

극저전류자극이 손상된 토끼 뇌의 별아교세포 증식에 미치는 효과

효자병원 · 용인대학교 물리치료학과¹⁾

김지성 · 민경옥¹⁾

The Effects of Microcurrent Stimulation on the Astrocytes Proliferation at Injured Brain of Rabbit

Kim, Ji Sung, M.S., R.P.T., Min, Kyoung Ok, Ph.D., R.P.T.¹⁾

Hyo-ja Hospital · Dept. of Physical Therapy, Yong-In University¹⁾

- ABSTRACT -

Astrocyte, which shares the greatest part of the brain (about 25%), is a kind of glial cell that composes the central nervous system along with microglia, ependymal cell and oligodendroglia. It has 7-9nm of fibers in its cytoplasm, which are composed of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin.

As for the functions of the astrocyte, it has, so far, been supposed that the astrocyte will play a cytoskeletal role in maintaining the structure of the cerebrum, play a role as a blood-brain barrier so that it can induce migration of the neuron in its development and substances in the blood cannot go into the nervous tissue, and a role of immunology and phagocytosis. However, it was revealed today that it will be a role in preventing expansion of injury by attaching itself to the connective tissue such as the vessel and the pia mater when the nervous tissue or the arachnoid is injured.

Microcurrent stimulation can control current, on the basis of A unit. That is, with such devices using it, it is possible to sense, from the outside, the injured current(wound current) of the lesion and to change it into the normal current, thereby promoting the restoration of the cells.

In order to examine the effects of microcurrent stimulation on the injured astrocytes in the rabbits, this study was conducted with 24 New Zealand White Rabbit as its subjects, which were divided into 8 animals of the experiment group and 16 animals of the control group. After the animals in the experiment group were fixed to the stereotaxic apparatus, their hair was removed and their premotor area(association area) perforated by the micro-drill for skull-perforation with the depth of 8mm from the scalp. In one week after the injury, 4

animals in the control group and 8 animals in the experiment group were sacrificed and examined with immunohistochemical method. And in three weeks, the remaining 4 animals in the control group and 8 animals in the experiment group were also sacrificed and examined with the same way.

The conclusion has been drawn as follows :In the control group sacrificed in one week after the injury, the astrocytes somewhat increased, compared with the normal animals, and in the group sacrificed in three weeks after the injury, they increased more ($p < 0.05$). The experiment group A in one week showed a little increase, but there was no significant differences, but the experiment group in three weeks showed more increase, compared with the experiment group in one week ($p < 0.05$). The experiment group B in one week showed more increase than the control group or the experiment group A, and the experiment group in three weeks showed more increase than the experiment group in one week ($p < 0.05$). Among the astrocytes, fibrous astrocytes were mostly observed, increasing as they are close to the lesion, and decreasing as they are remote from it.

The findings show that microcurrent can cause the astrocytes to proliferate and that it will be more effective to stimulate the cervical part somewhat remote from the lesion rather than to directly stimulate the part of the lesion. Thus, microcurrent stimulation can be one of the methods that can activate the reaction of astrocytes, which is one of the mechanism for treating cerebral injury with hemorrhage.

Therefore, this study will be used as basic research data for promoting restoration of functions in the patient with injury in the central nervous system.

Key words : Astrocytes, Glial fibrillary acidic protein (GFAP), Microcurrent.

I. 서론

별아교세포(astrocytes)는 소교세포(microglia), 뇌실막세포(ependymal cell), 희돌기교세포(oligodendroglia)와 함께 중추신경계를 구성하는 교세포로서 뇌에서 가장 많은 세포이며, 전체 세포의 25%를 차지하고(Eng 등, 1992; Norenberg, 1994; Arthur 등, 1987) 세포질에 7~9nm의 섬유를 가지는데 이것들은 glial fibrillary acidic protein(GFAP)(Eng 등, 1971; Bignami 등, 1972; Lazarides, 1982; Eng, 1985; Vijayan, 1990)과 vimentin(Arai, 1992)으로 구성되어 있다.

별아교세포의 기능은 대뇌의 구조유지에 있어 세포골격 역할을 하고 발생 도중 신경원의 이주를 유도하며, 혈관주위 경계막에서 혈액 내의 물질이 신경조직으로 쉽게 들어가지 못하도록 막는 뇌혈관장

벽(blood-brain barrier) 역할을 하고, 그 외에 다른 대사상의 역할 및 면역학적 기능과 탐식작용 등을 할 것이라고 추측되었으나(Eng 등, 1987; Adams, 1992; Norenberg, 1994), 지금에 와서는 별아교세포의 혈관돌기 사이로 물질이 자유롭게 드나든다는 것이 보고된 이후 뇌혈관장벽의 역할은 모세혈관 내피세포의 외측면에 있는 폐쇄연접이 주로 수행하며, 혈관 및 뇌 연질막과 같은 결합조직 구조에 부착할 뿐 아니라 신경조직에서 지주적인 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 그리고 신경원에서 탈분극이 일어날 때 세포외액으로 나오는 칼륨 이온을 흡수해 세포외액에서의 칼륨 농도 상승을 억제하여 세포외액의 산성도를 조절함으로써 항상성 유지에 관여하며, 또한 손상된 신경조직이 있을 때 증식하여 손상이 더 이상 확산되지 않도록 막아주는 역할을 한다는 보고가 있다(Henn 등, 1972; Barres 등, 1990).

정상적으로 대뇌 회색질에 있는 별아교세포의 0.08%와 백색질에 있는 별아교세포의 0.03%가 세포 분열중임이 밝혀져 대뇌에서의 별아교세포 증식율은 낮고 교체율도 매우 느린 것을 볼 수 있다(Kaplan & Hinds, 1980).

GFAP(glial fibrillary acidic protein)는 아교세포들(별아교세포와 슈반세포)의 중간미세섬유에 주로 분포하는 분자량 50,000 dalton 크기의 vimentin-like 단백질로서, 다발성경화증(multiple sclerosis), 반흔(scar) 부분(Eng, 1971)에 별아교세포가 집중되어 증식할 때 높은 농도로 존재하고 있음이 밝혀졌다(Aquino 등, 1988). 그리고 이들은 별아교세포에만 특이적으로 염색되기 때문에 별아교세포의 특이적 표지물질(specific marker)로도 사용되어지고 있다(Bignami & Dahl, 1974; Eng 등, 1971; Schachner 등, 1977; Bignami 등, 1972; Bignami & Dahl D, 1977).

중추신경계에서의 손상 후 교세포의 증식은 정상적인 세포의 환경을 유지시키는 역할을 하지만, 한편으로는 물리적 장벽을 형성하여 신경회로의 재구성을 방해하는 좋지 못한 효과도 있으므로(Eng 등, 1987; Stensaas 등, 1987; Norenberg, 1994) 이를 억제하려는 연구들도 있다(Billingsley & Mandel, 1982; Vijayan & Cotman, 1987; O'Callaghan 등, 1991; Balasingam 등, 1994).

뇌 손상의 다양한 반응에서 별아교세포는 GFAP 면역반응성의 증가에 비례하여 별아교세포의 수적증가(hyperplasia)와 핵의 크기 증가 및 세포체와 돌기의 증가(hypertrophy)가 일어나는 것으로 잘 알려져 있다(Cavangh, 1970; Mathewson 등, 1985; Nathaniel 등, 1981; Vijayan 등, 1990). 그리고 대뇌의 기계적 손상 후 증식하는 별아교세포는 상처 주위에 제한되어 있다가 시간이 지나면서 전체의 동측 피질로 퍼졌다가 퇴행한다(Mathewson & Berry, 1985; Norton 등, 1992). 이러한 형태학적인 현상은 신경교증식증(gliosis) 반응의 특징이다. 뇌 손상 후의 별아교세포증 반응은 신경원 재생을 위한 성장인자 공급에 의한 효과적인 신경의 회복이나 생리학적인 억제

경로의 활성화를 통한 축삭의 재성장 억제에 의해 중요한 결과를 가져온다

(Bergman 등, 1995; Cotman 등, 1984; Kinoshita 등, 1990; Reier 등, 1989; Schwab, 1990). 그러나 이러한 반응의 분자수준의 기전과 별아교세포의 기능적인 역할은 아직 많이 밝혀져 있지 않았으며, 기초적인 단계에 있다고 한다(Norton 등, 1992; Ridet 등, 1997; Wu 등, 1998).

극저전류치료기(Microcurrent, Electro-Acuscope, EMI, USA)는 지금까지 물리치료분야에서 사용해 오던 경피신경전기자극치료기(TENS)나 간섭파치료기(IFT)등과 같은 일반 전기자극치료와는 여러 가지 측면에서 다른 특징을 가지고 있다. 우선 사용하는 전류의 강도가 μ A 단위로써 mA 단위를 사용하고 있는 기존의 전기치료와 구별이 되며 무엇보다도 치료이론에서 차이가 있다. 극저전류치료의 이론적 근간은 1991년 노벨의학상을 수상한 독일의 에르빈 네허박사와 베르트 자크만박사의 세포내 이온통로(ion channel)에 관한 학설과 이온통로이론을 기초로 하여 발표된 세포통신이론이다.

조직이 손상을 당하면 손상된 조직에는 원래의 세포막에 대전되어 있던 전류와는 다른 전류가 비정상적으로 대전되게 되는데 이것을 손상전류(injured current)라고 부른다. 손상전류의 발생에 대해 최초로 실험적으로 관찰한 사람은 Dubois-Reymond로서 이미 1843년에 실험이 행해졌다. 그후 이 부분에 대한 연구가 계속 진행되어오다 1982년에 Barker 등이 상처 1cm당 약 10 μ A의 전류가 흐르고 있음을 증명하였다. 손상된 조직이 정상적이고 건강한 조직으로 회복되기 위해서는 원형질막의 회복과정을 자극하는 것이 필요한데, 이때 손상조직과 정상조직 사이에서 발생된 이온전류가 매우 큰 영향을 미친다. 이론적으로 이들 회복률은 침범된 조직을 통하여 외부에서 자극전류를 적절하게 부과함으로써 촉진시킬 수 있다.

따라서 본 연구의 목적은 초기 뇌 손상 후 별아교세포의 증식이 병변을 제한하고 손상부위의 회복과 뇌의 기능유지에 유용한 작용을 한다는 점에 기초하

여 토끼의 대뇌 피질에 천공 손상 후 극저전류자극을 적용하고, 면역조직화학적 방법을 통하여 별아교세포와 병변의 변화를 관찰하여 뇌 손상 초기에 극저전류자극이 별아교세포 증식에 미치는 영향과 별아교세포의 증식에 효과적인 자극방법을 제시하고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에는 실험 동물로 생후 40일 전후의 체중 1,200g ~ 1,500g 사이의 흰색 토끼 24마리를 암수 구별 없이 사용하였다. 이 실험동물들은 동일한 조건을 유지하기 위하여 온도(23°C ± 2°C), 습도(55% ~ 65%), 공기청정 상태를 일정하게 지속할 수 있는 실험실에서 같은 고품사료로 일정기간 사육하였고, 1주일 동안의 적응기간 후 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

1) 실험처치 및 자극방법

실험 동물은 24마리를 암수 구별 없이 각각 8마리씩 실험군 A, B와 대조군으로 나누었고, 각 군은 정위고정대(Stereotaxic apparatus)에 고정시킨 후 체모를 제거하고 두개골 천자용 미세드릴을 사용하여 두피로부터 8mm 깊이로 좌측 대뇌 전두엽의 전운동영역(연합영역)에 천공손상을 주었다.

대뇌 천공손상 후 실험군 A는 천공부위로부터 좌·우 각각 0.5cm 떨어진 부위에 백금전극(길이 2cm, 두께 1mm)을 삽입 고정 후 하루 1회 20분씩 극저전류자극(Electro-Acuscope, EMI, USA)을 시행하였고, 실험군 B는 경추후부에 침전극을 이용하여 실험군 A와 동일한 조건으로 자극을 실시하였다. 자극 강도는 극저전류자극에 의해 토끼의 자극지점 주위의 근육 움직임이 나타나면 곧바로 강도를 약간 감소시켜 근육의 움직임이 사라진 상태에서 자극을 하였다

(그림 1). 실험군 A, B는 정해진 계획에 따라 4마리는 1주일 동안 자극을 실시한 후 희생시켜 면역조직학적 검사법을 이용하여 관찰하였고, 나머지 4마리는 3주일 동안 자극을 한 후 동일한 방법으로 관찰하였다. 대조군은 대뇌 천공 손상 후 극저전류자극을 시행하지 않고 소독처치 후 그대로 보존하였다.

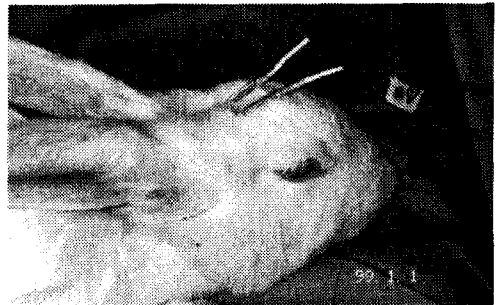


그림 1. 극저전류자극방법

2) 조직처리

희생시킨 토끼는 thiopental sodium(1mg/kg)을 복강 주사하여 마취시키고 토끼의 흉강을 열고 심장에서 나오는 상행대동맥을 통하여 canular를 삽입한 후 우심방을 천공하고, peristaltic pump를 이용하여 30ml/min의 속도로 0.1M phosphate Buffer Saline solution(PBS) (pH 7.2)로 20분간 전신 혈액을 관류수세하고, 50분간 4% paraformaldehyde로 전고정을 실시한 후(그림 2), 골점자를 사용하여 두개골을 제거하여 뇌를 조심스럽게 빼낸 후 4% paraformaldehyde(40°C)에 넣고 48시간 후고정시킨 뒤 비결방지를 위해 10%, 20%의 sucrose에 각각 48시간씩 침지시켰고, 30% sucrose에 가라앉을 때까지 침지시켜 deep freezer에 냉동 보존시켰다. 그리고 토끼의 뇌를 관상면으로 -20°C의 냉동절편기에서 40µm 두께로 연속냉동절편을 실시하였다.

냉동절편을 0.1M PBS에 5분간 3회 수세하고, 1% H₂O₂(in 0.1M PBS)에 30분간 그리고 1% normal goat serum에 1시간 동안 반응시켰다. 그리고 다시 0.1M PBS에 5분간 3회 수세를 실시하였고, 1차항체(rabbit anti cow GFAP)를 40°C에서 72시간동안 반

응시킨 다음 0.1M PBS에 5분간 3회 수세를 실시하였다. 그 다음 2차항체(biotinylated Anti rabbit IgG)에 24시간 반응시켰고 0.1M PBS에 다시 5분간 3회 수세하였다. Avidin-biotin-peroxidase complex(vector kit)를 이용하여 12시간 반응시킨 후 0.1M PBS에 5분간 3회 수세를 실시하여 3,3'-Diaminobenzidine용액으로 발색시켰고 1차 증류수에 발색을 정지시킨 후 gelatin이 입혀진 slide에 조직절편을 올리고 건조시켜 cover glass를 덮어 눈금자가 있는 광학현미경하에서 비교 관찰한 후 면역반응을 나타낸 세포를 촬영하여 현상하였다.

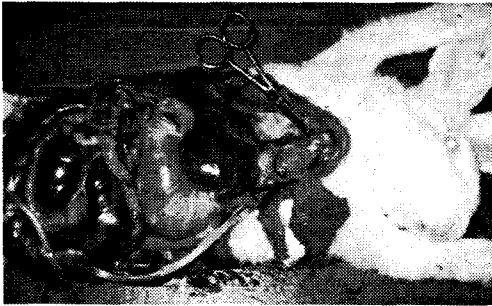


그림 2. 토끼의 좌심실을 통해 canular를 삽입하여 0.1M PBS와 4%paraformaldehyde로 관류 수세, 전고정 하는과정

3. 연구의 제한점

본 연구의 제한점은 손상부위를 실험대상의 대뇌로 제한하였기 때문에 이 결과를 뇌의 다른 영역에 동일하게 적용할 수 없으며, 실험을 통해 얻어진 연구 결과를 사람에게 그대로 적용할 수는 없다.

4. 자료처리

관찰된 별아교세포 수를 SAS system을 이용하여 통계처리 하였다. 극저전류자극에 의해 병변에서 나타나는 같은 기간의 각 군간 별아교세포 수의 변화를 일원배치 분산분석법(one-way ANOVA)으로, 각

군의 실험기간별 비교는 대응비교(t-test)를 이용하여 처리하였다. 통계학적인 유의성을 검증하기 위하여 유의수준은 $p > 0.05$ 로 정하였다.

Ⅲ. 결 과

본 실험은 극저전류자극이 손상된 중추신경계의 별아교세포 증식 및 병변(lesion range)의 변화에 미치는 효과를 관찰하고자 실험군과 대조군의 변화를 정상토끼와 비교하여 병변의 육안적 관찰 및 별아교세포 수의 변화를 실험기간 별로 나누어 측정 결과를 처리하였으며, 별아교세포 수의 변화 비교는 광학현미경하에서 GFAP에 반응한 별아교세포가 가장 밀집되어 관찰되는 부위를 선택하여 현미경상의 한 field를 기준으로 파악하였다.

1. 손상부위의 별아교세포의 육안적 관찰 및 분포

1주 후 희생시킨 대조군에서는 정상토끼에 비하여 약간 증가하였고, 3주 후 군에서는 1주 후 군보다 더 많은 증가를 보였다(그림 3, 4, 5, 6).

1주 후의 실험군A에서는 대조군에 비하여 약간 증가하였으나 별차이는 없었고, 3주 후 군에서는 1주 후 군보다 좀더 많은 증가를 보였다(그림 7, 8).

1주 후의 실험군B에서는 대조군이나 실험군A에 비하여 많은 증가를 보였고, 3주 후 군에서는 1주 후 군보다 좀더 많은 증가를 보였다(그림 9, 10).

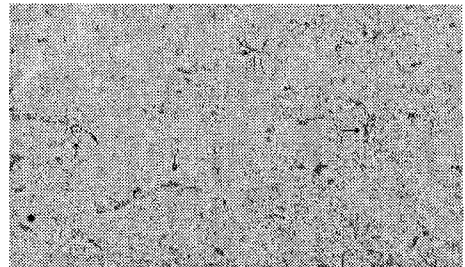


그림 3. 정상 토끼 뇌의 별아교세포(×400).

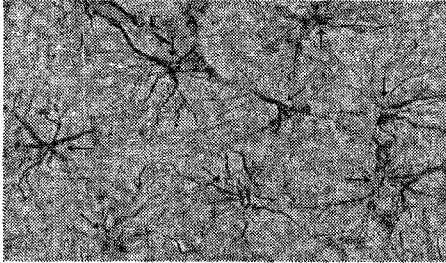


그림 4. 정상 토끼 뇌의 별아교세포
(arrow: fibrous astrocytes $\times 1000$).

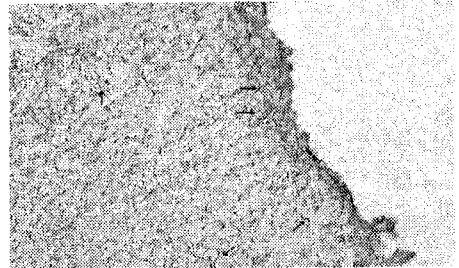


그림 7. 1주 후의 실험군A - 1주 후의 대조군 보
다 별아교세포가 증가하였다($\times 400$).

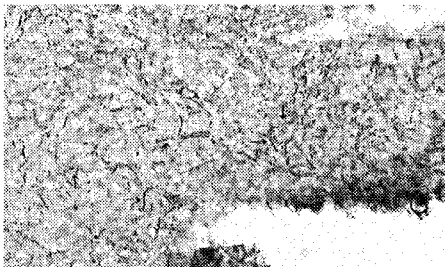


그림 5. 1주 후의 대조군 - 병변을 중심으로 별아
교세포가 분포하며, 정상토끼에 비하여 약
간 증가하였다($\times 400$).

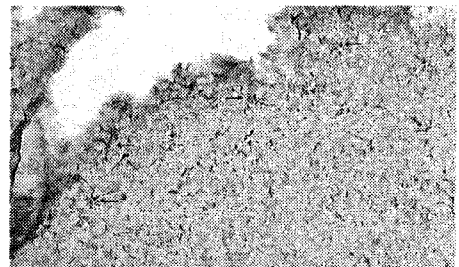


그림 8. 3주 후의 실험군A - 1주 후의 실험군A 보
다 별아교세포가 더 많이 증가하였다($\times 400$).



그림 6. 3주 후의 대조군 - 1주 후의 대조군에 비
하여 병변주위에 별아교세포가 더 많이
증가하였다($\times 400$).

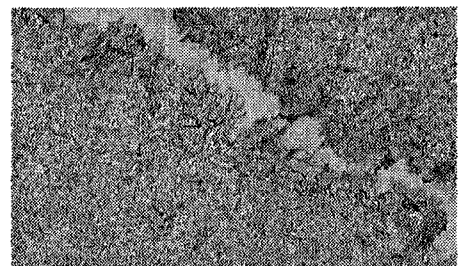


그림 9. 1주 후의 실험군B - 1주 후의 대조군이나
실험군A에 비하여 별아교세포가 더 많이
증가하였다($\times 400$).

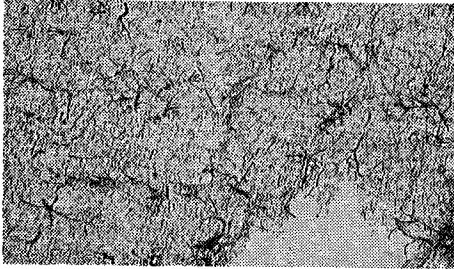


그림 10. 3주 후의 실험군B - 1주 후의 실험군B 보다 별아교세포가 더 많이 증가하였다 (×400).

그리고 현미경상으로 관찰된 별아교세포들은 병변 부위를 중심으로 가까이에 많이 분포하였고, 병변으로부터 멀어질수록 그 수가 감소하는 것을 볼 수 있었으며, 관찰된 별아교세포의 형태는 주로 섬유성 별아교세포(fibrous astrocytes)였다(그림 11).

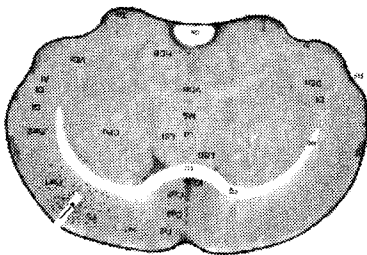


그림 11. 손상군에서의 일반적인 별아교세포 분포. 병변(arrow)부위로부터 가까운 곳에 많이 분포하였고, 멀어질수록 그 수가 감소하였다.

2. 손상부위의 별아교세포 수의 변화 관찰

별아교세포 수의 변화는 각 군에서 실험 1주 후 군보다 3주 후 군에서 별아교세포가 현저히 증가하고 있음을 알 수 있고, 실험 1주 후에 검사한 세 군 중에서도 실험군B에서 실험군A보다 더 많은 증가를

나타내었으며(실험군A : 22.25 ± 3.86 개, 실험군B : 37.50 ± 2.08 개), 그 수준이 3주가 지난 대조군보다 오히려 증가되어 있음을 알 수 있다. 또한 실험 3주 후의 실험군A는 같은 기간의 대조군 보다는 증가된 별아교세포를 관찰할 수 있었으나(실험군A 3주 : 48.75 ± 3.20 개, 대조군 3주 : 32.75 ± 1.71 개) 실험군B 보다는(실험군B 3주 : 63.25 ± 5.38 개) 그 증가 정도가 크지 않음을 알 수 있다(표 1) <그림 12-19>.

<표 1>에서 보는바와 같이 일원배치 분산분석법(ANOVA)에 의한 같은 기간 세 군사이의 별아교세포 수의 변화는 통계학적으로 $p < 0.05$ 수준에서 각자 다른 집단으로 유의하게 나타났으나, 최소유의차방법(LSD: Least Significant Difference)에 의한 각 군간의 비교는 실험 1주째에서 대조군(20.25 ± 3.86)과 실험군A(22.25 ± 3.10)는 거의 동일한 집단으로 나타났다. 그리고 대응비교(t-test)에 의한 각 군의 실험 기간별 비교는 세 군 모두 $p < 0.05$ 수준에서 유의하게 증가한 것으로 나타났다. <표 1>에서 별아교세포 수는 실험군B에서 1주 후 37.50 ± 2.08 , 3주 후 63.25 ± 5.38 로 두 기간 모두 가장 높게 나타났으나, 통계학적으로 실험군A에서 가장 유의하게 증가한 것으로 나타난 이유는 1주 후 실험군A에서 별아교세포 수의 증가가 실험군B에 비하여 현저하게 낮았기 때문인 것으로 사려된다.

표 1. 실험기간에 따른 각 군의 별아교세포의 수 (Mean±S.D.)

군	기간	대조군	실험군A	실험군B
1주		15	22	38
		22	18	37
		24	25	40
		20	24	35
		20.25 ± 3.86	22.25 ± 3.10	37.50 ± 2.08
3주		33	52	60
		31	46	58
		35	51	70
		32	46	65
		32.75 ± 1.71	48.75 ± 3.20	63.25 ± 5.38

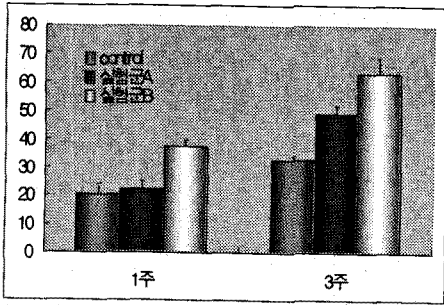


그림 12. 실험기간에 따른 각 군의 별아교세포의 변화

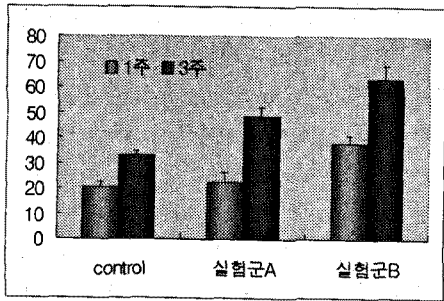


그림 13. 실험 1주, 3주 후 각 군의 별아교세포 증가 비교

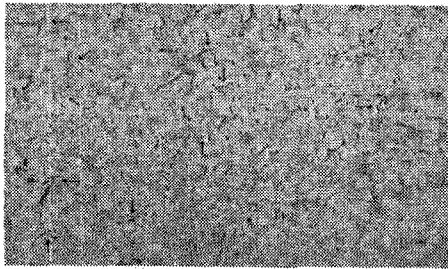


그림 14. 1주 후의 대조군 - 현미경상에서 GFAP에 반응한 별아교세포가 가장 밀집된 부위를 선택하여 별아교세포수를 계수하였다 (arrow : fibrous astrocytes×400).

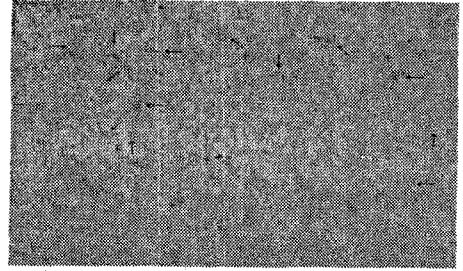


그림 15. 3주 후의 대조군 - 현미경상에서 GFAP에 반응한 별아교세포가 가장 밀집된 부위를 선택하여 별아교세포 수를 계수하였다 (arrow : fibrous astrocytes×400).

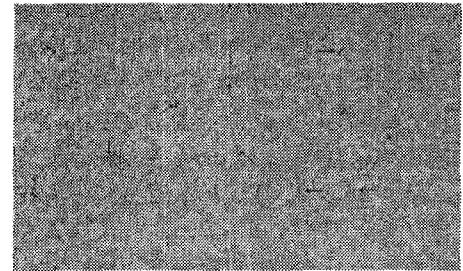


그림 16. 1주 후의 실험군A - 현미경상에서 GFAP에 반응한 별아교세포가 가장 밀집된 부위를 선택하여 별아교세포 수를 계수하였다 (arrow : fibrous astrocytes×400).

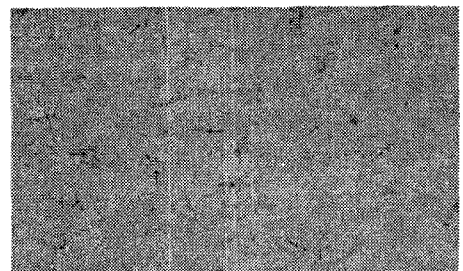


그림 17. 3주 후의 실험군A - 현미경상에서 GFAP에 반응한 별아교세포가 가장 밀집된 부위를 선택하여 별아교세포 수를 계수하였다 (arrow : fibrous astrocytes×400).

IV. 고찰

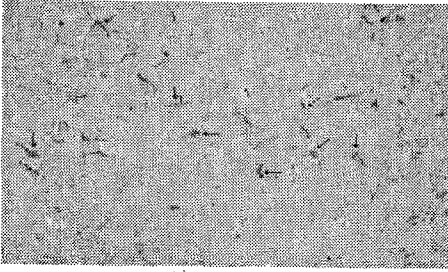


그림 18. 1주 후의 실험군B - 현미경상에서 GFAP에 반응한 별아교세포가 가장 밀집된 부위를 선택하여 별아교세포 수를 계수하였다 (arrow : fibrous astrocytes×400).

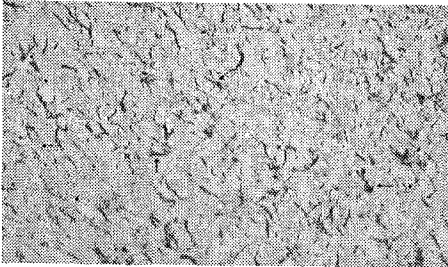


그림 19. 3주 후의 실험군B - 현미경상에서 GFAP에 반응한 별아교세포가 가장 밀집된 부위를 선택하여 별아교세포 수를 계수하였다 (arrow : fibrous astrocytes×400).

3. 손상부위 병변의 크기 변화 관찰

1주 후 희생시킨 대조군에 비하여 3주 후의 대조군에서는 병변(lesion range)의 현저한 증가를 보였다. 1주 후의 실험군A에서는 같은 기간의 대조군과 거의 차이를 보이지 않았으나, 3주 후의 실험군A에서는 병변의 감소를 보였다. 1주 후의 실험군B에서는 같은 기간의 대조군, 실험군A에 비하여 병변이 약간 감소하였고, 3주 후의 실험군A와 비슷한 크기를 보였으며, 3주 후의 실험군B에서는 병변의 크기가 현저하게 감소하였다.

별아교세포 증식 변화는 중추신경계의 다양한 손상에 의한 가장 특징적인 초기의 세포반응으로 폭넓게 인정되고 있다. 몇 십년 동안 중추신경계 손상 후 발생한 교세포증 반응은 축삭 재생의 중요한 장애 요소 중의 하나로 여겨져 왔었다. 그럼에도 불구하고 최근 연구에서는 별아교세포 반응이 축삭 재생 장애의 토대를 제공해 준다고 제안하고 있다(Ridet 등, 1997). 또한 Reier 등(1983)은 손상 후 교세포 반흔(glial scar)이 정상적인 뇌에 인접한 부위로부터 손상된 조직을 제한하여 새로운 교세포 경계를 형성하는 유익한 작용을 한다고 보고하였다.

최수임(1994) 연구에서는 Sprague-Dawley 흰쥐의 두피 절개 후 두개골을 원형으로 제거한 다음 동결 손상 없이 다시 접합한 대조군은 대뇌피질에서 면역조직화학적 검사 방법을 시행한 결과 GFAP에 양성인 비대 별아교세포가 거의 관찰되지 않았고, 액체 질소로 -196°C로 냉각시킨 알루미늄 원주막대를 뇌 표면에 90초간 접촉시켜 동결손상 후 3일부터 병변 부위의 측면과 기저부에서 양성 반응을 보이는 별아교세포의 수가 증가되었고, 1주 후에는 그 수가 더욱 증가되었으며 염색 정도도 더욱 강해졌다. 또한 별아교세포의 세포돌기들은 병변 부위를 향하는 방향성을 나타내고, 병변 부위 가까이에서 가장 많았고 거리가 멀어짐에 따라 그 수가 감소하였다고 보고하였다. 그리고 이 GFAP 양성 별아교세포들은 손상 후 2주부터는 현저히 감소되어 4주 이후에는 손상 전과 거의 같아졌다고 보고하였다. Proliferating cell nuclear antigen(PCNA)와 자가방사기록법(autoradiography)을 시행한 결과에서 별아교세포가 손상 3일 후 측면에 있는 세포의 핵에서 양성 반응을 보였고, 이들 중 일부는 핵의 크기도 상당히 증가되어 있었다. 이들은 손상 후 7일에는 약간 감소되었고, 손상 후 2주부터는 관찰되지 않았다. 양남길(1984) 등의 고양이의 뇌에 stainless steel knife를 이용하여 손상을 유발시킨 후 면역조직화학적 방법으로 관찰한 실

험에서 별아교세포는 초기부터 교세포 중 가장 활발한 반응을 보였으며, 특히 원형질성 별아교세포(protooplasmic astrocytes)가 그 영역을 크게 확장하여 수술 후 첫날부터 이미 많은 신경성분들이 별아교세포의 세포질내에 떠있는 것으로 보였고, 어떤 축삭 종말의 주변은 여러 겹의 별아교세포막으로 둘러 쌓인 것이 관찰되었다. 시간이 경과하여 1주일 이후부터는 별아교세포 가운데 상당수가 골지체, 내형질 세망의 발달과 함께 많은 섬유를 생성하는 섬유성 별아교세포(fibrous astrocytes)가 증가되었다고 보고하였다. Cavanagh(1970)는 성장한 쥐(200-250g)의 관상봉합 2mm 뒤의 정중선 부위의 두피를 제거하고 치과용 미세드릴을 사용하여 두개골막으로부터 3mm 깊이로 천공 손상 후 1, 2, 3, 4, 6일 경과 때마다 희생시켜 관찰하였다. 이 연구에서 관찰된 별아교세포는 손상 후 2일째부터 세포분열이 관찰되기 시작하였고, 3일 경과후 별아교세포의 분열이 가장 왕성하게 나타났다. 그리고 손상 후 4-6일에서는 비슷한 양상을 보였으며, 세포분열은 감소한다고 보고하였다.

본 실험에서는 토끼의 뇌 손상 후 별아교세포 수의 변화는 각 군에서 실험 1주 후에서 보다 3주 후에서 별아교세포가 현저히 증가한 것으로 나타났고($p < 0.05$), 실험 1주 후에 검사한 세 군중에서도 실험군B에서 실험군A보다 더 많은 증가를 보였으며(실험군A : 22.25 ± 3.86 개, 실험군B : 37.50 ± 2.08 개) 그 수준이 3주가 지난 대조군보다 오히려 증가한 것으로 관찰되었다. 또한 3주 후의 실험군A는 같은 기간의 대조군 보다는 증가된 별아교세포를 관찰할 수 있었으나(3주 후의 실험군A : 48.75 ± 3.20 개, 3주 후의 대조군 : 32.75 ± 1.71 개) 3주 후의 실험군B보다는(3주 후의 실험군B : 63.25 ± 5.38 개) 그 증가 정도가 크지 않음을 알 수 있다. 본 실험에서 이상과 같은 결과를 보인 이유는 일반적인 출혈양상이 미약한 뇌 손상에서는 1주 정도에서 별아교세포가 활발하게 증가되고 있으나 출혈양상이 큰 뇌 손상에서는 별아교세포가 3주 정도에서 그 활성도를 측정할 수 있을 정도로 지연되어 나타나고 있는데 이는 미세교세포

(microglia)와 탐식세포의 손상 받은 신경세포의 처리능력이 지연됨으로써 별아교세포의 병변 부위 억제 기능이 함께 지연되기 때문으로 사려되며, 각 연구마다 사용된 검사법의 차이에 의한 것으로 보여진다.

본 실험에서 관찰된 섬유성 별아교세포(fibrous astrocytes)의 증가는 양남길(1984) 등의 연구에서와 동일하게 나타났다. 이상과 같은 본 실험의 결과에 의해 초기 뇌 손상에서 대조군에서 보다 극저전류자극을 시행한 실험군에서 더 나은 치료효과를 관찰할 수 있었으며, 특히 출혈(hemorrhage)을 동반하는 뇌 손상에서 극저전류자극이 뇌 손상 치유기전 중 하나인 별아교세포 반응(astrocytes reaction)을 활성화시킬 수 있는 방법중의 하나가 될 수 있을 것으로 사려된다. 또한 손상 부위를 직접 자극한 실험군A 보다는 경추후부를 자극한 실험군B에서 별아교세포의 수가 증가한 것으로 보아 손상 후 병변 부위의 직접적인 자극 보다는 병변 부위에서 약간 떨어진 원위부를 자극하는 방법이 효과적일 것으로 사려된다.

대뇌의 손상 후 일어나는 별아교세포 증식에 의한 교세포증이 대뇌의 기능 회복을 위해 도움을 주는지 아니면 방해하는 역할을 하는지에 관해서는 직 확실히 밝혀지지 않았다. 별아교세포들은 세포골격의 역할뿐만 아니라 그 외에도 대뇌의 기능에 중요한 여러 가지 역할들 즉, 신경원의 이주, 신경초의 성장, 신경 접합부의 형성, 수분, 이온 및 신경전달 물질의 조절, 신경원에 열량 공급, 면역학적 기능, 신경성장인자 생성과 같은 것들이 있어서(Eng 등, 1987; Norenberg, 1994) 대뇌의 손상 후 별아교세포의 증식은 대뇌의 기능 유지를 위해 중요하지만, 한편으로는 물리적인 장벽을 형성하고 신경원의 성장을 억제하여 신경 회로의 재구성을 방해하는 단점이 있다(Eng 등, 1987; Stensaas 등, 1987; Topp 등, 1989; Eng 등, 1992). 그래서 DNA 합성의 억제제(Billingsley & Mandel, 1982), cytokine(Balasingam 등, 1994)등을 사용하여 별아교세포의 증식을 억제하거나 지연시켜서 중추신경계의 기능 회복을 촉진시

키려는 연구들도 있다. 본 연구에서는 별아교세포의 증식과 손상된 대뇌의 기능 회복의 상호관계에 대한 구체적인 관찰은 없었지만 앞서와 같이 별아교세포의 증식을 조절함으로써 대뇌의 기능 회복을 촉진시키기 위한 연구에 기초자료로 제공될 수 있을 것으로 사려되며, 또한 물리치료와 접목시켜 손상된 뇌에 극저전류자극을 통해 별아교세포와 병변의 변화를 관찰함으로써 초기 중추신경계 손상 환자의 기능 회복 촉진을 위한 물리치료적 접근에 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

V. 결 론

극저전류자극이 손상된 토끼 뇌의 별아교세포 증식에 미치는 효과를 관찰하기 위해 본 연구에서는 NewZealand White Rabbit 24마리를 암수 구별 없이 각각 8마리씩 실험군A, B, 대조군으로 나누었고, 각 군은 정위고정대(Stereotaxic apparatus)에 고정시킨 후 체모를 제거하고 두개골 천자용 미세드릴을 사용하여 두피로부터 8mm 깊이로 좌측 대뇌 전두엽의 전운동영역(연합영역)에 천공손상을 주었다.

대뇌 천공손상 후 실험군A는 천공부위로부터 좌·우 각각 0.5cm 떨어진 부위에 백금전극을 삽입 고정 후 하루 1회 20분씩 극저전류자극을 시행하였고, 실험군B는 경추후부에 침전극을 이용하여 실험군A와 동일한 조건으로 자극을 실시하였다. 실험군A, B는 정해진 계획에 따라 4마리는 1주일 동안 자극을 실시한 후 희생시켜 면역조직학적 검사법을 이용하여 관찰하였고, 나머지 4마리는 3주일 동안 자극을 한 후 동일방법으로 관찰하였다. 대조군은 대뇌 천공 손상 후 극저전류자극을 시행하지 않고 소독처리 후 그대로 보존하였다. 면역조직화학적 방법으로 별아교세포를 염색하여 대조군과 비교 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 1주 후에 희생시킨 대조군에서는 정상토끼에 비하여 별아교세포가 약간 증가하였고, 3주 후 군

에서는 1주 후 군보다 더 많은 증가를 보였다 ($p<0.05$).

2. 1주 후 실험군A에서는 대조군에 비하여 약간 증가하였으나 별차이는 없었고, 3주 후 군에서는 1주 후 군보다 좀더 많은 증가를 보였다 ($p<0.05$).
3. 1주 후 실험군B에서는 대조군이나 실험군A에 비하여 많은 증가를 보였고, 3주 후 군에서는 1주 후 군보다 좀더 많은 증가를 보였다($p<0.05$).
4. 별아교세포는 주로 섬유성 별아교세포(fibrous astrocytes)가 관찰되었고, 병변에서 가까울수록 많은 분포를 보이며, 멀어질수록 그 수가 감소하였다.

이상과 같은 결과로 보아 극저전류자극이 별아교세포의 증식을 일으키며, 손상 후 병변부위의 직접적인 자극보다는 병변부위에서 약간 떨어진 원위부를 자극하는 방법이 효과적일 것으로 보이고, 출혈(hemorrhage)을 동반하는 뇌 손상에서 극저전류자극이 뇌 손상 치유 기전 중 하나인 별아교세포 반응(astrocytes reaction)을 활성화시킬 수 있는 방법 중의 하나가 될 수 있을 것으로 사려된다.

참 고 문 헌

- 권오영. 단회 혹은 반복적인 전기경련충격이 흰쥐의 해마에서 신경세포 및 성상교세포에 미치는 영향에 관한 연구. 한양대학교 대학원 의학과 박사학위논문, 1997.
- 민경옥. 전기치료학Ⅱ, 현문사: 15-61, 1998.
- 양남길, 안의태, 고정식, 박경호. 뇌손상시 교세포의 작용에 관한 전자현미경적 연구. 순천향대학 논문집, 7(1): 1984.
- 최수임. 흰쥐 대뇌 피질의 동결 손상 후 재생과정에서 세포외기질과 별아교세포의 반응. 연세대학교 대학원 의학과 박사학위논문, 1994.
- Adams, JH., Duchon L.W. *Green field's*

- neuropathology(5th Ed.). London, Edward & Arnold : 34-41, 1992.
- Arai N. The role of swollen astrocytes in human brain lesions after edema-an immunohistochemical study using formalin-fixed paraffin-embedded sections. *Neurosci*, 138 : 56-58, 1992.
- Arthur, FE., Shivers, RR., Bowman, PD. Astrocytes-mediated induction of tight junction in brain capillary endothelium: an efficient in vitro model. *Dev. Brain Res.* 36 : 155-159, 1987.
- Banker, G.A. *Trophic interactions between astroglial cells and hippocampal neurons in culture.* Science N.Y., 209 : 809, 1980.
- Barres, BA., Chun, LLY., Corey, DP. Ion channels in vertebrate glia. *Annu Rev. Neurosci*, 13 : 441-474, 1990.
- Bergman, BS., Kunkel, B.E., Schnell, L., Dai, ILN., Gao, D. and Schwab, M.E. Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature*, 378 : 498-501, 1995.
- Cavanagh JB. The proliferation of astrocytes around a needle wound in the rat brain. *J. anat*, 106 : 471-487, 1970.
- Cotman, C.W., Nicot-Sampedro, M. *Cell biology of synaptic plasticity.* Science, 225 : 1287-1293, 1984.
- Da Cunha, A., Jefferson, JJ., Tyor, WR., Glass, JD., Jannotta, FS., Vitkovic, L. *Gliosis in human brain: relationship to size but not other properties of astrocytes.* Brain Res, 600 : 161-165, 1993.
- Eng LF., Reier PJ., Houlihan JD. Astrocytes activation and fibrous gliosis: glial fibrillary acidic protein immunostaining of astrocytes following intraspinal cord grafting of fetal CNS tissue. *Prog. Brain Res*, 71 : 439-455, 1987.
- Eng LF., Vanderhaeghen JJ., Bignami A., Gerstle B. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res*, 28 : 351-354, 1971.
- Eng LF., Yu ACH., Lee YL. Astrocytic response to injury. *Prog. Brain Res*, 94 : 353-365, 1992.
- Kidney, M.s., Bhat, A.N., Bhat,N.R. Transient ischemia stimulates glial fibrillary acid protein and vimentin gene expression in the gerbil neocortex, striatum and hippocampus. *Mol. Brain Res*, 13 : 199-206, 1992.
- Kinoshita, A., Yamada, K., Kohmura, F., Hayakawa, T. Effect of astrocyte-derived factors on ischemic brain edema induced by rat MCA occlusion. *APMIS*, 98 : 851-857, 1990.
- Lazarides, E. Intermediate filaments: A chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. *Ann Rev. Biochem*, 51 : 219-250, 1982.
- Makram Girgis., Wang Shih-Chang. A NEW STEREOTAXIC ATLAS OF THE RABBIT BRAIN. WARREN H. GREEN, INC. : 3-68, 1981.
- Mathewson, A.J. Berry, M. Observations on the astrocyte response to a cerebral stab wound in adult rats. *Brain Res*, 327 : 61-69, 1985.
- Miyake, T., Hattori T., Fukuda, M., Kitamura, T., Fujita, S. Quantitative studies on proliferative changes of reactive astrocytes in mouse cerebral cortex. *Brain Res*, 451 : 133-138, 1988.
- Nathansiel, E.J.H., Nathaniel, D.R. The reactive astrocyte. *Adv. Cell Neurobiol*, 2 : 249-301, 1981.
- Norenberg, MD. Astrocytes responses to CNS injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*, 53 : 213-220, 1994.
- Norton, W.T., Aquino, D.A., Hozumi, I., Chiu, F.C., Broanan, C.F. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochem. Res*, 17 : 877-885, 1992.
- O'Callaghan, JP., Brinton, R., McEwen, BS. Glucocorticoids regulate the synthesis of glial

fibrillary acidic protein in intact and adrenalectomized rats but do not affect its expression following brain injury. J. Neurochem, 57 ; 860-869, 1991.

Petito, C.K., Babiak, T. *Early proliferative changes in astrocytes in post-ischemic noninfarcted rat brain.* Ann. Neurol, 11 ; 510-518, 1982.

Reier, P.J., Stensaas, L.J., Guth, L. *The astrocytic scar as an impediment to regeneration in the central nervous system.* In: Kao, cc., Bunge, RP., Reier, PJ., eds. Spinal cord reconstruction. New York: Raven Press ; 163-198, 1983.

Ridet, J.L., Malhotra, SK., Privat, A., Gage, F.H. *Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function.* Trends Neurosci, 20 ; 570-577, 1997.

Schwab, M.E. *Myelin-associated inhibitors of neurite growth.* Exp. Neurol, 109 ; 2-5, 1990.

Stensaas, L.J., Partlow, LM., Burgess, PR., Horch, KW. *Inhibition of regeneration: the ultrastructure of reactive astrocytes and abortive axon terminals in the transition zone of the dorsal root.* Prog. Brain Res, 71 ; 457-468, 1987.

Topp, KS., Faddis, BT., Vijayan, VK. *Trauma-induced proliferation of astrocytes in the brains of young and aged rats.* Glia, 2 ; 201-211, 1989.

Vijayan, V.K., Lee, Y.I., Eng, L.F. *Increase in glial fibrillary acidic protein following neural trauma.* Mol. Chem. Neuropathol, 13 ; 107-118, 1990.

Wai-mui Cheung, Chien-kai Wang, Jon-Son Kuo and Teng-nan Lin. *Change in the Level of Glial Fibrillary Acidic Protein(GFAP) after Mild and severe Focal Cerebral Ischemia.* Chinese Journal of Physiology, 42(4) ; 227-235, 1999.

Wu, V.W., Schwatz, J.P. *Cell culture models for reactive gliosis: new perspectives.* J. Neurosci. Res, 51 ; 675-681, 1998.