

신경근전기자극이 체중 부하를 제거한 신생 흰쥐 골격근 조직의 MEF2C 및 VEGF 발현에 미치는 영향

구현모
경운대학교 물리치료학과
이선민
재활공학서비스연구지원센터

Abstract

Influence of Neuromuscular Electrical Stimulation on MEF2C and VEGF Expression of Neonatal Rat Skeletal Muscle During Suspension Unloading

Hyun-mo Koo, Ph.D., P.T.

Dept. of Physical Therapy, Kyungwoon University

Sun-min Lee, M.Sc., P.T.

Assistive Technology Research & Assistance Center

The aim of this study was to identify the effect of suspension unloading (SU) and electrical stimulation upon the development of neonatal muscular system. For this study, the neonatal rats were randomly divided into three groups: a control group, an experimental group I, and an experimental group II. The SU for experimental group I and II was applied from postnatal day (PD) 5 to PD 30. The electrical stimulation for soleus muscle of experimental group II was applied from PD 16 to PD 30 using neuromuscular electrical stimulation (NMES), which gave isometric contraction with 10 pps for 30 minutes twice a day. In order to observe the effect of SU and ES, this study observed myocyte enhancer factor 2C (MEF2C) and vascular endothelial growth factor (VEGF) immunoreactivity in the soleus muscles at PD 15 and PD 30. In addition, the motor behavior test was performed through footprint analysis at PD 30. The following is the result. At PD 15, the soleus muscles of experimental group I and II had significantly lower MEF2C, VEGF immunoreactivity than the control group. It proved that microgravity conditions restricted the development of the skeletal muscle cells at PD 15. At PD 30, soleus muscles of the control group and experimental group II had significantly higher MEF2C, VEGF, immunoreactivity than experimental group I. It proved that the NMES facilitated the development of the skeletal muscle cells. At PD 30, it showed that SU caused the decrease in stride length of parameter of gait analysis and an increase in toe-out angle, and that the NMES decreased these variations. These results suggest that weight bearing during neonatal developmental period is essential for muscular development. They also reveal that NMES can encourage the development of muscular systems by fully supplementing the effect of weight bearing, which is an essential factor in the neonatal developmental process.

Key Words: Neuromuscular electrical stimulation; Skeletal muscle; Suspension unloading.

I. 서론

골격근 형성(skeletal myogenesis)은 체절형성(somitogenesis)의 개시 직후에 시작되어 발달기 및 출생 후 성장기에 걸쳐서 유발되는 증식 및 분화의 과정을 통해서 이루어지게 된다(Angelis 등, 1999). 출생 전 배아기 발달 과정(embryonic development) 동안에 중배엽으로부터 유래된 근육형성 전구세포(myogenic precursor cell)인 근육모세포(myoblast)는 증식 및 융합을 통해서 분화된 근관(myotube)을 형성하여 다핵성 근섬유로 분화된다(Rehfeldt 등, 2000). 흰쥐의 근육 형성은 일차적인 근섬유 형성이 이루어지는 배아기 12.5일까지의 첫 단계와 배아기 14.5일에 시작되어 신생 근육의 80%를 형성하는 두 번째 단계를 거치게 되고, 이러한 근육형성 과정에서는 MEF2(myocyte enhancer factor 2) family 및 MyoD family와 같은 전사인자들의 상호작용이 분화관련 유전자의 발현을 조절함으로써 근섬유의 분화를 유도한다(Kablar와 Rudnicki, 2002). MEF2C 및 이와 관련된 유전자들은 근육의 분화, 성숙, 기능의 유지에 있어서 중요한 역할을 할 뿐만 아니라, 출생 이후에도 미세중력 조건 하에서의 골격근 위축과 비대, 재생에 있어서 핵심적인 역할을 수행하고, 특히 근육에 주어지는 중력 부하에 따라 발현량이 변화되는 특성을 보인다(Yamakuchi 등, 2000). 또한, 골격근을 포함한 모든 장기의 발달 과정에서 혈관망의 발달은 필수적이다(Bacic 등, 1995). 혈관의 형성 수준은 다양한 정상적인 생리적 자극 및 병리적 조건과 관련된 VEGF(vascular endothelial growth factor)의 발현 수준과 상관관계를 나타낸다(Ogunshola 등, 2000). 혈관 투과성 인자로도 알려져 있는 VEGF는 배아형성기 및 성숙기 동안에 내피세포의 증식 및 내피세포들 사이의 상호작용을 조절함으로써 혈관의 형성과 유지에 중심적인 역할을 수행하는 혈관내피성장인자이다(Ishii 등, 2002).

출생 이후의 신생기 발달 과정에서 주어지는 정상적인 생리적 자극이나 장기적 훈련 및 신체적 탈조건화와 같은 다양한 조건들은 발달과정에서 다양한 구조적 및 기능적 변화를 유발시킬 수 있다. 흰쥐의 신생기 발달 과정에서 골격근 세포의 발달은 생후 3주 이내에 급격하게 이루어지게 된다(Kerai 등, 1995). 높은 가소성 특성을 지닌 골격근이 효율적인 작용을 수행하기 위해서는 이 시기 동안에 운동신경원에서 기인되는 정확한 신경조절 뿐만 아니라, 기능적 특성에 따른 개별 근육들

의 근섬유 분화가 선행되어야 한다. 골격근 세포의 성장과 생존은 신경 활동 및 외적 자극에 의해 영향을 받게 되고, 근육의 수축 기능과 근육의 유전자 발현이 조절된다. 즉, 수축성 활동이 증가되면 다양한 형태의 골격근 섬유들은 변화된 생리학적 요구에 적응하기 위하여 신속한 구조적, 기능적, 대사적 변화를 유발시킨다(Pette, 2002).

그러나 근육의 활동이 감소되거나 근육에 주어지는 부하가 제거되면 신경지배의 소실, 근육 성장의 감소, 근섬유 소실, 근섬유 분화과정의 변화와 같은 현상들이 초래될 수 있다(Caldwell과 Ridge, 1983; Greensmith 등, 1998). 특히 체중 부하가 제거된 환경에 대한 노출은 서근의 현저한 근위축(Inobe 등, 2002), 미토콘드리아 효소 활동의 감소(Caiozzo 등, 1996), 근형질의 변화(Leivo 등, 1998), Ca^{2+} 항상성의 변화(Zérath 등, 1998) 등과 같은 골격근 섬유에 대한 영향뿐만 아니라, 심혈관계 변화, 내분비 기능이상, 면역체계의 약화와 같은 다양한 생리학적 변화를 초래하고(Keil 등, 1992), 골형성 감소, 골질량 감소, 관절연골의 생역학적·생화학적 변화를 포함한 골격계의 전반적인 변화도 동반된다(Bastide 등, 2000; Sinha 등, 2002). 선행 연구의 결과에서 나타난 바와 같이, 신생 흰쥐의 운동 발달에 있어서 특정 기간 동안의 미세중력환경에 대한 노출은 골격근의 정상적 발달을 제한할 뿐만 아니라, 발달기 이후에도 영구적인 근육 기능의 제한을 초래할 수 있다(Mozdziak 등, 2000).

체중 부하를 제거한 조건에서 골격근 세포를 자극함으로써 신경근육계의 기능적 부하를 증가시키기 위하여 다양한 형태의 전기 자극이 이용될 수 있다. 전기 자극은 근력 및 근지구력 강화(Bélanger 등, 2000), 혈류량의 증가(Kaplan 등, 2002), 효소활동의 변화(Mercier 등, 1993), 신경 자극(Herbison 등, 1979), 신경근 연결부의 기능 강화(Vanderthommen 등, 2002), 통증의 감소(Glaser 등, 2001), 치유 촉진(Lee 등, 1993) 등의 다양한 목적을 위하여 특정 조직에 적용하게 되는데, 특히 신경근전기자극은 근위축의 방지, 관절가동범위의 증가, 근재교육, 근경직의 감소 등을 통해서 신체 기능을 향상시킬 목적으로 재활 영역에서 많이 이용된다(Wang 등, 2004). 즉 신경근육계의 활동이 감소된 조건에서 무부하로 인한 탈조건화를 예방 또는 감소시켜 정상적 운동 기능을 유지시킬 수 있도록 보조할 수 있다(Qin 등, 1997).

이러한 선행 연구의 결과들을 종합하면, 신생기 골격근의 발달 과정 동안에 적절한 체중 부하가 결핍되면 다양한 신경근육계의 구조적 및 기능적 변화가 초래되

므로, 적절한 중력 자극이 골격근의 발달과정에서 매우 중요함을 알 수 있다. 따라서 본 연구에서는 전기자극이 신생기 골격근의 정상 발달과정에 있어서 필수적인 외적 요소 중의 하나인 체중 부하를 보완할 수 있는지를 골격근 조직에 대한 면역조직화학적 표지물질의 발현 양상 및 운동행동학적 검사를 통해서 알아보려고 한다.

II. 연구방법

1. 실험동물

건강한 10마리의 자성 흰쥐로부터 태어난 생후 5일의 Sprague-Dawley계 웅성 신생 흰쥐 30마리를 실험에 이용하였다. 실험에 사용한 신생 흰쥐의 체중을 측정하여 평균체중에 근접한 동물만을 실험에 이용함으로써, 선천적인 발달 수준의 차이에 따른 오차를 최소화하였고, 육안적 관찰을 통해 신체적 기형이나 행동학적 이상을 나타내는 신생 흰쥐는 실험에서 제외시켰다. 실험동물은 실험과정에서 현수와 전기자극을 적용하지 않은 대조군, 현수만을 적용한 실험군 I, 현수와 전기자극을 적용한 실험군 II로 구분하여 각 군당 10마리씩 무작위 배정하여 실험을 진행하였다.

2. 실험적 처치

가. 현수를 통한 미세중력환경에 대한 노출

실험군 I 및 실험군 II로 분류한 생후 5일의 신생 흰쥐 20마리에 대하여 미세중력환경 조건을 적용하기 위하여 현수를 통한 체중부하 제거 방법을 이용하였다. 현수의 적용은 후지의 체중부하에 대한 감수성이 가장 높은 기간인 생후 8~13일을 포함하는 생후 5일부터 생후 30일까지 실시하였다. 현수의 적용시에는 4.5시간의 현수 적용과 1.5시간의 현수 제거를 주기적으로 반복함으로써 신생 흰쥐가 모체와의 상호작용을 유지할 수 있도록 하였다. 또한 현수의 적용에 따른 자세성 혈압 변화를 최소화하기 위하여 자체 제작한 지지대를 이용하여 체간이 수평을 유지할 수 있도록 하였다.

나. 전기자극(electrical stimulation)

흰쥐 후지의 가자미근에 대한 전기자극은 Meditone Physio 8 신경근전기자극기¹⁾를 이용하였다. 생후 5일부터 30일까지 현수를 적용하여 미세중력 환경에 노출시킨 조건에서, 실험군 II에 대하여 생후 16일부터 30일까지 15일 동안 후지의 하퇴부에 두 개의 5×3 mm² 접착성 표면전극을 부착하여 적용하였다. 전기자극의 강도는 하퇴부 근육의 가시적인 근수축과 족관절의 족저굴곡이 나타나는 최소 강도로 설정하여, 10 Hz로 30분간 하루 2회 적용하였다. 전기자극의 파형은 300 μs의 맥동폭을 가진 이상파로서, 5초 동안의 근수축 유발 시간과 10초 동안의 이완 시간으로 설정하여 근피로를 최소화하였다.

3. 조직학적 검사

가. 가자미근의 분리 및 표본의 제작

대조군 및 실험군 I, 실험군 II에 대한 실험적 처치가 이루어진 생후 15일 및 생후 30일에, 실험적 처치의 영향을 규명하기 위하여 각 시점마다 각 군당 5마리씩의 실험동물을 희생하여 조직학적 소견을 관찰하였다. 실험동물에 대하여 Ketamine HCl과 Rompun®을 1:2의 비율로 혼합하여 복강주사(3 ml/kg)를 실시한 후 통증에 대한 회피반응의 유무를 통해 마취 여부를 확인하고, 0.9% NaCl 용액을 전신 관류시켜 혈액을 제거하였다. 이후에 4% paraformaldehyde 용액을 전신 관류하여 조직 전고정을 실시하고, 가자미근 조직을 분리하였다. 해부현미경²⁾을 이용하여 분리된 근육표본으로부터 근막과 같은 조직 주위의 결합조직을 제거하면서 분리과정에서 손상된 근육 표본은 실험에서 제외시켰다. 분리한 표본에 대한 후고정 적용 후, 에탄올을 이용한 탈수 과정 및 Xylene을 이용한 청명과정을 거쳐 파라핀 블록을 제작하고, 미세절단기³⁾를 이용하여 5 μm 두께로 절단한 후 슬라이드를 제작하였다.

나. 면역조직화학법(Immunohistochemistry)

가자미근의 근육조직 표본은 탈파라핀 및 합수의 과정을 거친 후, 5% H₂O₂가 첨가된 200 ml의 메탄올에 30분 동안 침수시켜 내재적 과산화효소(endogenous peroxidase)를 제거하고, 증류수 및 .01 M PBS(phos-

1) Ultra Scientific Instrument Ltd., UK.

2) SMZ800, Nikon, Japan.

3) Model SM2000R, Leica, Germany.

phate buffer saline)로 수세하였다. 실험적 처치가 근육 세포의 발달에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 가자미근의 근육건연접부로부터 분리한 근육 조직에 대하여 1:200 농도의 primary goat polyclonal anti-MEF2C⁴⁾와 mouse anti-VEGF(rhVEGF121)⁵⁾를 24시간 동안 실온에서 각각 처리하였다. 일차항체 처리 후 biotinylated anti-goat IgG⁶⁾ 및 biotinylated anti-mouse IgG⁶⁾를 1:25의 농도로 90분간 처리하고, 이후에 Vectastatin Elite ABC Reagent⁶⁾을 이용하여 3차 항체를 1시간 동안 처리하였다. 항체 처리가 종료된 근육표본에 대하여 .3% DAB(3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) 용액을 처리하여 발색 반응을 유도한 후, Cresyl violet acetate⁷⁾를 이용하여 3분 동안 대조염색을 시행하고, 탈수와 청명의 과정을 거쳐서 최종 봉입하였다.

4. 운동행동학적 평가를 위한 족문 분석

생후 30일 시점에서 대조군, 실험군 I 및 실험군 II의 실험동물을 대상으로 Metz 등(2001)이 사용한 족문 분석법을 수정하여 적용하였다. 흰쥐의 족저면에 검정색 먹물을 묻힌 후, 바닥에 흰색 종이가 깔린 길이 80 cm, 폭 7 cm, 높이 10 cm의 통로를 통해 자유보행을 유도하여 3회씩 반복하여 족문을 기록하였다. 실험동물로부터 기록한 족문의 분석을 위하여 활보장(stride length)과 보행 방향에 대한 발의 외향각(toe-out angle)을 측정하였다. 활보장은 양쪽 발바닥 중심점 사이의 거리를 나타내고, 발의 외향각은 발의 세 번째 발가락과 중족지절관절 사이의 연결선이 보행 진행 방향과 이루는 각도를 의미한다(그림 1).

5. 분석방법

광학현미경⁸⁾으로 관찰한 각 표본의 조직학적 소견은 다음의 과정을 통해서 분석하였다. 가자미근 근육 표본의 MEF2C, VEGF의 발현 위치 및 발현 수준을 관찰하기 위하여 Image Pro Plus 프로그램을 이용해 단위 면적당 픽셀(pixel) 수를 측정하고, SPSS version 10.0 프로그램을 이용해 일원배치분산분석을 실시하였고, Duncan의 다중범위 검정을 통해 사후분석을 실시하였다. 본 연구의 통계학적 유의수준 $\alpha=.05$ 로 하였다.

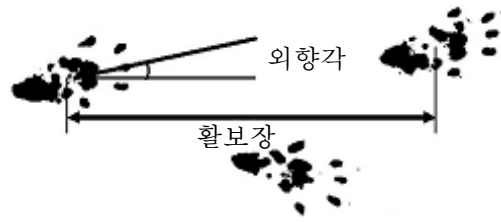


그림 1. 보행시의 족문 분석.

III. 결과

1. 가자미근 조직의 MEF2C 및 VEGF 발현

가. MEF2C의 발현 양상

현수를 적용한 상태에서 전기자극을 실시하기 전인 생후 15일과 실험군 II에 대한 전기자극이 종료된 생후 30일에 각 집단의 가자미근 조직에서 관찰된 MEF2C의 상대적인 발현 양상을 관찰하였다(그림 2). 세 군 사이에서 생후 15일과 생후 30일에 나타난 MEF2C의 상대적 발현 수준에 대한 통계학적 유의성을 검증하기 위하여 일원배치분산분석을 실시한 결과, 생후 15일($F=177.57$, $p<.05$)과 생후 30일($F=80.68$, $p<.05$)에서 $p=.00$ 으로 나타나 각 시점에서 세 군 사이의 통계적 유의성을 관찰할 수 있었다(표 1). 그리고 각 군 간의 유의성을 검증하기 위하여 Duncan의 다중범위 검정을 실시한 결과 생후 15일에는 대조군과 실험군 I, 대조군과 실험군 II 사이에서 유의성이 나타났으나, 실험군 I과 실험군 II 사이에서는 통계적 유의성이 나타나지 않았다. 반면에, 생후 30일에는 대조군과 실험군 I, 대조군과 실험군 II, 실험군 I과 실험군 II 사이에서 유의한 차이를 보였다(표 1).

표 1. 가자미근표본의 MEF2C 면역반응성 단위: 픽셀수

	생후 15일	생후 30일
	평균±표준편차	평균±표준편차
대조군	434.23±39.55	665.07±98.78
실험군 I	234.03±44.61	376.70±78.85
실험군 II	244.83±53.59	519.31±144.56

4) Santa Cruz Biotechnology Inc., U.S.A.

5) Oncogene Research Products, Boston, U.S.A.

6) Vector Lab. Inc., U.S.A.

7) Sigma, U.S.A.

8) Model BX50, Olympus, Japan.

나. VEGF의 발현 양상

각 군의 가자미근 조직에서 관찰된 VEGF의 발현 양상은 골격근의 혈관 조직 주위에서 높은 발현 수준을 보였다(그림 3). 생후 15일과 생후 30일 시점에서 관찰된 VEGF의 상대적인 평균 발현 수준은 표 2와 같고, 세 군 사이에서 생후 15일과 생후 30일에 나타난 VEGF의 상대적 발현 수준에 대한 통계학적 유의성을 검증하기 위하여 일원배치분산분석을 실시한 결과, 생후 15일(F=29.18, p<.05)과 생후 30일(F=16.04, p<.05) 시점에서 p=.00으로 나타나 각 시점에서 세 군 사이의 통계적 유의성을 관찰할 수 있었다. 각 군 간의 유의성을 검증하기 위하여 Duncan의 다중범위 검정을 실시한 결과 생후 15일에는 대조군과 실험군 I, 대조군과 실험군 II 사이에서 유의성이 나타났으나, 실험군 I과 실험군 II 사이에서는 통계적 유의성이 나타나지 않았다. 반면에 생후 30일에는 대조군과 실험군 I, 실험군 I과 실험군 II 사이에서는 유의한 차이를 보였으나, 대조군과 실험군 II 사이에서는 유의한 차이가 나타나지 않았다(표 2).

표 2. 가자미근표본의 VEGF 면역반응성 단위: 픽셀수

	생후 15일	생후 30일
	평균±표준편차	평균±표준편차
대조군	489.47±84.28	624.43±142.18
실험군 I	338.17±63.42	466.00±102.64
실험군 II	346.43±105.79	595.63±95.97

2. 운동행동학적 검사

생후 30일 시점에서 대조군과 실험군 I 및 실험군 II의 실험동물을 대상으로 보행시의 족문을 기록하여 활보장의 길이와 발의 외향각을 일원배치분산분석을 통해서 비교 분석하였다. 각 집단에서 기록된 활보장의 길이를 분석한 결과, 세 집단 간 유의한 차이가 나타났다(F=101.16, p<.05). 사후 검정을 실시한 결과, 대조군은 실험군 I 및 실험군 II에 비하여 유의하게 긴 활보장을 나타냈고, 실험군 I과 실험군 II 사이에서는 유의한 차이가 관찰되지 않았다(표 3). 또한, 각 군의 발의 외향각을 분석한 결과 세 집단 사이에서 유의한 차이가 관찰되었다(F=113.53, p<.05). 사후 검정을 실시한 결과, 대조군은 실험군 I 및 실험군 II에 비해서 발의 외향각이 유의하게 작았고, 실험군 I에 비해서는 실험군 II의 외향각이 유의하게 작게 나타났다(표 3).

표 3. 각 군의 족문 분석

	활보장(mm)	발의 외향각(°)
대조군	104.30±5.15	9.67±1.42
실험군 I	91.33±3.59	14.27±1.31
실험군 II	92.20±2.71	13.23±.93

IV. 고찰

여러 가지 선천적 및 후천적 원인들로 인하여 출생 이후에 정상적인 중력 환경을 경험할 수 없는 조건에서 발달 과정을 거치는 경우에는 신체의 구조와 기능이 정상적인 발달 수준에 이르지 못하게 되는 다양한 문제점들이 나타날 수 있다. 따라서 본 연구에서는 출생 이후의 정상적인 발달과정에서 필수적인 조건인 체중 부하의 제거가 근육계의 발달에 미치는 영향을 면역조직화학적 표지물질들의 변화 및 이에 따른 보행 변수의 변화를 통해서 관찰하고, 이러한 문제들을 최소화할 수 있는 임상적 대안으로서 전기자극의 치료적 근거를 제시하고자 하였다.

일반적으로 미세중력 환경에 노출시키기 위하여 신생 흰쥐를 현수시키는 방법으로는 성숙흰쥐와 같은 꼬리 현수 모델(tail-suspension model)을 통한 후지 현수 방법을 많이 이용하고 있으나(Huckstorf 등, 2000; Taillandier 등, 2003), 본 연구에서는 자체 제작한 지지대를 착용시켜 현수를 유도하였다. 현수를 통한 체중부하 제거방법은 건절단(tenotomy), 신경절단(neurotomy), 신경압좌(nerve crush)와 같은 방법에 비하여 비침해적이고, 실험동물의 움직임을 완전히 제한시키지 않으므로 관절 움직임이 가능하여 항중력근 및 신경회로의 발달에 대한 체중부하 자극의 영향만을 선택적으로 통제할 수 있다는 장점이 있다. 본 연구 모델에서 현수의 적용은 생후 5일부터 생후 30일까지 적용하였는데, 이는 발달 과정에 대한 미세중력자극의 영향이 가장 큰 시기가 생후 8일부터 생후 13일이라고 보고한 Walton의 연구(1998)에 그 근거를 두고 있다. 사람과 리수스원숭이(rhesus monkey)의 체지 근육들은 출생 이전에 조직화학적 분화가 이루어지지만, 신생 흰쥐의 후지 근육들은 출생 이후에도 조직화학적으로 미분화된 상태이므로(Schmalbruch, 1985), 이 시기는 근육발달에 대한 미세중력 자극의 영향을 효과적으로 관찰할 수 있는 기간이라 볼 수 있다. 또한, 이 기간을 포함한 신생기 동

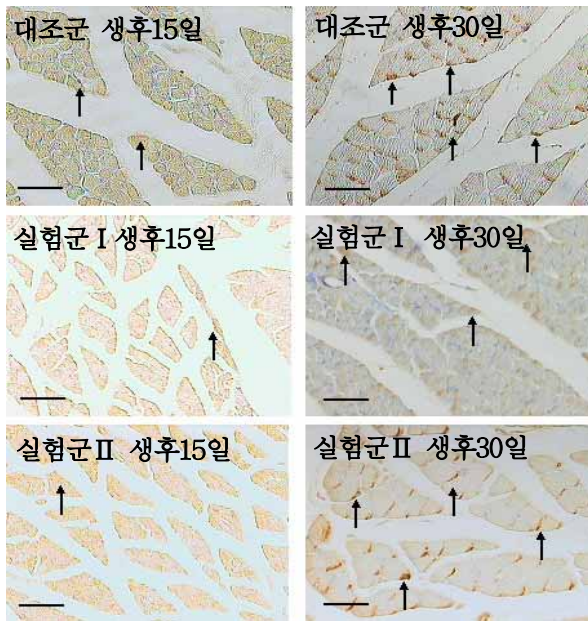


그림 2. 가자미근 조직의 MEF2C 면역반응성(—: 100 μ m, \uparrow : 발현부위).

안의 골격근 기능 이상은 근섬유의 소실 증가 뿐만 아니라 이를 지배하는 운동신경원의 수를 현저하게 감소시키는 결과를 초래할 수 있다(Greensmith 등, 1998).

체중 부하를 제거에 따른 신경근육 조직의 구조적 및 기능적 변화를 최소화하기 위한 대안적 자극 방법으로 전기자극을 적용한 후 그 영향을 관찰하였다. 전기자극은 현수 조건을 유지한 실험군 II의 가자미근에 대하여 적용하였는데, 이 근육은 제 1형 근섬유 80%와 제 2형 근섬유 20%로 구성된 서근(slow muscle)으로서 미세중력 조건에 대하여 민감한 반응을 나타내므로, 현수 자극과 전기자극에 따른 영향을 효과적으로 관찰할 수 있다. 일반적으로, 서근을 지배하는 운동신경원을 효과적으로 자극하기 위한 전기자극 빈도는 10~20 Hz이므로(Schiaffino와 Serrano, 2002), 본 연구에서는 가자미근의 전기자극을 위하여 10 Hz의 저빈도 전기자극을 적용하였다. 또한 본 연구의 실험적 처치 기간인 신생기는 전기자극에 대한 신경근육계의 적응 현상이 더욱 활발하게 이루어지고 전기자극의 효과도 높은 시기로 볼 수 있다(Mercier 등, 1999).

본 연구에서는 현수적용 이후에 전기자극에 따른 조절 인자들의 발현 양상을 가자미근 조직에서 관찰하였다. 본 연구에서 MEF2C의 면역반응성은 미세중력 환경에 대한 노출 이후에 현저히 감소하였으므로, 현수를

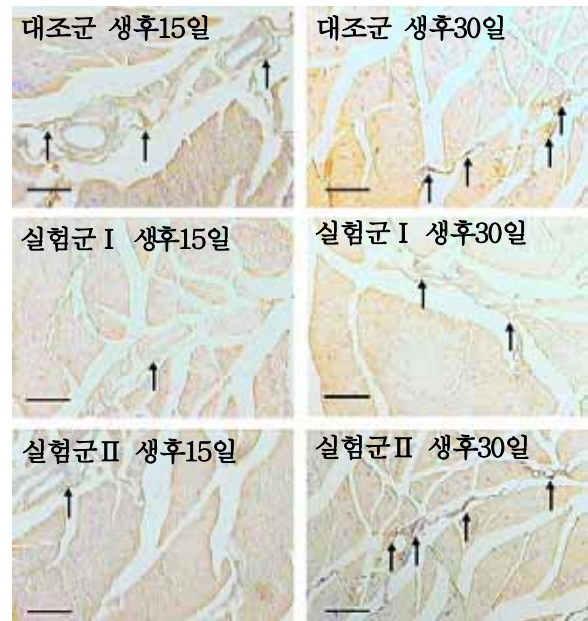


그림 3. 가자미근 조직의 VEGF 면역반응성(—: 100 μ m, \uparrow : 발현부위).

통한 미세중력자극이 효과적으로 적용되었음을 알 수 있었고, 미세중력환경과 MEF2C의 발현 수준의 관련성을 확인할 수 있었다. 또한 현수를 적용과 함께 기능적 전기자극을 적용함에 따라서 가자미근 조직 내의 MEF2C 면역반응성이 증가되었으므로, 저빈도 전기자극이 서근의 발달을 촉진하는 것으로 생각된다.

MEF2C 면역반응성과 함께, 미세중력 조건에서 나타날 수 있는 전형적인 변화 중의 하나인 모세혈관 밀도 조절 인자의 변화를 관찰하였다. 모세혈관의 밀도는 골격근의 발달 수준과 밀접한 관련성이 있으므로(Breier와 Risau, 1996), 본 연구에서는 가자미근 조직의 VEGF 면역반응성을 관찰하였다. 현수 자극에 의하여 근육내 혈관형성 자극 인자인 VEGF의 발현이 감소되었으나, 전기자극을 적용한 생후 30일 시점의 실험군 II에서는 대조군과 유의한 차이가 없는 수준까지 발현량이 증가되는 것으로 나타나, 근육의 기능적 요구가 증가함에 따라서 혈류 공급을 증가시키기 위한 근육내부 미세혈관계의 적응현상이 이루어진 것으로 보여진다. 즉, 현수 자극과 전기자극이 골격근 활동 수준에 따른 기능적 요구를 변화시켜 모세혈관망의 형성에 관여하는 혈관형성 자극인자의 발현 수준을 변화시킨 것으로 생각된다. 이러한 변화는 장기간의 탈신경 조건을 통해서 위축을 유발시킨 골격근에서 모세혈관의 밀도

변화를 직접 관찰한 연구에서도 나타난다(Dedkov 등, 2002). Gustafsson 등(1999)과 Hang 등(1995)은 VEGF가 운동이나 운동신경 자극 시에 골격근에서 발현되는 혈관형성 인자라고 제시하였고, Breen 등(1996)도 운동 이후에 VEGF mRNA의 발현이 증가하였음을 보고함으로써 체중 부하를 포함한 적절한 생리적 자극이 골격근의 혈관발달 과정에 필수적임을 제시하고 있다. 그리고 MEF2C 전사인자가 결핍된 생쥐에서 복합적 혈관 기형의 발생과 심장의 VEGF 발현 감소가 초래되었음을 보고한 Bi 등(1999)의 연구를 통해서, 발달 과정에서 MEF2C와 VEGF가 서로 상호작용하는 것으로 생각할 수 있다. 본 연구에서도 생후 15일과 생후 30일 시점에서 실험적 조건에 따른 각 군 간 MEF2C 및 VEGF의 발현 수준을 분석한 결과, 이와 동일한 발현 양상을 관찰할 수 있었다.

본 연구에서는 골격근 발달과 관련된 면역조직화학적 표지물질의 발현 양상을 관찰함과 동시에, 실험적 조건이 운동행동학적 수행에 미치는 영향을 양적으로 관찰하기 위하여 생후 30일 시점에서 족문 분석을 실시하였다. 실험군 I과 실험군 II는 대조군에 비해서 활보장이 유의하게 단축되고, 입각기에 보행의 진행 방향에서 발의 진행 방향이 외측으로 현저히 편위되는 외향각의 증가 양상을 관찰할 수 있었다. 이러한 변화는 현수에 의하여 실험군 I 및 실험군 II의 신경근육계 발달이 제한된 결과로 생각되며, 신생기 발달 과정의 특정 환경 조건이 운동행동학적 수행 수준에도 직접적인 영향을 미칠 수 있음을 나타낸다. 특히, 발과 관련된 보행 변수는 보행 기능과도 밀접한 관련성을 가지는데, 활보장의 길이는 기저면의 넓이와도 관련된 안정성의 중요 요소 중의 하나이다. 이러한 보행의 변수와 관련된 운동행동학적 변화들은 스트레스에 노출시킨 흰쥐를 대상으로 한 연구에서도 동일하게 관찰되었다(Metz 등, 2001). 실험군들 사이에서는 전기자극을 적용한 실험군 II가 실험군 I에 비해서 평균 활보장이 다소 길게 나타났으나 통계학적 유의성은 없었다. 그러나 발의 평균 외향각에 있어서는 실험군 I에 비해서 실험군 II에서 유의한 감소를 보였다. 발의 외향각 감소는 보행 기능의 향상으로 볼 수 있으므로(Metz 등, 2001; Varejão 등, 2003), 본 연구를 통해서 전기자극이 운동행동학적 측면에도 유의한 영향을 미칠 수 있음을 알 수 있다.

V. 결론

신생기 신경근육계의 발달 과정에서 전기 자극이 미세중력자극에 의한 골격근의 발달 제한을 보완할 수 있는지를 알아보기 위하여 본 연구를 진행하였고, 그 결과는 다음과 같다.

1. 생후 15일 시점에서, 실험군 I과 실험군 II의 가자미근 조직은 대조군에 비하여 현저하게 낮은 수준의 MEF2C 및 VEGF 면역반응성을 나타내어 미세중력 자극이 골격근의 발달을 제한하는 것으로 나타났다.
2. 생후 30일 시점에서, 대조군과 실험군 II의 가자미근 조직은 실험군 I에 비하여 유의하게 높은 MEF2C, VEGF 면역반응성을 나타내어 전기자극이 골격근과 척수 신경조직의 발달을 촉진하는 것으로 나타났다.
3. 실험군 I 및 실험군 II에서, 현수를 이용한 미세중력 자극의 적용은 보행 변수인 활보장의 감소 및 발의 외향각 증가를 유발하고, 실험군 II에서 전기자극이 이러한 변화를 감소시키는 것으로 나타나 전기자극이 운동행동학적 기능 발달을 촉진하는 것으로 볼 수 있다.

이러한 결과를 종합하면, 출생 이후의 체중 부하 자극이 골격근의 발달 과정에서 필수적이고, 신경근 전기 자극이 신생기 발달 과정의 필수적 요소인 중력 자극의 영향을 보완하여 골격근의 발달을 촉진할 수 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 전기 자극의 형태에 따라서 부 적절한 영향들이 나타날 수 있으므로 목적에 따른 효과적인 전기자극 프로토콜을 결정하기 위한 후속 연구들이 지속적으로 이루어져야 할 것으로 생각된다.

인용문헌

- Bacic M, Edwards NA, Merrill, MJ. Differential expression of vascular endothelial growth factor (vascular permeability factor) forms in rat tissues. *Growth Factors*. 1995;12(1):11-15.
- Bastide B, Conti A, Sorrentino V, et al. Properties of ryanodine receptor in rat muscles submitted to unloaded conditions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;270(2):442-447.
- Bélanger M, Stein RB, Wheeler GD, et al. Electrical

- stimulation: Can it increase muscle strength and reverse osteopenia in spinal cord injured individuals. *Arch Phys Med Rehabil.* 2000;81(8):1090-1098.
- Bi W, Drake CJ, Schwarz JJ. The transcription factor MEF2C-null mouse exhibits complex vascular malformations and reduced cardiac expression of angiopoietin 1 and VEGF. *Dev Biol.* 1999;211:255-267.
- Breen EC, Johnson EC, Wagner H, et al. Angiogenic growth factor mRNA responses in muscle to a single bout of exercise. *J Appl Physiol.* 1996;81(1):355-361.
- Breier G, Risau W. The role of vascular endothelial growth factor in blood vessel formation. *Trends Cell Biol.* 1996;6(12):454-456.
- Caiozzo VJ, Haddad F, Baker MJ, et al. Microgravity-induced transformations of myosin isoforms and contractile properties of skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 1996;81(1):123-132.
- Caldwell JH, Ridge RM. The effects of deaf-ferentation and spinal cord transection on synapse elimination in developing rat muscles. *J Physiol.* 1983;339:145-159.
- De Angelis L, Berghella L, Coletta M, et al. Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *J Cell Biol.* 1999;147(4):869-878.
- Dedkov EI, Kostrominova TY, Borisov AB, et al. Resistance vessel remodeling and reparative angiogenesis in the microcirculatory bed of long-term denervated skeletal muscles. *Microvasc Res.* 2002;63:96-114.
- Glaser JA, Baltz MA, Nietert PJ, et al. Electrical muscle stimulation as an adjunct to exercise therapy in the treatment of nonacute low back pain: A randomized trial. *J Pain.* 2001;2(5):295-299.
- Greensmith DL, Harding DI, Meyer MP, et al. Mechanical activity is necessary for the elimination of polyneuronal innervation of developing rat soleus muscles. *Brain Res Dev Brain Res.* 1998;110(1):131-134.
- Gustafsson T, Puntschart A, Kaijser L, et al. Exercise-induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1999;276(2 pt2):H679-H685.
- Hang J, Kong L, Gu JW, et al. VEGF gene expression is upregulated in electrically stimulated rat skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1995;269(5 pt 2):H1827-H1831.
- Herbison GJ, Jaweed MM, Ditunno JF. Muscle atrophy in rats following denervation, casting, inflammation and tenotomy. *Arch Phys Med Rehabil.* 1979;60(9):401-404.
- Huckstorf BL, Slocum GR, Bain JL, et al. Effects of hindlimb unloading on neuromuscular development of neonatal rats. *Brain Res Dev Brain Res.* 2000;119:169-178.
- Inobe M, Inobe I, Adams GR, et al. Effects of microgravity on myogenic factor expressions during postnatal development of rat skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2002;92(5):1936-1942.
- Ishii H, Oota I, Arakawa T, et al. Differential gene expression of vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors in the development of the rat masseter muscle. *Arch Oral Biol.* 2002;47(7):505-510.
- Kablar B, Rudnicki MA. Information provided by the skeletal muscle and associated neurons is necessary for proper brain development. *Int J Dev Neurosci.* 2002;20(7):573-584.
- Kaplan RE, Czynny JJ, Fung TS, et al. Electrical foot stimulation and implications for the prevention of venous thromboembolic disease. *Thromb Haemost.* 2002;88(2):200-204.
- Keil L, Evans J, Grindeland R, Krasnov I. Pituitary oxytocin and vasopressin content of rats flown on COSMOS 2044. *J Appl Physiol.* 1992;73(2 suppl):166S-168S.
- Kerai B, Greensmith L, Vrbova G, et al. Effect of

- transient neonatal muscle paralysis on the growth of soleus motoneurons in the rat. *Brain Res Dev Brain Res.* 1995;85(1):89-95.
- Lee RC, Canaday DJ, Doong H. A review of the biophysical basis for the clinical application of electric fields in soft-tissue repair. *J Burn Care Rehabil.* 1993;14(3):319-335.
- Leivo I, Kauhanen S, Michelsson JE. Abnormal mitochondria and sarcoplasmic changes in rabbit skeletal muscle induced by immobilization. *APMIS.* 1998;106(12):1113-1123.
- Mercier C, Jobin J, Lépine C, et al. Effects of hindlimb suspension on contractile properties of young and old rat muscles and the impact of electrical stimulation on the recovery process. *Mech Ageing Dev.* 1999;106(3):305-320.
- Mercier C, Lacaille M, Simard C. Influence of electrical stimulation on enzymatic activity of old rat muscles during hindlimb suspension. *Mech Ageing Dev.* 1993;68(1-3):117-124.
- Metz GA, Schwab ME, Welzl H. The effects of acute and chronic stress on motor and sensory performance in male Lewis rats. *Physiol Behav.* 2001;72(1-2):29-35.
- Mozdziak PE, Pulvermacher PM, Schultz E. Unloading of juvenile muscle results in a reduced muscle size 9 wk after reloading. *J Appl Physiol.* 2000;88(1):158-164.
- Ogunshola OO, Stewart WB, Mihalcik V, et al. Neuronal VEGF expression correlates with angiogenesis in postnatal developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 2000;119(1):139-153.
- Pette D. The adaptive potential of skeletal muscle fibers. *Can J Appl Physiol.* 2002;27(4):423-448.
- Qin L, Appell HJ, Chan KM, et al. Electrical stimulation prevents immobilization atrophy in skeletal muscle of rabbits. *Arch Phys Med Rehabil.* 1997;78(5):512-517.
- Rehfeldt C, Fiedler I, Dietl G, et al. Myogenesis and postnatal skeletal muscle cell growth as influenced by selection. *Livestock Production Science.* 2000;66:177-188.
- Schiaffino S, Serrano A. Calcineurin signaling and neural control of skeletal muscle fiber type and size. *Trends Pharmacol Sci.* 2002;23(12):569-575.
- Schmalbruch H. *Skeletal Muscle.* Heidelberg, Germany, Springer, 1985:181-185.
- Sinha RK, Shah SA, Hume EL, et al. The effect of a 5-day space flight on the immature rat spine. *Spine J.* 2002;2(4):239-243.
- Taillandier D, Aourousseau E, Combaret L, et al. Regulation of proteolysis during reloading of the unweighted soleus muscle. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(5):665-675.
- Vanderthommen M, Depresseux JC, Dauchat L, et al. Blood flow variation in human muscle during electrically stimulated exercise bouts. *Arch Phys Med Rehabil.* 2002;83(7):936-941.
- Varejão AS, Cabrita AM, Geuna S, et al. Toe out angle: A functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery in the rat model. *Exp Neurol.* 2003;183:695-699.
- Walton K. Postnatal development under conditions of stimulated weightlessness and space flight. *Brain Res Dev Brain Res.* 1998;28(1-2):25-34.
- Wang JS, Chen SY, Lan C, et al. Neuromuscular electrical stimulation enhances endothelial vascular control and hemodynamic function in paretic upper extremities of patients with stroke. *Arch Phys Med Rehabil.* 2004;85(7):1112-1116.
- Yamakuchi M, Higuchi I, Masuda S, et al. Type I muscle atrophy caused by microgravity-induced decrease of myocyte enhancer factor 2C (MEF2C) protein expression. *FEBS Lett.* 2000;477(1-2):135-140.
- Zérath E, Nogues C, Borne M, et al. Bone effects of 13 days of weightlessness on rat and monkey some results of biocosmos 1887 and ground simulations. *Physiologist.* 1990;33(1 suppl):S94-S95.
-
- | | |
|---------|---------------|
| 논문접수일 | 2006년 7월 30일 |
| 논문게재승인일 | 2006년 12월 23일 |