

실험 쥐 해마조직배양에서 전자기 자극이 신경조직발생 및 증식에 미치는 영향

성균관대학교 의과대학 강북삼성병원 소아과, 중앙대학교 의과대학 소아과학교실*

김덕수 · 최응상* · 채수안*

Effects of electromagnetic stimulation on neurogenesis and neuronal proliferation in rat hippocampal slice culture

Deok-Soo Kim, M.D., Eung Sang Choi, M.D.* and Soo Ahn Chae, M.D.*

Department of Pediatrics, Kangbuk Samsung Hospital,
Sungkyunkwan University School of Medicine,
Department of Pediatrics*, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, Korea

Purpose : Transcranial electromagnetic stimulation(TMS) is a noninvasive method which stimulates the central nervous system through pulsed magnetic fields without direct effect on the neurons. Although the neurobiologic mechanisms of magnetic stimulation are unknown, the effects on the brain are variable according to the diverse stimulation protocols. This study aims to observe the effect of the magnetic stimulation with two different stimulation methods on the cultured hippocampal slices.

Methods : We obtained brains from 8-days-old Spague-Dawley rats and dissected the hippocampal tissue under the microscope. Then we chopped the tissue into 450 μm thickness slices and cultured the hippocampal tissue by Stoppini's method. We divided the inserts, which contained five healthy cultured hippocampal slices respectively, into magnetic stimulation groups and a control group. To compare the different effects according to the frequency of magnetic stimulation, stimulation was done every three days from five days in vitro at 0.67 Hz in the low stimulation group and at 50 Hz in the high stimulation group. After N-methyl-D-aspartate exposure to the hippocampal slices at 14 days in vitro, magnetic stimulation was done every three days in one and was not done in another group. To evaluate the neuronal activity after magnetic stimulation, the NeuN/ β -actin ratio was calculated after western blotting in each group.

Results : The expression of NeuN in the magnetic stimulation group was stronger than that of the control group, especially in the high frequency stimulation group. After N-methyl-D-aspartate exposure to hippocampal slices, the expression of NeuN in the magnetic stimulation group was similar to that of the control group, whereas the expression in the magnetic non-stimulation group was lower than that of the control group.

Conclusion : We suggest that magnetic stimulation increases the neuronal activity in cultured hippocampal slices, in proportion to the stimulating frequency, and has a neuroprotective effect on neuronal damage. (Korean J Pediatr 2006;49:558-564)

Key Words : Electromagnetic stimulation, Hippocampal slice culture, NeuN expression, N-methyl-D-aspartate

서론

본 논문은 2003년도 중앙대학교 업적 우대 교수 연구비 지원에 의해 수행되었음.

접수 : 2005년 11월 11일, 승인 : 2006년 1월 13일
책임저자 : 채수안, 중앙대학교 의과대학 소아과학교실

Correspondence : Soo Ahn Chae, M.D.
Tel : 02)6299-1475 Fax : 02)814-4920
E-mail : kidbrain@korea.com

경두개 전자기 자극법(transcranial electromagnetic stimulation, TMS)은 일정 시간마다 변동되는 자기장으로 인해 전도체 주변에서 전기적 흐름이 발생하게 되는 현상을 응용한 것으로 중추신경계 질환의 치료나 연구에 이용되고 있는 비침습적 자극

방법이다¹⁾. 이러한 전자기 자극의 과학적 원리는 1831년 Faraday에 의해 밝혀졌는데, 코일에 단순히 자석을 넣었다 뺐다 함으로써 도선에 전류가 흐를 수 있다는 사실을 발견하였고, 그 후 이 현상에 대한 연구가 많지 않았으나, 1965년 Bickford와 Fremming이 500 Hz의 감쇄 자기장(damped sinusoidal magnetic field)에 의해 유도된 전류로 사람과 동물에서 근육 수축이 발생하는 것을 보고하였다²⁾. 1985년에 전자기 자극기를 이용하여 처음으로 사람의 뇌를 자극하여 양손 근육의 수축이 발생하였다는 연구가 발표되었으며¹⁾, 중추 신경계 질환에서의 연구는 다발성 경화증 환자에서 처음 수행되었었는데, 전자기 자극 후 운동 신경 전달이 지연되는 것을 관찰할 수 있었다³⁾. 신경계와 운동계에서의 전자기 자극법에 대한 연구를 시작으로 하여 정신 질환에서 전기 경련 요법(electroconvulsive therapy)과 대등한 효과를 보이면서도 통증이 없고 직접적 세포 손상이 없다는 사실이 알려지면서 여러 정신 질환이나 신경 질환 분야에서 치료 도구로 이용되고 있다^{2, 4)}. 또한 전자기 자극을 응용하여 대뇌에서의 운동 경로와 언어, 기억, 감정, 시각 등과 연관된 뇌피질 영역에 대한 지도화(functional cortical mapping)가 가능하게 되는 등 중추 신경계 연구에서의 활용 영역이 확대되고 있다^{2, 4-6)}.

TMS의 한 변형인 반복적 경뇌 전자기 자극법(repetitive TMS, rTMS)은 TMS를 약 50 Hz 정도까지의 다양한 주파수 대역에서 수초동안 반복적인 자극을 주는 방법으로 인지 과정을 연구하는데 이용되고 있을 뿐 아니라 여러 질환에서 치료법으로 응용되고 있다⁶⁾. 즉, 우울증^{7, 8)}, 강박장애⁹⁾, 외상 후 스트레스 장애¹⁰⁾, 정신분열증¹¹⁾ 등의 여러 정신 질환과 파킨슨병¹²⁾, 편두통 등의 신경 질환에서 치료 효과를 보이고 있다^{6, 13, 14)}.

최근의 연구들은 TMS의 효과 뿐 아니라 그 작용기전을 밝히는데 초점을 두고 있으며 아직까지는 명확하게 알려져 있지 않지만, glial fibrillary acidic protein(GFAP), 도파민, 아미노산, 조기 발현 유전자, β -adrenergic receptor 등이 전자기 자극의 신경생물학적인 기전에 관여하는 것으로 알려져 있다.

기관형적 절편 배양(organotypic slice culture)은 Gähwiler^{15, 16)}에 의해 도입되었는데 그 배양법으로는 크게 roller-tube cultures, membrane(or interface) cultures, petri dish cultures 등 3가지 방법이 있다. 이 중에서 Stoppini 등¹⁷⁾이 개발한 interface cultures 방법은 조작이 용이하고 반 3차원 입체 구조(semi-three-dimensional structure)가 필요할 경우 이용될 수 있으며 배양 과정 중 전 단계 동안 조직 관찰이 가능하다. 또한, 형태학적 연구에 있어 조직을 절단하거나 군집성 극과(population spikes)와 같은 복합 신호(compound signals)에 대한 기록이 필요한 연구 뿐 아니라 많은 양의 조직이 필요한 생화학적 연구에서도 이용될 수 있다¹⁸⁾.

이에 본 연구에서는 Stoppini 등¹⁷⁾에 의한 기관형적 절편 배양 방법을 통하여 얻은 해마 조직 절편에서 전자기 자극에 따른 신경 세포에 대한 영향과 N-methyl-D-aspartate(NMDA)로 유도된 신경 세포 손상 후에 전자기 자극이 세포 보호 효과를

갖는지 여부를 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 실험쥐 해마부위 조직배양

생후 8일된 실험쥐(Sprague-Dawley rats)의 두피를 알코올로 소독한 후 손상 없이 빠르게 대뇌를 적출하였다. 적출한 대뇌를 얼음이 채워진 petri dish로 옮긴 후 찬 dissection media (GBSS; Gey's balanced salt solution)를 점적한 후, dissection microscope하에서 양쪽 해마 부위를 분리하고 tissue chopper를 이용하여 450 μ m 두께로 절편을 만들었다. 이 중에서 손상이 없는 좋은 절편만을 선택하여 36°C의 Gähwiler's media[50% basal media eagle, 25% Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco/BRL Life Technologies, USA), 25% heat inactivated horse serum, 6.5 mg/mL D-glucose, 1 mM glutamine, pH 7.3] 1 mL가 담겨진 6 well plates의 porous membrane inserts (30 mm diameter, Millicell-CM)로 옮겼다. 1개의 insert에는 5-6개의 해마 절편을 위치시켜 놓았다. 이 후 절편이 들어있는 6 well plates를 36°C의 humidified CO₂ incubator에서 배양하고 3일마다 배양액을 교환해 주면서 해마 조직의 생존 여부를 파악하였다(Fig. 1). 이 모든 과정은 horizontal flow hood에서 무균적 기법으로 시행되었다.

2. 주파수에 따른 전자기 자극

실험군을 고주파 전자기 자극군과 저주파 전자기 자극군으로 구분하여 전자기 자극을 가하였고 전자기 자극을 가하지 않은 대조군과 비교 분석을 하였으며, 실험군과 대조군에는 각각 5개

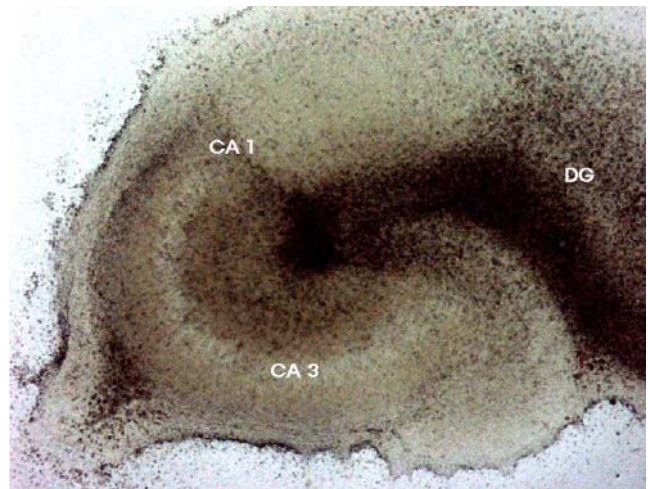


Fig. 1. This shows an organotypic slice culture of rat hippocampus at 6 days in vitro(light microscope, $\times 50$). This was prepared from 8-day-old rat pup. The dissection of hippocampus was done soon after sacrifice and the hippocampal slices were transferred to CO₂ incubator. CA1: cornu ammonis 1, CA2: cornu ammonis 2, DG: dentate gyrus.

의 건강한 해마절편이 포함되도록 하였다. 전자기 자극은 고주파 전자기 자극을 위해 최대자장강도가 1.4 tesla이고, 자극 주파수가 1-50 Hz인 BioCon-2000 (Mcube Technology Co.)을 이용하여 코일의 경계부에서 1 cm 거리에 배양된 해마조직을 접근시킨 후, 최대 출력의 50%에서 50 Hz로 3분간 자극하는 방법으로, 배양 5일째부터 3일 간격으로 6차례 전자기 자극을 가하였다. 또한, 저주파 전자기 자극을 위해서는 최대자장강도가 2 tesla이며 자극 주파수가 1 Hz 이하인 MES-10(Cadwell Laboratories, Inc., USA)을 사용하여, 위와 같은 방법으로 최대 출력의 50%에서 0.67 Hz로 전자기 자극을 가하였다.

3. NMDA 노출 유무와 전자기 자극

실험군을 NMDA 노출 후 전자기 자극을 가한 군과 NMDA 노출 후 전자기 자극을 가하지 않은 군으로 구분하였고 대조군은 NMDA 노출이나 전자기 자극을 가하지 않았다. 각각의 실험군과 대조군에 모두 5개의 건강한 해마절편이 포함되도록 하였다. 배양조직의 배지를 배양 14일에 100 μ M NMDA가 포함된 serum free media(SFM)로 교환한 후 CO₂ incubator에서 30분간 노출시키고, 다시 SFM로 30분간 CO₂ incubator에서 wash out한 다음 신선한 Gähwiler's media로 배지를 교환하여 배양하였다. 이후 전자기 자극군에는 배양 17일부터 전자기 자극을 3일 간격으로 3차례 가하였고 비자극군에는 전자기 자극을 시행하지 않았다.

4. NeuN 단백질 발현 측정

NeuN 단백질 발현을 관찰하기 위해 배양 제 23일에 조직을 임의로 선택하여 lysis buffer[120 mM NaCl, 40 mM Tris(pH 8.0), 0.1% NP40] 처리와 sonication 과정을 거쳐 단백질을 추출한 다음, 595 nm 파장에서 Bio-Rad protein assay kit(Bradford 정량법)를 이용하여 농도를 측정하고, 20 μ g 단백질을 loading하여 SDS-PAGE에서 분리한 후 transfer buffer[25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20%(v/v) methanol(pH 8.3)]에서 nitrocellulose membrane(Amersham)으로 이동시켜 western blotting을 실시하였다. 0.1% ponceau S(Sigma)로 염색하여 단백질의 전기영동 상태를 관찰하고, PBS(phosphate buffered saline, pH 8.0)로 여러 번 씻어 ponceau S를 제거하였다. Membrane을 5% non fat dry skim milk가 포함된 PBS-T (PBS에 0.2% tween-20 첨가)의 blocking buffer에 넣어 1시간 동안 반응시켰다. NeuN 단백질 발현을 알아보기 위해 항체(Chemicon, USA)를 1:1,000으로 희석하여 4시간 반응시킨 후, PBS-T로 20분씩 세 번 세척하고, 1:2,000으로 희석한 HRP-conjugated secondary antibody(DAKO, USA)와 1시간 반응시킨 후, enhanced chemiluminescence system을 이용하여 발현된 단백질을 관찰하였다. β -actin 단백질의 발현을 알아보기 위해서 1:5,000으로 희석한 mouse anti-actin antibody(Sigma, Korea)를 일차항체로, 이차항체로는 1:3,000으로 희석한 HRP-

conjugated antimouse-IgG antibody (DAKO, USA)를 사용하였다. Scion Image (Beta 4.02 version)을 이용하여 각각 NeuN과 β -actin 단백질의 band의 densitometry 값을 구하고 β -actin에 대한 NeuN 농도의 비를 구하였다.

5. 통계분석

NeuN과 β -actin 단백질의 발현정도의 비를 산출한 후 Student t-test를 이용하여 대조군과 저주파 자극군, 고주파 자극군의 비교와 대조군과 NMDA 자극 후 전자기 자극군과 비자극군의 비교를 시행하였다.

결 과

1. 고주파와 저주파 전자기 자극 후 NeuN 단백질 발현의 변화

전자기 자극을 가한 후 NeuN의 발현을 관찰하기 위해 각 실험군에서 5개의 절편을 얻어 western blotting을 시행한 결과 48 kDa와 66 kDa의 band가 관찰되었는데 대조군에 비해서 전자기 자극군에서 band가 강한 것을 알 수 있었다. 이런 현상은 저주파 자극군보다 고주파 자극군에서 현저하게 나타났다(Fig. 2). 또한, 신경 조직의 양에 따라 일정하게 발현되는 β -actin 단백질 발현에 대한 NeuN 단백질 발현의 비를 구하여 각 군에서 비교하였을 때, 대조군 1.01 \pm 0.27, 고주파 자극군 1.27 \pm 0.17, 저주파 자극군 1.12 \pm 0.14로 관찰되었으며, 대조군에 비해 고주파 자극군에서의 NeuN 단백질 발현의 비가 통계적으로 의미있게 증가되어 있었으나 저주파 자극군에서는 대조군에 비해 통계적으로 의미는 없었다(Fig. 3).

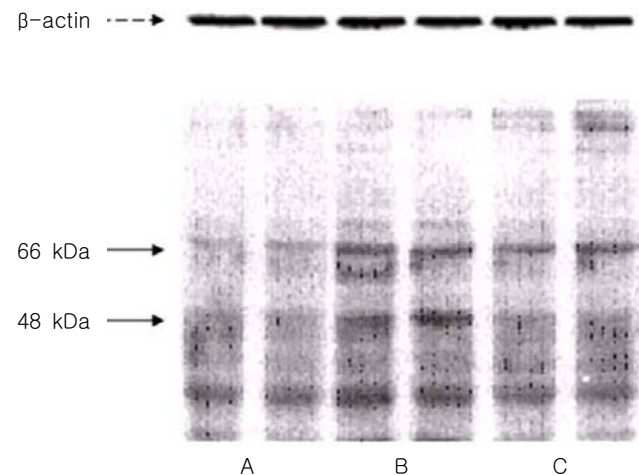


Fig. 2. These findings are the results of western blotting in the high frequency and the low frequency stimulation group. Three bands mean β -actin(broken arrow) and two NeuN bands of 66 kDa and 48 kDa(line arrows). The NeuN bands of the high frequency magnetic stimulation group (B) are broader than those of the low frequency magnetic stimulation group (C) or the control group (A).

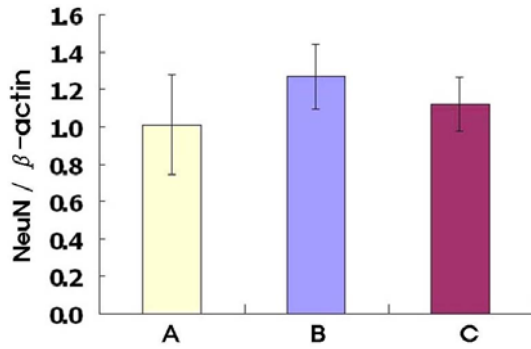


Fig. 3. NeuN/ β -actin ratio of each group is as follows; control group (A), high frequency magnetic stimulation group (B) and low frequency magnetic stimulation group (C). The ratio of the high frequency magnetic stimulation group(B; 1.27 ± 0.17) is higher than that of the control group(A; 1.01 ± 0.27) ($P=0.036$). The ratio of the low frequency magnetic stimulation group(C; 1.12 ± 0.14) is also higher than that of the control group, but the difference is not statistically significant($P=0.190$).

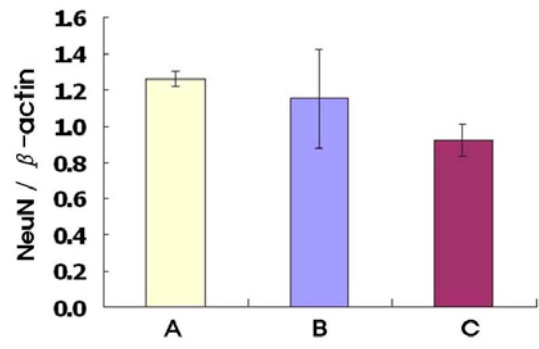


Fig. 5. NeuN/ β -actin ratio of each group is as follows; control group (A), magnetic stimulation group (B) and magnetic non-stimulation group (C) after NMDA exposure. The ratios of two groups after NMDA exposure(B; 1.15 ± 0.27 , C; 0.92 ± 0.09) are lower than that of the control group(A; 1.26 ± 0.04). The difference between A and C is statistically significant($P=0.006$), whereas the difference between A and B is not significant($P=0.138$).

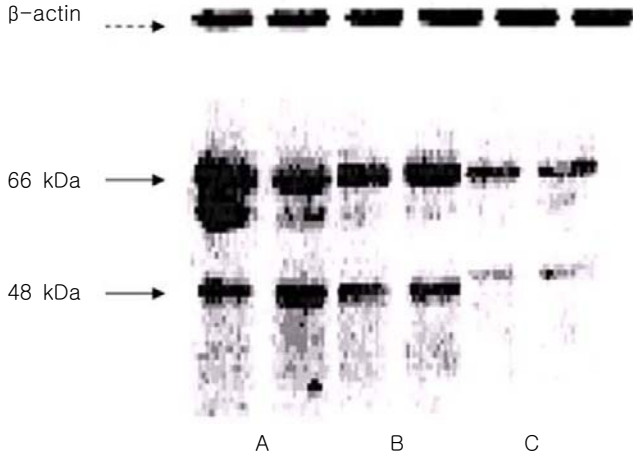


Fig. 4. These findings are the results of western blotting in the magnetic stimulation and the magnetic non-stimulation group after the exposure to NMDA. This shows three bands; β -actin(broken arrow) and two NeuN bands of 66 kDa and 48 kDa(line arrows). The NeuN bands of the magnetic stimulation group after NMDA exposure (B) are broader than those of the non-magnetic stimulation group after NMDA exposure (C). The bands of both groups are thinner than those of the control group (A).

2. NMDA 노출 후 NeuN 단백질 발현의 변화

NMDA 노출 후 전자기 자극을 가한 군과 가하지 않은 군에서의 NeuN 단백질 발현을 알아보기 위해 western blotting을 시행했고 대조군에 비해서 NMDA 노출 후의 두 실험군에서 band가 약한 것을 알 수 있었으며, 전자기 비자극군에서 더 많이 감소하였다(Fig. 4). 또한, β -actin 단백질 발현에 대한 NeuN 단백질 발현의 비를 구하여 각 군에서 비교하였는데, NMDA 노출 후 전자기 자극군은 1.15 ± 0.27 이었고 NMDA 노출 후 전자기 비자극군은 0.92 ± 0.09 이었던 반면, 대조군은 1.26 ± 0.04 로 두 실험군

에 비해 β -actin 단백질 발현에 대한 NeuN 단백질 발현의 비가 높았다. 즉, NMDA 노출 후 전자기 비자극군에서의 NeuN 단백질 발현이 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 낮았으나 전자기 자극군에서는 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 5).

고 찰

변조 자기장(pulsed magnetic field)을 이용하여 사람의 운동 피질을 직접 자극하는 기법이 알려진 이후 TMS는 중추 및 말초 신경계에 대한 여러 연구 및 치료에서 이용되고 있다. 뇌피질에 대한 전자기 자극은 전기 경련 자극법에 비해 통증이 없고 침습적이지 않으며 사용하기 쉽고 자극판을 두피에 직접 접촉시킬 필요가 없는 장점이 있다. 특히, 전자기 자극은 전류에 저항적인 두피나 두개골을 쉽게 통과할 수 있어 효과적으로 뇌피질을 자극할 수 있다¹⁾. 또한 rTMS는 여러 정신병이나 신경 질환의 치료법으로 사람의 대뇌에서 뇌세포에 대한 직접적인 자극을 주지 않는 것으로 알려져 있다. 그 작용 기전이나 치료를 위한 적절한 자극 방법에 대한 연구들이 수행되고 있기는 하나 아직까지 정확한 신경생물학적인 기전을 모르고 있으며 최적의 자극 강도나 기간, 자극 주파수, 총 자극 횟수 등에 대한 공통된 기준이 없다⁸⁾.

본 연구에서는 Stoppini 등¹⁷⁾의 방법에 근거하여 해마 절편 조직을 얻어 약 20여일 동안 배양을 하면서 실험을 수행하였고, 두 다른 주파수에서의 효과와 신경독성물질을 주입한 후 신경원 손상 정도에 미치는 영향 등을 분석하고 이전의 여러 연구들과 비교 검토하였다.

Mullen 등¹⁹⁾은 대부분의 신경원 핵과 세포체에서 발현되는 반면 아교세포에서는 발현되지 않는 신경세포 특이성 핵 단백질을 발견하여 NeuN(neuronal nuclei)이라고 하였는데, 이것은 전사인자의 역할 이외에 신경세포에 대한 일반적인 표지자(univer-

sal marker)로 이용될 수 있다. NeuN의 발현은 신경세포가 완전히 발달이 이루어지기 전까지는 미성숙한 신경세포의 핵에서 일어나지 않을 수 있다²⁰. Actin은 최소 8가지의 isoform이 존재하며 각각의 actin isoform의 발현 조절 기전이나 기능적 중요성에 대해서는 아직 잘 모르나, 이 중에서 β -actin은 배양 뇌세포에서도 발현되며 배양 기간 동안 그 발현 정도가 일정하게 유지된다고 한다²¹. 본 연구에 이용된 기관형적 해마 절편조직은 배양 14일부터 실험에 이용되었고 NeuN의 발현을 관찰하여 그 발현 정도를 β -actin 발현 정도와 비교하였다.

최근 연구들에 의하면 GFAP, dopamine 등이 전자기 자극의 신경생물학적인 기전에 관여하며 단기 및 장기 자극에 따라 나타나는 현상이 다르다는 것이 밝혀지고 있는데, 단기 자극 후 초기 발현 유전자, 도파민, arginine vasopressin(AVP), 아미노산 등의 농도가 변한다고 한다. 또한, 전자기 자극(2초 동안 25 Hz의 주파수에서 자극)이 전기 경련 요법과는 다른 양상으로 c-Fos나 c-Jun 등의 단백질과 mRNA 발현을 유도하며, 하루주기 리듬(circadian rhythm)에 관여하는 뇌 영역과 시상(thalamus)의 뇌실결핵(paraventricular nucleus)에서 신경 세포 반응이 강하게 나타난다고 한다²². Kole 등²³은 한번의 전자기 자극(3초 동안 20 Hz의 주파수에서 자극) 후 24시간에 측정된 NMDA와 high affinity serotonin receptor subtype 1A(5-HT1A)의 결합부위가 뇌의 특정 영역에서 증가된다고 하였다. 이것은 한번의 rTMS 자극으로도 24시간이 경과한 상태에서 5-HT와 NMDA 수용체 특성의 선택적 변화가 유발된다는 것을 증명함으로써 신경생화학적 시냅스 전달이 전자기 자극의 작용기전에 관여함을 보여준 것이다. 또 다른 연구에서는 2.5초 동안 20 Hz의 주파수에서 2분 간격으로 20회의 전자기 자극 후 시상하부의 뇌실결핵에서 AVP 분비가 감소되고 taurine, serine, aspartate 등의 아미노산은 증가한 반면, glutamate, glutamine, arginine, γ -aminobutyric acid 등은 변화가 없었으며, 등쪽 해마(dorsal hippocampus)에서는 dopamine 분비 증가가 관찰되었으나, serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, norepinephrine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid 등의 농도는 변하지 않았다고 하였다. 이러한 결과는 전자기 자극이 뇌의 여러 영역에서 선택적으로 신경전달물질(neurotransmitter)과 신경조절물질(neuromodulator) 체계에 대한 조절효과를 갖고 있음을 시사한다²⁴.

rTMS의 장기 자극 후 시행된 연구들에서도 단기 자극 연구에서와 유사한 결과가 관찰되고 있다. 2초 동안 25 Hz의 주파수에서 9일 연속으로 시행된 장기 자극으로 인해 대뇌 피질의 β -adrenergic receptor가 하향 조절되어 항우울 효과를 보이며²⁵, 실험쥐의 뇌에서 10초 동안 25 Hz로 1-30회의 반복 자극을 가하였을 때 GFAP mRNA 발현의 증가가 관찰되는 것으로 보아 rTMS가 별아교세포의 유전자 발현을 조절함으로써 신경계 손상 후 일어나는 반응 과정과 유사한 결과를 보인다고 하였다²⁶. 또 다른 연구에서는 실험쥐 뇌의 특정 영역에서 신경영양인자(neurotrophic factor)와 cholecystokinin의 발현이 증가하고²⁷,

대뇌 monoamine의 농도와 수용체 및 대사전환에 있어 선택적이고 특징적인 변화를 초래한다고 하였다^{28, 29}. 이러한 rTMS의 장기 자극에 의한 신경생화학적 효과는 신경세포의 생존 유도에 의해 이루어지는 것이 아니라 신경세포에 대한 산화 스트레스의 유해한 영향을 감소시켜서 신경세포 보호효과를 보이는 것이며, 전자기 자극에 의한 신경세포 손상 유발은 없다고 알려져 있다³⁰. 이렇듯 다양한 전자기 자극 방법에 따라 중추신경계에서 여러 신경내분비계, 신경조절물질, 신경영양인자 등의 변화를 초래하고 각기 다른 경로를 통하여 정신신경계에 영향을 미치는 것으로 이해할 수 있다.

이전의 연구들이 신경조절물질이나 신경계에 관여하는 아미노산 등에 대한 전자기 자극의 영향에 대해 생체 동물을 대상으로 수행되었던 반면, 본 연구에서는 조직 배양을 시행하여 얻은 해마조직의 신경원에 대한 직접적인 영향을 알아보고자 하였고 NeuN 단백질의 발현량을 측정하여 분석하였다. 전자기 자극 후 NeuN 단백질의 발현에 관한 이전의 연구 중에서 Arias-Carrión 등³¹은 경뇌 전자기 자극으로 신경발생이 유도되어 NeuN의 발현이 증가하였다고 하였으며, Funamizu 등³²의 연구에서도 뇌 병변이 있던 실험쥐에서 단기 전자기 자극으로 NeuN의 발현이 증가되었다고 보고하였다. 이와 유사하게 본 연구에서도 전자기 자극을 가한 군에서 대조군에 비해 NeuN 단백질의 발현이 증가한 것을 알 수 있었는데, 이는 전자기 자극이 신경세포를 손상시키지 않고 오히려 세포의 증식을 유도하는 것이라고 생각할 수 있다. 더군다나 저주파 전자기 자극보다 고주파 전자기 자극의 경우에서 그 발현량이 많아 높은 주파수에서 세포 증식 효과가 크다고 할 수 있다. 또한 NMDA 노출 후 전자기 비자극군에서 대조군에 비해 NeuN 단백질의 발현이 유의하게 적었으나 전자기 자극군의 경우에는 비자극군에 비해 그 발현이 보다 크고 대조군과 비교하였을 때에도 NeuN 단백질 발현의 차이가 없었던 것으로 보아 NMDA 노출 후 신경원의 손상이 발생하였으나 전자기 자극으로 그 손상이 회복되었다는 것을 의미한다고 할 수 있다.

1 Hz의 저주파수 rTMS를 이용한 국내 연구 중에서는 정신분열증 환자에서 치료 불응을 보이는 환청에 대해 효과가 있었고³³, 저주파수 자극으로 국소적인 신경망의 비동기화가 유도되어 신경 흥분성이 나타나는 질병 치료에 이용될 수 있을 것이라고 하였다³⁴. 또한, 저주파수의 전자기 자극으로 뇌피질 영역에서 세포 억제 효과가 관찰되고 고주파수의 자극은 뇌세포의 흥분성을 증가시킨다고 하였지만^{35, 36}, 본 연구에서는 저주파와 고주파 전자기 자극을 가한 후 신경원 세포의 활성도를 파악한 결과 저주파와 고주파 전자기 자극군에서 대조군에 비해 모두 신경원 활성도가 증가하였다. 즉, 이전의 연구와는 달리 고주파수 전자기 자극에서도 세포의 손상이 발생하지 않고 오히려 NeuN 활성도가 크게 증가하였을 뿐 아니라, 저주파수 전자기 자극군에서보다 크게 증가한 것을 알 수 있었다.

결론적으로 본 연구에서는 이전의 연구들과 달리 전자기 자극

의 신경원에 대한 직접적인 영향을 알아보고 전자기 자극 후 NeuN 단백을 측정하였으며 약물로 인한 신경손상 후에 세포보호효과가 나타나는지 여부를 살펴본 결과 전자기 자극, 특히 고주파 전자기 자극이 신경세포 증식과 손상 후 세포보호효과를 유도한다는 것을 확인할 수 있었다.

요 약

목적 : 경뇌 전자기 자극법은 변조 자기장을 이용하여 뇌세포에 대한 직접적인 영향을 주지 않으면서 중추 신경계를 자극할 수 있는 비침습적인 방법이다. 이전의 연구들은 대부분 생체동물을 대상으로 수행되어져 왔으며 배양 조직에서의 연구는 별로 이루어진 바 없다. 이에 본 연구에서는 배양된 해마 절편에서 다른 주파수의 전자기 자극이 신경원에 미치는 영향과 약물에 의한 세포 손상 후 전자기 자극의 세포보호효과 여부에 대해 알아보고자 하였다.

방법 : 생후 8일된 실험쥐의 대뇌를 적출하여 dissection microscope 하에서 양쪽 해마 부위를 분리하고 tissue chopper를 이용하여 450 μm 두께로 절편을 만든 후 Stoppini가 고안한 방법대로 배양을 시행하였다. 각각 5개의 건강한 해마 절편이 포함된 inserts를 선택하고, 전자기 자극군에 대해 0.67 Hz와 50 Hz의 주파수로 각각 배양 5일부터 3일 간격으로 6차례 전자기 자극을 가하였다. 또한, 배양 제 14일에 inserts 2개에 100 μM NMDA에 노출시키고 3일 후부터 3일 간격으로 insert 1개에 전자기 자극을 3차례 시행하였고 다른 1개의 insert와 대조군에는 자극을 가하지 않았다.

결과 : 전자기 자극 후 신경원의 활성도를 알아보기 위해 NeuN 단백 발현을 western blotting을 이용하여 측정한 후 β -actin 단백 발현과의 비를 얻어 각 군에서 비교 분석하였다. 대조군(1.01 ± 0.27)에 비해 전자기 자극군에서 NeuN의 발현이 증가되어 있었으며, 특히 저주파 자극군(1.12 ± 0.14)에서보다 고주파 자극군(1.27 ± 0.17)에서 현저하였고 고주파 자극군에서는 대조군에 비해 통계적으로 유의한 증가를 보였다($P < 0.05$). 또한, NMDA 노출 후 실험군(전자기 자극군: 1.15 ± 0.27 , 전자기 비자극군: 0.92 ± 0.09)에서 대조군(1.26 ± 0.04)에 비해 NeuN 발현이 감소되었으나 전자기 비자극군에서 더 많이 감소한 것을 알 수 있었다.

결론 : 배양된 해마조직의 신경세포에 대한 전자기 자극은 저주파 자극군에 비해 고주파 자극군에서 대조군보다 통계적으로 유의한 수준의 NeuN 발현의 증가를 관찰할 수 있었고, NMDA 노출 후 전자기 자극을 가한 군에서 대조군보다 NeuN 발현 감소가 관찰되기는 하였으나 고주파 자극군에서는 통계적으로 유의하지 않은 정도였던 것으로 보아 전자기 자극이 신경원 활성을 증가시켜 신경세포의 발생 및 증식을 유도하며 세포 손상에 대한 신경보호효과도 보인다는 것을 알 수 있었다. 따라서 전자기 자극은 여러 신경 질환에 있어서 치료적 역할을 할

수 있는 가능성이 있다고 사료된다.

References

- 1) Barker AT, Jalinous R, Freeston IL. Non-invasive magnetic stimulation of human motor cortex. *Lancet* 1985;1:1106-7.
- 2) Barker AT. An introduction to the basic principles of magnetic nerve stimulation. *J Clin Neurophysiol* 1991;8:26-37.
- 3) Barker AT, Freeston IL, Jalinous R, Jarratt JA. Magnetic stimulation of the human brain and peripheral nervous system: an introduction and the results of an initial clinical evaluation. *Neurosurgery* 1987;20:100-9.
- 4) Gates JR. Transcranial magnetic stimulation. *Neuroimaging Clin N Am* 1995;5:711-20.
- 5) Jennum P, Friberg L, Fuglsang-Frederiksen A, Dam M. Speech localization using repetitive transcranial magnetic stimulation. *Neurology* 1994;44:269-73.
- 6) George MS, Wassermann EM, Post RM. Transcranial magnetic stimulation: a neuropsychiatric tool for the 21st century. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1996;8:373-82.
- 7) George MS, Wassermann EM, Williams WA, Callahan A, Ketter TA, Basser P, et al. Daily repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) improves mood in depression. *Neuro Report* 1995;6:1853-6.
- 8) Pascual-Leone A, Rubio B, Pallardo F, Catala MD. Rapid-rate transcranial magnetic stimulation of left dorsolateral prefrontal cortex in drug-resistant depression. *Lancet* 1996; 348:233-7.
- 9) Greenberg BD, George MS, Martin JD, Benjamin J, Schlaepfer TE, Altemus M, et al. Effect of prefrontal repetitive transcranial magnetic stimulation in obsessive-compulsive disorder: a preliminary study. *Am J Psychiatry* 1997;154:867-9.
- 10) McCann UD, Kimbrell TA, Morgan CM, Anderson T, Geraci M, Benson BE, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation for posttraumatic stress disorder. *Arch Gen Psychiatry* 1998;55:276-9.
- 11) George MS, Lisanby S, Sackeim HA. Transcranial magnetic stimulation. *Arch Gen Psychiatry* 1999;56:300-11.
- 12) Mally J, Stone TW. Improvement in Parkinsonian symptoms after repetitive transcranial magnetic stimulation. *J Neurol Sci* 1999;162:179-84.
- 13) Post A, Keck ME. Transcranial magnetic stimulation as a therapeutic tool in psychiatry: what do we know about the neurobiological mechanisms?. *J Psychiatr Res* 2001;35:193-215.
- 14) Wassermann EM, Lisanby SH. Therapeutic application of repetitive transcranial magnetic stimulation: a review. *Clin Neurophysiol* 2001;112:1367-77.
- 15) Gähwiler BH. Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 1981;4:329-42.
- 16) Gähwiler BH. Slice cultures of cerebellar, hippocampal and hypothalamic tissue. *Experientia* 1984;40:235-43.
- 17) Stoppini L, Buchs PA, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 1991;37:173-82.
- 18) Gähwiler BH, Capogna M, Debanne D, McKinney RA,

- Thompson SM. Organotypic slice cultures : a technique has come of age. *Trends Neurosci* 1997;20:471-7.
- 19) Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 1992;116:201-11.
 - 20) Sarnat HB, Nochlin D, Born DE. Neuronal nuclear antigen (NeuN) : a marker of neuronal maturation in the early human fetal nervous system. *Brain Dev* 1998;20:88-94.
 - 21) Abd-El-Basset EM. The effect of dibutyryl cyclic AMP on the expression of actin isoform in astroglia. *Histochem J* 2000;32:581-90.
 - 22) Ji RR, Schlaepfer TE, Aizenman CD, Epstein CM, Qiu D, Huang JC, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation activates specific regions in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:15635-40.
 - 23) Kole MHP, Fuchs E, Ziemann U, Paulus W, Ebert U. Changes in 5-HT1A and NMDA binding sites by a single rapid transcranial magnetic stimulation procedure in rats. *Brain Res* 1999;826:309-12.
 - 24) Keck ME, Sillaber I, Ebner K, Welt T, Toschi N, Kaehler ST, et al. Acute transcranial magnetic stimulation of frontal brain regions selectively modulates the release of vasopressin, biogenic amines and amino acids in the rat brain. *Eur J Neurosci* 2000;12:3713-20.
 - 25) Fleischmann A, Sternheim A, Etgen AM, Li C, Grisaru N, Belmaker RH. Transcranial magnetic stimulation downregulates beta-adrenoreceptors in rat cortex. *J Neural Transm* 1996;103:1361-6.
 - 26) Fujiki M, Steward O. High frequency transcranial magnetic stimulation mimics the effects of ECS in upregulating astroglial gene expression in the murine CNS. *Brain Res Mol Brain Res* 1997;44:301-8.
 - 27) Müller MB, Toschi N, Kresse AE, Post A, Keck ME. Long-term repetitive transcranial magnetic stimulation increases the expression of brain-derived neurotrophic factor and cholecystokinin mRNA, but not neuropeptide tyrosine mRNA in specific areas of rat brain. *Neuropsychopharmacology* 2000;23:205-15.
 - 28) Ben-Shachar D, Belmaker RH, Grisaru N, Klein E. Transcranial magnetic stimulation induces alterations in brain monoamines. *J Neural Transm* 1997;104:191-7.
 - 29) Ben-Shachar D, Gazawi H, Riboyad-Levin J, Klein E. Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation alters beta-adrenergic and 5-HT2 receptor characteristics in rat brain. *Brain Res* 1999;816:78-83.
 - 30) Post A, Müller MB, Engelmann M, Keck ME. Repetitive transcranial magnetic stimulation in rats : evidence for a neuroprotective effect in vitro and in vivo. *Eur J Neurosci* 1999;11:3247-54.
 - 31) Arias-Carrión O, Verdugo-Díaz L, Feria-Velasco A, Millán-Aldaco D, Gutiérrez AA, Hernández-Cruz A, Drucker-Colín R. Neurogenesis in the subventricular zone following transcranial magnetic field stimulation and nigrostriatal lesions. *J Neurosci Res* 2004;78:16-28.
 - 32) Funamizu H, Ogiue-Ikeda M, Mukai H, Kawato S, Ueno S. Acute repetitive transcranial magnetic stimulation reactivates dopaminergic system in lesion rats. *Neurosci Lett* 2005;383:77-81.
 - 33) Jung KH, Choi CS, Park JS, Lee KH, Hahm W, Lee SH, et al. Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation to temporoparietal cortex in patients with chronic schizophrenia with treatment-resistant auditory hallucinations. *J Korean Neuropsychiatr Assoc* 2004;43:546-51.
 - 34) Kim HJ, Lee M, Cho HJ, Park KD, Choi KG, Lee HW. Changes in neuronal activity after low frequency repetitive transcranial magnetic stimulation. *J Korean Neurol Assoc* 2005;23:627-34.
 - 35) Pascual-Leone A, Valls-Sole J, Wassermann EM, Hallett M. Responses to rapid-rate transcranial magnetic stimulation of the human motor cortex. *Brain* 1994;117:847-58.
 - 36) Yoo WK, Chung GI, Lee JH, Choi EH, Jun AY, Kim JC, et al. The effect of sub-threshold 1 Hz and 20 Hz repetitive transcranial magnetic stimulation on corticospinal excitability. *J Korean Acad Rehabil Med* 2003;27:922-7.