들의 기능회복을 위한 중재방법은 운동의 양적인 면보다는 협응근과 길항근의 수축을 원만히 하고 조화를 이루도록 하는 질적인 면과, 피부와 관절부위가 외부로부터 수용한 정보와 대뇌로부터 전달받은 신체 평형에 관한 정보 등을 비교, 분석하여 운동수행이 이루어지도록 중점을 두어야 한다.

치료적 운동은 뇌에서 내인성 항산화계(endogenous antioxidant system)의 활동을 증가시키고 흥분독성과 관련된 글루탐산 수용기를 하향조절 한다고 알려져 있으며(Devi와 Kiran, 2004), 운동기능 손상을 나타내는 많은 신경학적 질병에 있어서 신경가소성에 도움을 준다는 결과가 인체와 동물을 대상으로 한 실험을 통해 발표되었다(Vaynman 등, 2006; Laurin 등, 2001). 이러한 연구결과에 근거하여 실제 임상에서는 환자에게 대한 적극적인 운동치료가 이루어지고 있으며, 그 중재방법과 기술들 또한 다양해지고 있다. 특히 소뇌손상 환자들을 대상으로 기능적 훈련인 복합운동훈련(complex motor training)과 운동기술학습(motor skill learning)이 신경연접 가소성

및 운동수행력 회복적인 측면에서 중요시되고 있다. 운동기술학습은 근육 및 관절과 같은 고유수용성 기관으로 부터 체성감각 자극과 고유수용성 자극을 받아들이는 소뇌피질내의 신경연접의 수를 증가시킨다. Anderson 등(1996)은 다양한 넓이의 막대와 사다리, 체인 및 시소 등으로 이루어진 장애물들을 이용하여 30일간 운동기술학습을 적용한 결과 소뇌 피킨즈 세포 신경연접 수가 80% 이상 증가하였고 보고하였다. 한편 운동기술학습 중재 방법이 아닌 트레드밀 운동이나 휠 달리기 운동 같은 일반적인 운동은 단순히 locomotor의 활성화만을 증가시킬 뿐 이를 통해 신경연접간 접촉수를 증가 시키거나, 시냅스 생성의 수적 변화를 나타내지 못한다는 보고가 있다(Kleim 등, 1998).

신경연접 가소성(synaptic plasticity)은 신경연접 형성(synaptogenesis) 및 분포의 변화와 관련이 있으며, 연접 전 신경세포의 축삭 말단 부위에 있는 여러 단백질들은 연접 소포의 결합이나 융합 과정에 참여(Luscher 등, 2000)하여 신경연접 형성과 신경돌기의 확장(neurite elongation)에 관여한다(Steward와 Worley, 2002). 이러한 연접 단백질에는 연접 소포막을 구성하는 VAMP(vesicle associated membrane protein), synaptotagmin 및 synaptophysin이 존재한다고 알려져 있다(Fernandez-Chacon 등, 2001). 특히, synaptophysin은 신경전달물질의 전달이나 신경돌기의 확장에 중요한 역할을 하는 신경연접 단백질로서 신경연접 가소성의 형태 및 기능적인 양상들을 반영하는 표지자로서 주로 이용되고 있다(Benson 등, 2000).

본 연구에서는 홍분독성 물질인 3AP를 복강 주사하여 실험적으로 소뇌손상을 유발한 백서를 대상으로 4주간의 운동기술학습과 트레드밀 운동이 균형 및 협응력에 미치는 영향을 알아봄으로써 물리

치료적 중재방법의 효율성을 평가하는데 중요한 기초 자료로 제공하고자 한다.

## II. 연구 방법

### 1. 실험동물 및 홍분독성 소뇌손상 유발

체중 280±10 g의 Sprague-Dawley계 백서(8주령, 웅성, 다물사이언스)를 각 군당 15마리씩 무작위 할당하여 60마리를 사용하였다. 사육실의 온도는 25±1°C, 습도 55±10%를 유지 하였으며, 명암은 12시간 주기로 하였다. 물은 자유로이 마실 수 있게 하였지만, 사료는 약물투여 5시간 전에 절식하였다. 실험군은 네 개의 군으로 분류하였으며, 각 실험군의 처치는 Table 1과 같다. 홍분독성 소뇌손상 유발은 Gasbarri 등(2003)의 방법에 따라 3-Acetylpyridine (A21207, Sigma, USA)을 70 mg/kg 용량으로 saline에 희석하여 1회 복강 주사하였다. 3AP에 의한 다른 신경구조물들의 손상을 예방하기 위해 3시간 반 후 nicotinamide(N5535, Sigma, USA)를 300 mg/kg 용량으로 saline에 희석하여 복강 주사하였다. 소뇌손상 유발 후 신경학적 행동반응 평가를 통해 몸통, 머리, 팔다리에서 전체적으로 경련성 진전을 보이는 개체만을 선별하여 실험에 사용하였다.

### 2. 운동기술학습(Motor skill learning)

Kleim 등(2007)과 Jones 등(1999)의 연구에서 사용된 곡예운동(acrobatic training)모델을 수정하여, 다양한 환경과 감각 입력이 주어진 상황에서 앞발과 뒷발 그리고 몸 전체의 협응력과 균형을 향상시킬 수 있는 훈련으로 구성하였다. 훈련을 시작하기

Table 1. Classification of experimental groups

Groups	Treatment
I (n1=15)	Normal control
II(n2=15)	3AP induced
III(n3=15)	3AP induced + motor skill learning
IV(n4=15)	3AP induced + treadmill exercise

Table 2. Obstacles used for acrobatic training

AC task	Shape	Size
Task-1	Rod	2.7 cm diameter
Task-2	Rope	2 cm diameter
Task-3	Barrier	13~21 cm high
Task-4	Parallel rods	1.1 cm each diameter
Task-5	Grid platform	2~3 cm rectangle

전 3일 동안 적응기간을 갖게 하여 스트레스를 줄여주면서 자발적으로 참여하도록 노력 하였으며, 쉬운 과제에서부터 어려운 과제 순으로 실시하였다. 훈련은 1일 3회, 주 5회, 4주간 실시하였다(Table 2).

### 3. 트레드밀 운동(Treadmill exercise)

실험동물에게 스트레스를 최소화 하면서 뇌손상 동물 모델에 맞게 프로그램화 된 저항도 트레드밀 훈련(Carro 등, 2001)을 수정하여 소형 rodent animal treadmill을 이용해서 실시하였다. 흥분독성 소뇌손상 24시간 후 운동의 강도는 0%로 고정시킨 상태에서 실시하였으며 손상 2일 후 부터는 점증적인 부하운동을 적용하여 1주에는 3 m/min의 속도로 10분, 5 m/min의 속도로 10분간 훈련하였고, 2주에는 5 m/min의 속도로 10분, 7 m/min의 속도로 10분간 훈련하였다. 3주에는 7 m/min의 속도로 10분, 9 m/min의 속도로 10분간 훈련하였고, 4주에는 9 m/min의 속도로 10분, 11 m/min의 속도로 10분간 훈련하였다. 1일 1회, 주 5회, 4주간 실시하였다.

### 4. 운동 수행력 검사(Motor performance test)

#### 가. Rota-rod 검사(Rota-rod test)

균형능력을 평가하기 위해 Janahadi 등(2009)의 방법을 이용하여 rota-rod 검사(rod: 직경 7.5 cm, 길이 10 cm, 높이 35 cm)를 실시하였다. 5 rpm에서 전 훈련을 실시한 다음, 5 rpm으로 시작하여 10초당 5 rpm씩 가속하여 20 rpm에서 떨어지지 않고 몇 초간 버티는지 측정하였으며, 3회 반복 측정하여 평균값을 비교하였다.

#### 나. Power reaching 검사(Power reaching test)

협용력을 평가하기 위해 Remple 등(2001)의 방법을 수정하여 power reaching 검사를 실시하였다. 투명 아크릴 cage(25 cm × 35 cm × 30 cm)를 제작하여, 정면 벽에는 폭 1 cm, 높이 6 cm의 틈(slot)을 만들었다. 틈 중앙 부위에는 흰쥐의 앞발이 닿을 수 있는 위치에 작은 구멍(hole)을 만들어 파스타(pasta) 가닥(strand)을 수직으로 세워 두었으며, 평

가하기 24시간 전부터 절식시켜 실험동물로부터 검사반응을 유도하였다. 파스타 다발을 잡고 부러뜨려 입으로 가져가면 성공으로 파스타 다발은 가닥 1개 부터 시작하여 점진적으로 1개씩 가닥의 수를 증가 하였다. 10번의 시도 중 파스타 다발을 잡고 부러뜨려 입으로 가져가는 파스타 다발의 사이즈를 측정 하였다.

### 5. 조직학적 관찰(Histological assessment)

70% N<sub>2</sub>O와 28.5% O<sub>2</sub> 가스에 1.5% 엔플루란(Isoflurane, 중의제약)을 혼합시킨 마취가스로 전신 마취한 다음 흉강을 열고 관류수세기를 이용하여 0.9% NaCl로 관류 수세 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 통상적인 탈수, 투명 및 침투과정을 처리한 후 파라핀 블록을 제작하였다. 제작된 파라핀 블록은 회전식 미세 박절기(Sakura 2040, Japan)를 사용하여 5 μm 두께로 박절한 후 슬라이드에 부착시켰다. 소뇌 신경세포의 사멸(apoptosis) 및 변성(degeneration)을 관찰하기 위해 H&E 염색을 실시한 후 탈수와 투명화 과정을 거쳐 봉입을 실시하였다. 조직형태학적 관찰은 광학현미경(Olympus Bx 50, Japan)을 이용하여 현미경에 장착된 CCD 카메라(Foculus F2, Germany)로 촬영한 후 관찰하였다.

### 6. 면역조직화학적 관찰(Immunohistochemical assessment)

탈파라핀 과정을 거친 후 처리 과정으로 3% hydrogen peroxidase를 사용하여 내재성 peroxidase의 활성을 차단하였으며, 0.15% triton X-100을 첨가한 PBS 용액을 사용하여 조직의 투과성을 높여 조직 내부에 1차 항체 용액이 잘 흡수되도록 하였다. BSA가 포함된 1% 차단 용액으로 1시간 정도 처리하여 비특이적 반응을 차단 후, 0.01M PBS로 세척하고, Synaptophysin(1:200) (Sigma S5768, U.S.A)

으로 반응시킨 다음 0.1% Triton X-100으로 90분 동안 반응시켰다. 다시 절편을 0.01M PBS로 수세한 후 PBS로 희석한 ABC-Kit(Vector, U.S.A)로 60분간 반응시켰으며, 0.01M PBS로 수세과정을 거쳐 10분간 DAB (3,3'-Diaminobenzidine)로 발색을 실시하였다. 0.01M PBS와 증류수로 수세한 후 조직을 슬라이드에 올려 Cresyl violet으로 배경염색을 실시한 다음 통상적인 탈수 및 투명화 과정을 거친 후 봉입하여 영구표본을 제작하였다. 면역조직화학 반응의 평가는 반정량적 방법(semiquantitative manner)으로 구분하여 음성반응(-), 약한 염색성을 보인 경우 경도의 양성반응(+), 중등도의 염색성을 보인 경우 중등도의 양성반응(++), 강한 염색성을 보인 경우 강한 양성반응(+++)으로 등급을 정하여 평가하였다.

7. 전자현미경 관찰(Electron microscopy assessment)

세포의 자가분해와 세포성분의 응고 및 경화를 방지하기 위하여 2.5% glutaraldehyde로 관류하여 전고정을 실시한 다음 고정된 뇌조직을 다시 4℃의 동일한 고정액에서 5시간 동안 보관한 후 0.1M PBS로 수세를 통해 여분의 고정액을 씻어냈다. 이차 고정으로는 1% osmium tetroxide로 1시간 동안 고정한 후, 탈수를 거쳐 에폭시수지의 침투를 단계별로 시행하고 80℃ 중합기에서 18시간 동안 block을 제작하였다. Block은 1% Toluidine blue로 단염색을 실시하여 필요한 부위를 광학현미경을 통하여 선정하고 diamond knife를 사용하여 초박절편기(Dupont MT-7000, USA)로 초박절편(ultrathin sections)을 만들어 200 mesh grid로 얹은 후 일반적인 전자

염색인 4% uranyl acetate와 lead citrate로 각각 20분, 5분 동안 염색을 시행하였다. 표본은 투과전자현미경(Hitachi H-600, Japan)으로 80 kV하에서 관찰하였으며 필요한 부위를 촬영하였다.

8. 분석방법

모든 통계학적 분석은 SPSS 12.0 ver. for window을 사용하였다. 운동수행력에 대한 각 군사이의 유의성 검정은 일원분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였고, 사후검정(post hoc)은 LSD 다중범위 검정을 실시하였다. 통계학적 유의성을 검증하기 위해 유의수준은  $\alpha=.05$ 로 설정하였다.

III. 결 과

1. 운동 수행력 평가(Motor performance test) 결과

가. Rota-rod 검사(Rota-rod test) 결과

소뇌손상 1일 후 II, III, IV군의 운동 수행력이 감소하였으며, 2주 후부터는 II군에 비해 III, IV군에서 운동 수행력이 점차 향상 되었다. 일원배치 분산분석을 실시한 결과 군 사이의 유의한 차이가 나타났다( $p<.001$ ), 사후검정 결과 손상 2주 후 II군에 비해 III군에서, 4주 후 II군에 비해 III, IV군에서 각각 유의한 차이가 나타났다( $p<.001$ )(Table 3).

나. Power reaching 검사 결과

소뇌손상 1일 후 II, III, IV군의 운동 수행력이 감소하였으며, 2주 후부터는 II군에 비해 III, IV군에서 운동 수행력이 점차 향상 되었다. 일원배치 분산분석을 실시한 결과 군 사이의 유의한 차이가 나

Table 3. The changes of rota-rod test score in each groups

Group	Day	(sec)			
		Pre	1 day	2 <sup>nd</sup> week	4 <sup>th</sup> week
I		293.00±4.93	293.0±5.28	293.67±5.81	294.33±5.94
II		292.33±6.51	14.40±2.32	20.33±2.53	29.20±5.68
III		292.33±5.94	14.47±2.33	33.33±2.77#	54.60±6.99#
IV		293.00±6.49	14.27±2.31	27.80±3.05	45.07±6.70#

# : Statistically significant as compared with group II( $p<.001$ )

Table 4. The power reaching test score in each groups

Group	Day	Pre	1 day	2 <sup>nd</sup> week	4 <sup>th</sup> week
I		7.00±1.13	7.00±1.13	7.13±0.92	7.33±0.82
II		7.00±1.20	0.47±0.32	0.87±0.64	1.07±0.70
III		6.67±1.35	0.67±0.62	2.73±0.80#	4.07±0.80#
IV		6.07±1.22	0.53±0.52	1.47±0.83#	1.80±0.77#

# : Statistically significant as compared with group II(p<.001)

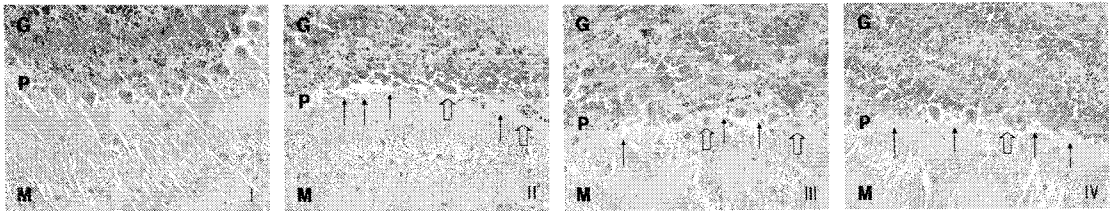


Fig 1. The histological findings of cerebellar cortex in each groups (Hematoxylin & Eosin stain, ×400) I : Normal control, II: 3AP induced, III: 3AP induced + motor skill learning, IV: 3AP induced + treadmill exercise

타났으며(p<.001), 사후검정 결과 손상 2주 후 II군에 비해 III군에서, 4주 후 II군에 비해 III, IV군에서 각각 유의한 차이가 나타났다(p<.001)(Table 4).

3. 조직형태학적 소견(Histological finding)

퍼킨즈 세포층의 형태학적 관찰 결과, I군은 연속적인 1열의 퍼킨즈 세포들이 중앙에 뚜렷한 핵소체(nucleous)를 함유한 큰 핵을 가지고 소뇌전반에 걸쳐 고루 분포하였으며, 축삭(axon)들이 분지층으로 뻗어 나가는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 II, III, IV군에서는 퍼킨즈 세포의 배열과 모양이 불규칙하고 부분적으로 퍼킨즈 세포가 괴사되어 나타나는 공포화 현상(arrow)과 변성(blank arrow) 및 축삭

의 소실이 관찰되었다. 특징적으로 퍼킨즈 세포의 수적감소 보다는 크기가 작아지는 변성이 보다 심하게 관찰되었다. III, IV군은 II군에 비해 비교적 상태가 호전되었음을 관찰할 수 있었으며, 특히 III군에서는 II군에 비해 퍼킨즈 세포와 축삭의 수적 증가가 관찰되었다(Fig. 1).

4. 면역조직화학적 소견(Immunohistochemical finding)

소뇌피질에서 신경연접 가소성을 알아보기 위해 신경연접생성과 연관이 있는 synaptophysin에 대한 면역 반응성을 관찰한 결과, I군(+++)의 면역 반응성은 퍼킨즈 세포층과 과립층에서 점 모양의 형태

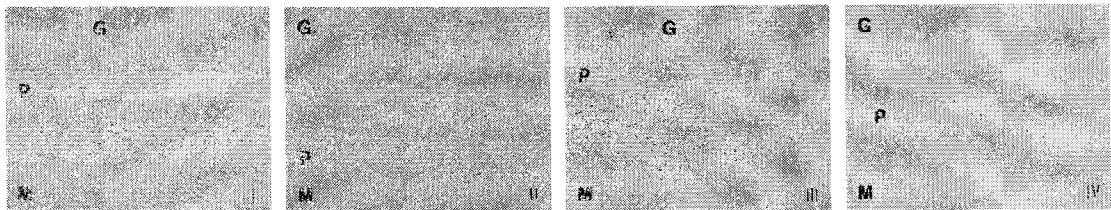


Fig 2. The Immunohistochemical findings of synaptophysin reaction on cerebellar cortex in each groups (Immunohistochemical stain, ×200) I : Normal control, II: 3AP induced, III: 3AP induced + motor skill learning, IV: 3AP induced + treadmill exercise

로 다수 관찰되었으며 분자층에서도 일부 관찰되었다. 그러나 II군(-)과 IV군(+)에서는 과립층 일부에서만 관찰 되었으며, III군(++)에서는 과립층 및 퍼킨즈 세포층에서 면역 반응이 보다 증가되었음을 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

### 5. 전자현미경적 소견(Electron microscopy finding)

퍼킨즈 세포와 주변 미세 소기관의 분자형태학적 관찰을 위해 전자현미경적 관찰을 실시한 결과, I 군의 퍼킨즈 세포는 핵과 염색질이 매우 큰 세포로 균일한 분포를 보였으며, 주변에 6-7개 정도의 버그만 아교세포(Bergmann neuroglia)가 고르게 분포함을 관찰할 수 있었다. 그러나 II, III, IV군에서는 퍼킨즈 세포와 버그만 아교세포와의 연결이 불분명하였으며, 퍼킨즈 세포 주변에서 공포(arrow)와 중창(blank arrow)이 관찰되었다. 이러한 변화는 II군에서 가장 뚜렷하게 관찰되었다. III군에서는 퍼킨즈 세포의 변성정도가 다소 미약하게 관찰되었으며, 주변 세포와의 연결밀도가 증가되었음을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

## IV. 고 찰

중추신경계 손상에 대한 실험적인 연구들은 주로 허혈성(Traystman, 2003), 외상성 뇌손상(Prins 등, 2003), 알코올 중독(Light 등, 2002) 등을 유발시킨 실험모델을 대상으로 손상과 회복에 따른 신경운동학적인 기능과 세포 형태학적인 변화를 관찰하였다. 이러한 선행연구를 통해 중추신경계 손상에 대한 물리치료적 중재방안의 효과가 운동기능회복 및 신경세포의 재생에 따른 조직형태학적 변화를 통해

입증되었다. 그러나 중추신경계 질환의 실제적인 병리기전이 중추신경계 신경원의 사멸이 주된 원인이라고 간주할 때, 신경원의 사멸을 일으키는 홍분독성을 실험적으로 유발한 후 다양한 물리치료적 중재를 적용함으로써 각종 중추신경계 질환의 예방과 치료에 관한 연구는 아직 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 백서를 대상으로 홍분독성 물질을 복강주사하여 실험적으로 소뇌손상을 일으킨 후 운동기술학습과 트레드밀 운동의 임상적 효용성을 입증하고자 하였다. Anderson과 Flumerfelt(1980)는 3AP 투여 후 백서의 하올리브핵과 소뇌피질에서의 독성 효과를 관찰한 결과 신경과피 잔유물이 시간이 경과함에 따라 신경교세포의 식작용활성에 의해 제거되었음을 확인하였다. 본 연구에서는 3AP를 이용한 소뇌손상 유발모델이 다른 신경세포에 직접적인 영향을 미치지 않고 하올리브핵만을 선택적으로 파괴함으로써 진전현상 및 불안정한 걸음걸이 등을 포함하는 운동실조를 야기하는 실험기법이라고 생각되어, 3AP를 복강주사하여 실험적으로 홍분독성 소뇌손상을 유발하였다. 3AP를 투여한 II, III, IV군에서 약 3시간 반 후에 몸통, 머리, 팔다리 등에 진전과 함께 실조성 보행이 특징적으로 관찰되었다. 중추신경계 손상에 대한 물리치료적 중재와 관련된 이론이 발달하면서 임상에서는 근거에 입각한 적극적인 치료가 이루어지고 있으며, 그 중재방법과 기술들 또한 다양해지고 있다. 특히, 과제지향적인 중재방법으로 운동기술학습이나 복합운동훈련을 통해 신경세포와 신경연접의 가소성이 촉발되어 새로운 신경연접이 형성되고 신경연접 종말의 성장을 도와 신경연접간의 접촉수를 증가시킨다는 다양한 보고들이 발표되고 있다(Rema와 Ebner, 1999; Kleim 등, 1998). 본 연구에서도 운동기술학습과 트레드밀 운

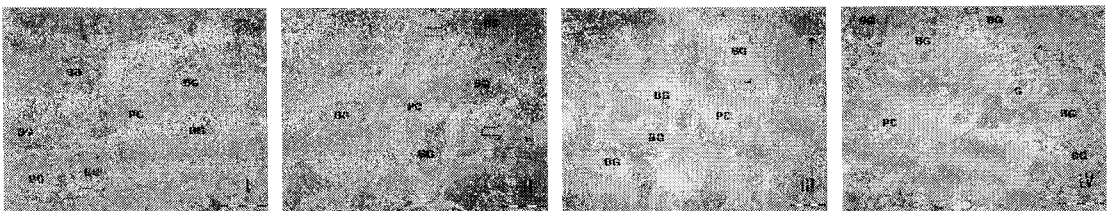


Fig 3. The electron microscopic findings of Purkinje cells in each groups (Bar represent 1000 nm) I : Normal control, II: 3AP induced, III: 3AP induced + motor skill learning, IV: 3AP induced + treadmill exercise

동을 4주간 적용하여 운동 수행력 향상 및 신경연접 가소성에 미치는 효과를 알아봄으로써 과제지향적인 물리치료적 중재방법으로 적용될 수 있는 균형 및 협응훈련이 소뇌를 중심으로 한 신경학적 연결에서 어떠한 기전으로 운동기능 회복에 작용하는지를 객관적으로 입증하고자 하였다.

균형능력을 평가하기 위하여 rota-rod 검사를 실시한 결과 소뇌손상 후 II, III, IV군의 운동 수행력이 감소하였으며, 손상 2주 후에 II군에 비해 III군에서, 4주 후에 II군에 비해 III, IV군에서 유의한 차이가 나타났다( $p < .001$ ). 이러한 결과는 여러 과제 훈련을 통한 복합운동훈련이 균형능력을 향상 시켰다는 Federmeier 등(2002)의 연구 결과와 부합하였다. 협응력을 평가하기 위하여 power reaching 검사를 실시한 결과 소뇌손상 후 II, III, IV군의 운동 수행력이 감소하였으며, 손상 2주 후에 II군에 비해 III군에서, 4주 후에 II군에 비해 III, IV군에서 유의한 차이가 나타났다( $p < .001$ ). 이러한 결과는 반복적인 운동기술학습이 협응력 향상에 효과적이라는 선행 연구결과와 부합하였다(Remple 등, 2001). 운동수행력 검사결과를 종합해 볼 때 운동기술학습은 트레드밀 운동에 비해 좀 더 빠른 시기에 운동수행력을 향상 시켰다고 볼 수 있다. 이러한 결과는 운동기술학습이 다양한 과제를 통해 근육 및 관절과 같은 고유 수용성 기관으로부터 체성감각 자극과 고유 수용성 자극을 받아들여 소뇌피질의 신경연접이 증가된 것으로 생각되어지며, 트레드밀이나 휠 달리기 운동 같은 단순한 운동을 적용한 실험군보다 다양한 주변 환경과 과제를 제공한 실험군이 신경학적 운동 수행력과 신경영양성인자의 발현이 높았다는 선행 연구결과와 일치한다(Cotman와 Berchtold, 2002).

운동수행력의 향상은 신경계 회복의 행동학적 증거로 생각되어질 수 있는데, 이러한 신경계의 회복 기전에는 신경연접의 강화를 비롯한 신경연접 가소성이 포함된다. Frick와 Fernandez(2003)는 환경적인 강화가 공간 기억력을 향상시킬 뿐만 아니라 신경연접 전 단백질인 synaptophysin의 발현을 증가시킨다고 보고하였으며, van-Praag 등(2000)은 다양한 주변 환경과 과제를 제공하는 환경강화와 복합운동훈련이 신경원의 크기와 시냅스 밀도의 증가, 수상돌

기의 밀도 증가, 신경연접의 수와 혈관생성 증가와 관련이 있다고 보고하였다. 본 연구에서는 운동수행력과 신경연접 가소성의 관계를 알아보기 위해 H & E 염색과 synaptophysin의 면역염색을 실시하였다. H & E 염색 결과 II, III, IV군의 퍼킨즈 세포층에서 공포화 현상과 세포체의 변성 및 축삭의 소실이 관찰 되었으나 III군에서는 축삭 및 수상돌기의 수적 증가가 관찰되었다. 이러한 결과는 운동수행력 평가 결과와 일치하였으며, 축삭 및 수상돌기의 증가는 구심성 및 원심성 정보를 전달하고 받아들이고 신경연접의 재형성을 의미한다고 생각된다. 이는 운동기술학습이 소뇌피질에서 퍼킨즈 세포에 대한 평행섬유의 신경연접의 수를 증가시킨다고 보고한 선행 연구결과와 부합한다(Giaquinta 등, 1998). Synaptophysin에 대한 면역 반응성을 관찰한 결과 II군과 IV군에 비해 III군에서는 과립층 및 퍼킨즈 세포층에서 면역 반응이 보다 증가되었음을 관찰할 수 있었다. 이러한 면역 반응의 소견은 신경연접의 형성정도와 밀도가 증가하여 나타난 결과로 신경연접의 재생을 의미한다고 해석할 수 있으며, 이는 다양한 주변 환경과 과제를 제공한 환경강화가 퍼킨즈 세포의 수상돌기 가지치기(dendritic branching)와 신경연접 전 소포를 증가시키고 신경연접 형성을 촉진하여 기억 및 학습능력 향상에 관여한다고 보고한 선행 연구결과와 일치 하였다(Sanes, 2003).

최근 분자생물학의 발전으로 신경아교세포에서 발현되는 다양한 종류의 신경조절 물질들이 밝혀짐에 따라 신경아교세포의 기능에 대한 관심이 새로워지고 있다(Cui 등, 2001). 소뇌에는 신경세포와 신경아교세포의 세포체가 서로 연접을 이루고 있는 구조가 있는데, 버그만 아교세포(Bergmann neuroglia)라는 신경아교세포의 한 종류는 특수하게 변형된 별아교세포로서 퍼킨즈 세포의 세포체 주위를 둘러싸고 있다. 버그만 아교세포는 퍼킨즈 세포 주위를 둘러싸고 있는 신경아교세포로서 글루탐산의 흡수, 인지질 합성, 철 이온의 항상성 유지 등에 관여하는 것으로 보고되어 있다(Sotelo 등, 1994). 전자현미경을 이용하여 퍼킨즈 세포와 이를 둘러싸고 있는 버그만 아교세포를 중심으로 관찰한 결과 II, III, IV군에서는 퍼킨즈 세포의 연접이 불분명하였으며, 주



변에 공포와 수상돌기의 종창이 관찰되었다. 이는 홍분독성 물질 주입에 따른 신경연접의 장애에 의한 것으로 생각되어 질 수 있으며, 퍼킨즈 세포의 수상돌기와 연접을 이루고 있는 여러 소뇌 신경 세포의 연접구조를 고려해 볼 때 퍼킨즈 세포의 변성은 소뇌 내에서 신경전도에 영향을 미칠 것으로 생각된다. III군의 퍼킨즈 세포는 변성정도가 다소 미약하게 관찰되었는데, 이러한 결과는 운동기술학습이 퍼킨즈 세포의 신경연접 증가와 함께 정상세포의 활동을 증가시켜 소뇌신경세포의 긍정적인 변화를 초래한 것으로 생각되어진다. 이는 운동기술학습이 정상세포의 수상돌기의양을 증가시킨다는 선행 연구결과와 일치하였다(Kleim 등, 2007). 이상의 결과를 종합해 볼 때 운동기술학습이 신경연접의 형성을 촉진시키고 밀도를 증가시킴으로서 신경연접의 재생에 관여 하는 것으로 생각되어진다. 이러한 세포수준에서의 변화는 신경세포들을 서로 연결하는 신경연접의 연결강도를 변화시켜 새로운 신경망을 형성하는 과정이라 생각할 수 있으며, 이를 통해 운동기능 장애를 개선시킨 것으로 생각된다.

## V. 결 론

본 연구는 3AP을 복강주사 하여 실험적으로 소뇌손상을 유발한 백서를 대상으로 4주간의 운동기술학습과 트레드밀 운동 중재방법이 균형능력 및 협응력에 미치는 영향을 알아보았다. 운동수행력 검사를 통해 III군과 IV군에서 운동기능이 점차 향상됨을 관찰할 수 있었으며, 특히 III군에서 보다 빠른 회복을 관찰할 수 있었다. 조직형태학적 관찰 결과, III군에서는 II, IV군에 비해 퍼킨즈 세포의 축삭 및 수상돌기의 수적 증가가 관찰되었다. Synaptophysin의 면역조직화학적 관찰 결과, III군은 II, IV군에 비해 과립층 및 퍼킨즈 세포층에서 면역 반응이 보다 증가되었음을 관찰할 수 있었다. 전자현미경을 통한 미세형태학적 관찰 결과, 소뇌 손상을 유발한 실험군들에서 퍼킨즈 세포와 버그만 아교세포와의 연접이 불분명하였으며, 퍼킨즈 세포 주변에서 공포가 관찰되었다. III군에서는 퍼킨즈 세포의 변성정도가 다소 미약하게 관찰되었다. 이상의 결과를 통해

4주간의 운동기술학습과 트레드밀 운동 중재방법이 운동수행력 향상 및 신경연접 가소성에 긍정적인 영향을 미치며 이는 소뇌손상 시 수반되는 운동장애들을 호전시킬 수 있음을 확인하였다.

## 참 고 문 헌

- Anastasio TJ. A pattern correlation model of vestibulo-ocular reflex habituation. *Neural Netw.* 2001;14(1):1-22.
- Anderson BJ, Alcantara AA, Greenough WT. Motor-skill learning: changes in synaptic organization of the rat cerebellar cortex. *Neurobiol Learn Mem.* 1996;66(2):221-9.
- Anderson WA, Flumerfelt BA. A light and electron microscopic study of the effects of 3-acetylpyridine intoxication on the inferior olivary complex and cerebellar cortex. *J Comp Neurol.* 1980;190(1):157-74.
- Beitz AJ, Saxon D. Harmaline-induced climbing fiber activation causes amino acid and peptide release in the rodent cerebella cortex and a unique temporal pattern of Fos expression in the olivo-cerebellar pathway. *J Neurocytol.* 2004;33(1):49-74.
- Benson DL, Schnapp LM, Shapiro L et al. Making memories stick: cell-adhesion molecules in synaptic plasticity. *Trends Cell Biol.* 2000;10(11):473-82.
- Carro E, Trejo JL, Busiguina S et al. Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. *J Neurosci.* 2001;21(15):5678-84.
- Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 2002;25(6):295-301.
- Cui W, Allen ND, Skynner M et al. Inducible ablation of astrocytes shows that these cells are required for neuronal survival in the adult brain. *Glia.* 2001;34(4):272-82.
- Desclin JC, Colin F. The olivocerebellar system. II.

- Some ultrastructural correlates of inferior olive destruction in the rat. *Brain Res.* 1980;187(1): 29-46.
- Devi SA, Kiran TR. Regional response in antioxidant system to exercise training and dietary vitamin E in aging rat brain. *Neurobiol Aging.* 2004;25(4): 501-8.
- Doble A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: Implication for therapy. *Pharmacol Ther.* 1999;81(3):163-221.
- Federmeier KD, Kleim JA, Greenough WT. Learning-induced multiple synapse formation in rat cerebellar cortex. *Neurosci Lett.* 2002;332(3):180-4.
- Fernandez-Chacon R, Konigstorfer A, Gerber SH et al. Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature.* 2001;410(6824): 41-9.
- Frick KM, Fernandez SM. Enrichment enhances spatial memory and increase synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiol Aging.* 2003;24(4):615-26.
- Gasbarri A, Pompili A, Pacittie C et al. Comparative effects of lesions to the ponto-cerebellar and olivocerebellar pathways on motor and spatial learning in the rat. *Neuroscience.* 2003; 116:1131-40.
- Giaquinta G, Casabona A, Valle MS et al. Spino-cerebellar Purkinje cell and rat forelimb postures: a direction-dependent activity. *Neurosci Lett* 1998; 245(2):81-4.
- Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci.* 1994;17:31-108.
- Janahmadi M, Goudarzi I, Kaffashian MR et al. Co-treatment with riluzole, a neuroprotective drug, ameliorates the 3-acetylpyrrole-induced neurotoxicity in cerebellar Purkinje neurons of rats: behavioral and electrophysiological evidence. *Neurotoxicology.* 2009;30(3):393-402.
- Javitt DC. Glutamate and schizophrenia: phencyclidine, N-methyl-D-aspartate receptors, and dopamine-glutamate interactions. *Int Rev Neurobiol.* 2007; 78:69-108.
- Jones TA, Chu CJ, Grande LA et al. Motor skills training enhances lesion-induced structural plasticity in the motor cortex of adult rats. *J Neurosci.* 1999;19(22):10153-63.
- Kleim JA, Swain RA, Armstrong KA et al. Selective synaptic plasticity within the cerebellar cortex following complex motor skill learning. *Neurobiol Learn Mem.* 1998;69(3):274-89.
- Kleim JA, Markham JA, Vij K et al. Motor learning induces astrocytic hypertrophy in the cerebellar cortex. *Behav Brain Res.* 2007;178(2): 244-9.
- Laurin D, Verreault R, Lindsay J et al. Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. *Arch Neurol.* 2001; 58(3):498-504.
- Light KE, Brown DP, Newton BW et al. Ethanol-induced alterations of neurotrophin receptor expression on Purkinje cells in the neonatal rat cerebellum. *Brain Res.* 2002;924(1):71-81.
- Litwak J, Mercugliano M, Chesselet MF et al. Increased glutamic acid decarboxylase(GAD) mRNA and GAD activity in cerebellar Purkinje cell following lesions-induced increased in cell firing. *Neurosci Lett.* 1990;116(1-2):179-83.
- Luscher C, Nicoll RA, Malenka RC et al. Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. *Nat Neurosci.* 2000;3(6): 545-50.
- Mauk MD, Medina JF, Nores WL et al. Cerebellar function: coordination, learning or timing? *Curr Biol.* 2000;10(14):522-5.
- Morton SM, Bastian AJ. Cerebellar control of balance and locomotion. *Neuroscientist.* 2004;10(3):247-59.
- Newlands SD, Perachio AA. Central projections of the vestibular nerve: a review and single fiber study in the Mongolian gerbil. *Brain Res Bull.* 2003;60(5-6):475-95.
- Perciavalle V, Bosco G, Poppele R. Correlated

- activity in the spinocerebellum is related to spinal timing generators. *Brain Res.* 1995;695(2): 293-7.
- Prins ML, Povlishock JT, Phillips LL. The effects of combined fluid percussion traumatic brain injury and unilateral entorhinal deafferentation on the juvenile rat brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 2003;140(1):93-104.
- Rema V, Ebner FF. Effect of enriched environment rearing on impairments in cortical excitability and plasticity after prenatal alcohol exposure. *J Neurosci.* 1999;19(24): 10993-1006.
- Remple MS, Bruneau RM, VandenBerg PM et al. Sensitivity of cortical movement representations to motor experience: evidence that skill learning but not strength training induces cortical reorganization. *Behav Brain Res.* 2001;123(2):133-41.
- Sanes JN. Neocortical mechanisms in motor learning. *Curr Opin Neurobiol.* 2003;13(2):225-31.
- Seoane A, Apps R, Balbuena E et al. Differential effects of trans-crotonitrile and 3-acetylpyridine on inferior olive integrity and behavioral performance in the rat. *Eur J Neurosci.* 2005;22(4):880-94.
- Sotelo C, Alvarado-Mallart RM, Frain M et al. Molecular plasticity of adult Bergmann fibers is associated with radial migration of grafted Purkinje cells. *J Neurosci.* 1994;14(1):124-33.
- 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):508-27.
- Traystman RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J.* 2003;44(2):85-95.
- van-Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci.* 2000;1(3):191-8.
- Vaynman S, Ying Z, Wu A et al. Coupling energy metabolism with a mechanism to support brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity. *Neuroscience.* 2006;139(4): 1221-34.
- Watson M, McElligott JG. Cerebellar norepinephrine depletion and impaired acquisition of specific locomotor tasks in the rats. *Brain Res.* 1984;296 (1):129-38.