

## 자발 운동 및 부유 환경 조성에 의한 선조체 내 신경세포 생성 유도

연세대학교 의과대학 재활의학교실 및 재활의학연구소, <sup>1</sup>제주대학교 의과대학 재활의학교실

민경훈 · 임상희<sup>1</sup> · 배병우 · 김은상 · 박은숙 · 박창일 · 조성래

### Induction of Striatal Neurogenesis by Voluntary Exercise and Environmental Enrichment

Kyung Hoon Min, M.D., Sang-Hee Im, M.D.<sup>1</sup>, Byung Woo Bae, M.D., Eun Sang Kim, M.D., Eun Sook Park, M.D., Chang-il Park, M.D. and Sung-Rae Cho, M.D.

Department of Rehabilitation Medicine and Research Institute of Rehabilitation Medicine, Yonsei University College of Medicine,

<sup>1</sup>Department of Rehabilitation Medicine, Cheju National University College of Medicine

**Objective:** To investigate that neurogenesis in the subventricular zone (SVZ), which is already known as neurogenic area where neural stem/progenitor cells persist, and the striatum, which is non-neurogenic area, might be induced by voluntary exercise (VEx) or environmental enrichment (EE), and compare the extent of the neurogenesis with untreated controls.

**Method:** Total 12 C57BL/6 mice, 2~3 months old, were recruited as follows; voluntary wheel runner, EE and control. For 2 weeks, VEx group was housed in rat cage (48×26 cm) with 2 running wheels with 3~4 animals/cage, and EE group was housed in the living condition of huge cage (86×76 cm), social interaction (13~14 mice/cage) and objects such as toys, tunnels and running wheel, whereas control group was placed in the standard cage (30×18 cm).

**Results:** VEx and EE tended to increase the densities of mitotic marker BrdU<sup>+</sup> cells in SVZ and striatum. They also exhibited more BrdU<sup>+</sup> cells (/mm<sup>3</sup>) into the striatum, even though they did not show statistical significance. Moreover, EE group showed significant increment of the newly generated neurons coexpressed with BrdU<sup>+</sup> and  $\beta$  III-tubulin<sup>+</sup> (/mm<sup>3</sup>) in SVZ and striatum as compared to those of controls.

**Conclusion:** Voluntary physical exercise and EE induced cell proliferation and neurogenesis in both SVZ and striatum. Characteristically, EE could significantly induce neurogenesis in striatum, non-neurogenic area as well as SVZ, typical neurogenic area. Therefore, this strategy might be used to activate neural regeneration in various central nervous system diseases. (*J Korean Acad Rehab Med* 2008; 32: 632-636)

**Key Words:** Voluntary exercise, Environmental enrichment, Neurogenesis, Subventricular zone, Striatum

## 서 론

성체 시기의 뇌에도 해마(hippocampus) 및 뇌실하 부위(subventricular zone)에 신경 줄기/전구세포(stem/progenitor cells)가 지속적으로 존재하며,<sup>1</sup> 신체 운동 및 부유 환경(environmental enrichment)에 의해 신경세포 생성(neurogenesis)이 유도될 수 있다.<sup>2-6</sup> 즉, Praag 등<sup>2,3</sup>과 Kempermann 등<sup>4,5</sup>이 설치류 동물에서 자발적 수레바퀴 달리기(voluntary wheel running) 및 부유 환경을 통해 해마 부위 신경세포 생성이 증가된다고 보고한 바에 의하면, 재활치료 모델인 자발 운

동 및 부유 환경은 위에서 기술한 내재성 신경 줄기세포 및 전구세포를 활성화시킬 수 있는 한 가지 방법으로 이용 가능하다.<sup>6</sup>

그러나 뇌실하 부위의 신경세포 생성과 후두구(olfactory bulb)로의 이주(migration)는 연구자에 따라 보고가 다른데, Nygren 등<sup>7</sup>은 정상 쥐에서 부유 환경에 의해 뇌실하 부위 세포 증식과 이주하는 신경세포가 증가한다고 보고한 반면, Brown 등<sup>8</sup>은 자발 운동 및 부유 환경에 의해 뇌실하 부위 및 후두구에 신경세포 생성이 증가되지 않는다고 하였다. 특히 허혈성 뇌손상을 받은 경우에는 더욱 복잡한데, Komitova 등<sup>9,10</sup>은 부유 환경 하에서 뇌실하 부위 세포 증식과 이주 신경세포가 증가되었으나, 신체 운동은 이들 세포를 감소시켰다고 보고한 반면, Nygren 등<sup>7</sup>은 부유 환경군에서 뇌실하 부위 및 선조체 내 신경세포 생성이 모두 감소한다고 하였다.

이와 같이 성체 뇌에서 자발 운동 및 부유 환경에 의한 해마 부위 신경세포 생성은 보편적으로 알려진 반면,<sup>11-13</sup> 뇌실하 부위의 세포 생성 및 이주는 연구자에 따라 보고가

접수일: 2008년 3월 23일, 게재승인일: 2008년 8월 9일

교신저자: 조성래, 서울시 서대문구 신촌동 134번지

☎ 120-752, 연세의료원 재활병원

Tel: 02-2228-3715, Fax: 02-363-2795

E-mail: srcho918@yumc.yonsei.ac.kr

본 연구는 2007년 학술진흥재단 신진교수연구비(과제번호 E00196) 수혜로 진행된 과제임.

다르며,<sup>7-10</sup> 신경생성 부위로 알려지지 않은 선조체 내 신경세포 생성 여부에 대해서는 보고가 거의 없는 형편이다. 이에 본 연구에서는 생후 2~3개월의 정상 쥐 모델에서 자발적 신체 운동 및 사회적 상호관계(social interaction) 하에서 다양한 장난감, 터널, 운동용 수레바퀴 등을 포함한 부유 환경을 통해 뇌실하 부위 및 선조체 내 신경세포 생성이 유도되는지 여부 및 정도를 확인하여, 추후 뇌손상 모델에 적용하기 위한 기초 자료를 마련하고자 하였다.

### 연구대상 및 방법

#### 1) 연구 대상

생후 2~3개월, 체중 20~30 gram의 C57BL/6 (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) 여성 쥐 모델 12마리를 대상으로 자발 운동군, 부유 환경군 및 대조군으로 각 군당 4마리씩 나누고, 뇌실하 부위 신경 줄기세포를 포함하여 새로 생성되는 세포를 표식하기 위해 bromodeoxyuridine (BrdU; 100 mg/kg) (Sigma-aldrich, St. Louis, USA)을 치료시작 다음날부터 12일간 하루 1차례 복강 내로 주사하였다.<sup>2</sup> 남성 동물은 새로운 환경에서 스트레스를 받고 공격적 성향을 보이며, 이는 신경세포 생성을 저해할 수 있으므로 여성 동물을 사용하였다.<sup>5</sup> 이들은 모두 Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC)에 의해 승인된 시설에서 관리되었고, 12시간 간격의 light/dark cycle 하에서 유지되었다.

#### 2) 양육 환경

부유 환경군은 86×76 cm 크기의 대형 쥐 사육장에 약 12~13마리의 집단을 사육하고 다양한 장난감, 터널, 수레바퀴 등을 배치한 후 2주 동안 유지하였다(Fig. 1A). 또한 자발 운동군에서는 같은 기간 동안 3~4마리를 48×26 cm 크기의 쥐 사육통에 2개의 수레바퀴를 설치하여 자발적으로 달리

기 운동을 시행하도록 유도한 반면(Fig. 1B), 대조군에서는 30×18 cm 크기의 소형 사육통에서 사육하였다(Fig. 1C).

#### 3) 신경 조직학적 평가

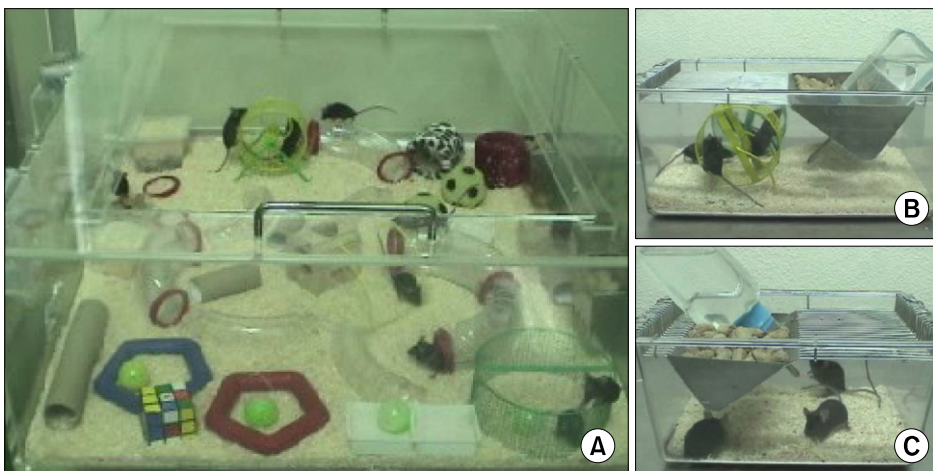
치료 시작 2주 후 심장 내로 고정액인 4% paraformaldehyde를 투여하여 뇌 조직을 취하였다. 이들 조직은 냉동되고 16 μm 간격으로 절단된 후, 각 대상 동물 당 256 μm 간격의 3개 조직 절편에서 면역조직화학 검사를 시행하였다. 즉, 세포증식 표식자인 BrdU 및 신경세포 표식자인 β III-tubulin으로 염색하고, confocal 현미경(Carl Zeiss, Inc., Thornwood, USA)을 통해 뇌실하 부위 및 선조체 내에서 BrdU<sup>+</sup>로 단독 염색되는 세포와 BrdU<sup>+</sup>/β III-tubulin<sup>+</sup>로 동반 염색되는 신경세포를 확인하였다. 또한 MetaMorph Imaging System (Molecular Device, Sunnyvale, USA)을 이용하여 선조체 면적을 구하고 부피로 환산한 후(면적×16 μm), 선조체 내에 새로 생성된 신경세포의 수를 밀도(/mm<sup>3</sup>)로 정량화하였다.

통계 방법은 SPSS 11.5 for window version을 사용하여, 뇌실하 부위 및 선조체 내 세포 증식 및 신경세포 생성 정도를 평가하기 위해 단위 부피(/mm<sup>3</sup>) 당 BrdU<sup>+</sup>세포 및 BrdU<sup>+</sup>/β III-tubulin<sup>+</sup>세포 수를 ANOVA test 및 posthoc Tukey comparison으로 분석하였으며, 통계적 유의수준은 p<0.05로 설정하였다.

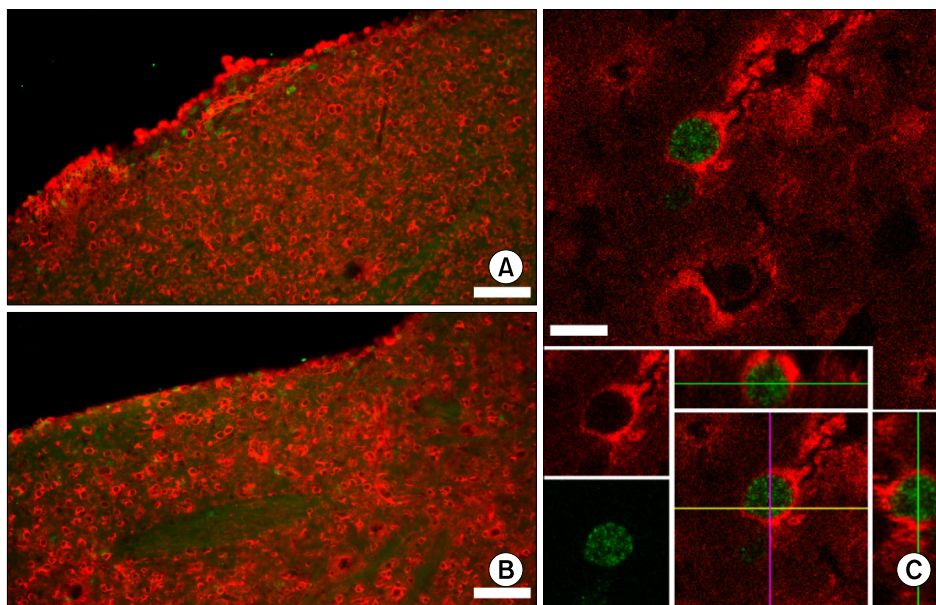
### 결 과

#### 1) 신경 조직학적 평가

총 36개의 조직 절편(자발 운동군, 부유 환경군, 대조군 각 12개 절편)을 관찰하여, 뇌실하 부위 및 선조체 내에서 세포증식 표식자인 BrdU와 신경세포 표식자인 β III-tubulin의 동반 염색 소견을 확인한 결과, 자발 운동군 및 부유 환경군에서 뇌실하 부위뿐만 아니라(Fig. 2A, B), 비 신경생성 부위인 선조체 내에서도 신경세포 생성이 관찰되었다(Fig. 2C).



**Fig. 1.** Environmental enrichment group was housed in the living condition of huge cage (86×76 cm), social interaction (13~14 mice/cage) and a objects such as toys, tunnels and running wheel (A). Voluntary exercise group was housed in rat cage (48×26 cm) with 2 running wheels with 3~4 animals/cage (B), whereas control group was placed in the standard cage (30×18 cm) (C).



**Fig. 2.** Induced neurogenesis in subventricular zone by voluntary exercise (A) and environmental enrichment (B) (Scale: 80  $\mu$ m). Newly generated neurons colabelled with BrdU<sup>+</sup>/ $\beta$  III-tubulin<sup>+</sup> cells into the striatum, non-neurogenic region by environmental enrichment (C) (Scale: 10  $\mu$ m).

**Table 1.** Cell Proliferation and Neurogenesis Induced by Voluntary Exercise and Environmental Enrichment

Diagnosis	No. of subjects (sections)	BrdU <sup>+</sup> cells (/mm <sup>3</sup> )	BrdU <sup>+</sup> / $\beta$ III-tubulin <sup>+</sup> cells (/mm <sup>3</sup> )
<b>Subventricular zone</b>			
Voluntary exercise	4 (12)	29,314.7 $\pm$ 9,547.2	9,005.8 $\pm$ 3,025.0
Environmental enrichment	4 (12)	24,983.6 $\pm$ 3,420.5	12,220.4 $\pm$ 1,317.0*
Control	4 (12)	10,695.7 $\pm$ 4,157.9	3,903.0 $\pm$ 1,109.4
<b>Striatum</b>			
Voluntary exercise	4 (12)	884.8 $\pm$ 107.1	187.6 $\pm$ 63.3
Environmental enrichment	4 (12)	934.0 $\pm$ 241.3	224.0 $\pm$ 66.4*
Control	4 (12)	348.7 $\pm$ 228.1	12.8 $\pm$ 0.3

Values are mean $\pm$ S.E.

\*p<0.05 by one-way ANOVA with post-hoc Tukey comparison, as compared with controls

### 2) 뇌실하 부위 세포 증식 소견

치료 2주 후 뇌실하 부위 BrdU<sup>+</sup>세포는 자발 운동군에서 29,314.7 $\pm$ 9,547.2개/mm<sup>3</sup>, 부유 환경군에서 24,983.6 $\pm$ 3,420.5개/mm<sup>3</sup>, 대조군에서 10,695.7 $\pm$ 4,157.9개/mm<sup>3</sup>였다. 각 대상군 간에 통계학적으로 유의한 차이는 없었으나, 자발 운동군과 부유 환경군에서 대조군에 비해 증가된 소견을 보였다(각각 p=0.149, p=0.296)(Table 1).

### 3) 뇌실하 부위 신경세포 생성 소견

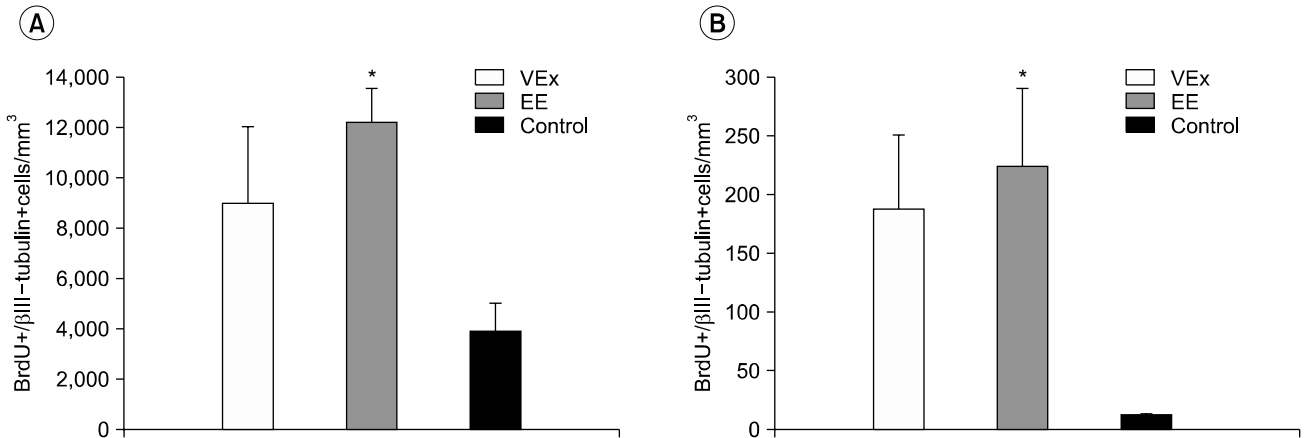
뇌실하 부위에 BrdU 및  $\beta$  III-tubulin으로 동반 염색된 세포는 부유 환경군에서 12,220.4 $\pm$ 1,317.0개/mm<sup>3</sup>으로 대조군에서의 3,903.0 $\pm$ 1,109.4개/mm<sup>3</sup>에 비해 통계학적으로 유의하게 증가된 소견을 보였다(p=0.041). 그러나 자발 운동군은 9,005.8 $\pm$  3,025.0개/mm<sup>3</sup>으로 대조군과 의미 있는 차이를 보이지 않았다(p=0.225)(Table 1)(Fig. 3A).

### 4) 선조체 내 세포 증식 소견

치료 2주 후 선조체 내 BrdU<sup>+</sup>세포는 자발 운동군에서 884.8 $\pm$ 107.1개/mm<sup>3</sup>, 부유 환경군에서 934.0 $\pm$ 241.3개/mm<sup>3</sup>, 대조군에서 348.7 $\pm$ 228.1개/mm<sup>3</sup>였다. 각 대상군 간에 통계학적으로 유의한 차이는 없었으나, 자발 운동군과 부유 환경군에서 증가된 소견을 보였다(각각 p=0.199, p=0.155)(Table 1).

### 5) 선조체 내 신경세포 생성 소견

선조체 내 BrdU 및  $\beta$  III-tubulin로 동반 염색된 세포는 부유 환경군에서 224.0 $\pm$ 66.4개/mm<sup>3</sup>으로 대조군에서의 12.8 $\pm$ 0.3개/mm<sup>3</sup>에 비해 통계학적으로 유의하게 증가된 소견을 보였다(p=0.048). 또한 자발 운동군에서도 187.6 $\pm$ 63.3개/mm<sup>3</sup>으로 대조군에 비해 선조체 내 신경세포 생성이 증가된 경향을 보였으나, 통계학적으로 의미 있는 차이는 보이지 않았다(p=0.102)(Table 1)(Fig. 3B).



**Fig. 3.** Significant increment of newly generated neurons coexpressed with BrdU<sup>+</sup>/β III-tubulin<sup>+</sup> cells in the subventricular zone (A) and the striatum (B) by environmental enrichment. \*p<0.05 by ANOVA with post-hoc Tukey comparison, as compared with controls.

고 찰

성체 뇌 신경계에서도 신경 줄기세포 및 전구세포가 존재하고, 해마 및 뇌실하 부위와 같은 특정 부위에서 신경세포 생성이 일어난다는 사실<sup>1</sup>과 뇌 유래 신경영양 인자 (brain-derived neurotrophic factor; BDNF)의 투여에 의해 비신경생성 부위인 선조체 내에서도 신경세포 생성이 가능하다는 보고<sup>14-16</sup>는 향후 이들 세포를 활성화시키는 치료법을 통해 재생이 불가능하거나 극히 제한되어있다고 알려져 있는 난치성 중추신경계 질환을 치료할 수 있는 가능성을 제시한다고 생각할 수 있다.

또한 자발 운동<sup>2,3</sup> 및 부유 환경<sup>4,5</sup>에 의해서도 상기 내재성 신경 줄기/전구세포가 활성화되고, 특히 해마 부위 신경세포 생성 및 학습 능력이 향상되는데,<sup>6</sup> 이러한 효과는 자발적 신체 운동에서는 혈관내피 성장인자(vascular endothelial growth factor; VEGF), 인슐린 유사 성장인자-1 (insulin-like growth factor-1; IGF-1), 섬유아세포 성장인자-2 (fibroblast growth factor-2; FGF-2), 뇌 유래 신경영양 인자 등에 의해 혈관생성(angiogenesis), 세포 증식(cell proliferation), 신경세포 생성 등이 유도되는 것으로 보고되고 있으며,<sup>7,9</sup> 부유 환경에서는 혈관생성 및 세포 증식 자체 보다는 각종 신경영양 인자에 의한 신생 세포의 생존, 신경 분화, 신경연접 가소성(synaptic plasticity), 세포사(apoptosis) 억제에 의한 신경 보호 효과 등이 주 기전으로 알려져 있다.<sup>17-20</sup>

본 연구 결과, 뇌실하 부위 및 선조체 내 세포증식 조건은 자발 운동군 및 부유 환경군 모두에서 증가된 경향을 보였으며, 뇌실하 부위 및 선조체 내 신경세포 생성은 부유 환경군에서 대조군에 비해 유의하게 증가된 소견을 보였다. 따라서 수레바퀴 달리기 운동과 같은 신체 운동은 세포 증식에 보다 작용하고, 다양한 자극을 제공하는 부유 환경

은 신경세포 분화에 주로 관여하며, 뇌실하 부위 신경세포 생성이 증가하고 선조체 내로 신경세포 유입이 유의하게 증가되었다고 생각된다. 이는 해마 부위 신경세포 생성이 자발 운동과 부유 환경에서 서로 다른 기전에 의해 유도된다는 기존의 보고<sup>17</sup>와 같이, 정상 쥐 모델에서는 뇌실하 부위 및 선조체 내 신경세포 생성에서도 유사하게 작용됨을 알 수 있었다. 특히 본 연구에서 사용된 부유 환경은 자발적 신체 운동을 위한 수레 바퀴를 포함하고 있었으므로, 자발 운동군 및 부유 환경군 모두에서 뇌실하 부위 및 선조체 내 세포증식 소견이 대조군에 비해 증가된 경향을 보였다고 생각된다.

본 연구에서 부유 환경에 의해 유도된 선조체 내 신경세포 생성이 자체 생성인지 뇌실하 부위에서 선조체 내로 새로 생성된 신경세포가 유입된 것인지를 감별하기 위해서는 doublecortin과 같은 이동성 신경세포(migrating neuron) 표식자로 염색하여 BrdU와 동반 염색되는 소견을 관찰하는 신경조직화학 검사를 시행하거나, 선조체 내에서 뇌실 근위부에 신경세포 생성이 많이 관찰되고 원위부로 갈수록 순차적으로 신경세포 생성이 감소하는 소견을 평가하거나, 특정 표식자를 뇌실하 부위 세포에 삽입하는 기술을 통하여 표식된 세포가 시기별로 이동하는지를 관찰하는 방법 등을 사용할 수 있으며, 이러한 연구는 향후 지속적으로 진행되어야 할 것으로 생각된다. 또한 성숙 신경세포(mature neuron) 표식자인 NeuN 염색을 통해 새로 생성된 세포가 보다 성숙된 신경세포로 분화되고 생존하는지도 판단해야 할 것이다.

결 론

총 12마리의 C57BL/6 쥐 모델을 대상으로 성체 시기에 자발 운동군, 부유 환경군 및 대조군(각 군당 4마리)으로 나

누어 2주 치료 기간 중 12일간 세포증식 인자인 BrdU 복강 내 주사 후 신경 조직학적 평가 결과, 부유 환경군에서 뇌실하 부위 및 선조체 내 신경세포 생성 소견인 BrdU/ $\beta$ III-tubulin<sup>+</sup> 세포가 대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 증가된 소견을 보였다.

자발적 신체 운동을 포함한 부유 환경을 통해 뇌실하 부위 뿐만 아니라 비 신경생성 부위인 선조체 내에도 신경세포 생성이 유도될 수 있으므로, 향후 각종 중추신경계 질환의 치료에 응용될 수 있을 것이다. 즉, 내재성 신경 줄기/전구세포 활성화로 인한 선조체 내 신경세포 생성 증가는 뇌졸중, 뇌성마비 및 헌팅톤 병 등과 같은 중추신경계 질환의 신경재생 및 기능 회복의 주 기전으로 작용할 수 있으므로, 상기 질환 모델에 부유 환경에 의한 치료 효과를 확인하는 연구가 필요하다.

### 참 고 문 헌

- 1) Goldman S. Stem and progenitor cell-based therapy of the human central nervous system. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 862-871
- 2) Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 1999; 2: 266-270
- 3) Praag H, Christie B, Sejnowski T, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 13427-13431
- 4) Kempermann G, Kuhn H, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 1997; 386: 493-495
- 5) Kempermann G, Gast D, Gage FH. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol* 2002; 52: 135-143
- 6) Cho SR, Yim SH, Kim HS. Profit and drawback of rehabilitative therapy in animal models of acute ischemic brain injury. *J Neurocrit Care* 2008; 1: 27-30
- 7) Nygren J, Wieloch T, Pesic J, Brundin P, Deierborg T. Enriched environment attenuates cell genesis in subventricular zone after focal ischemia in mice and decreases migration of newborn cells to the striatum. *Stroke* 2006; 37: 2824-2829
- 8) Brown J, Cooper-Kuhn C, Kempermann G, Praag H, Winkler J, Gage FH, Kuhn H. Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci* 2003; 17: 2042-2046
- 9) Komitova M, Mattsson B, Johansson B, Eriksson P. Enriched environment increases neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the subventricular zone of stroke-lesioned adult rats. *Stroke* 2005; 36: 1278-1282
- 10) Komitova M, Zhao L, Gido G, Johansson B, Eriksson P. Postischemic exercise attenuates whereas enriched environment has certain enhancing effects on lesion-induced subventricular zone activation in the adult rats. *Eur J Neurosci* 2005; 21: 2397-2405
- 11) Pereira A, Huddleston D, Brickman A, Sosunov A, Hen R, McKhann G, Sloan R, Gage FH, Brown T, Small S. An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 5638-5643
- 12) Holmes M, Galea L, Mistlberger R, Kempermann G. Adult hippocampal neurogenesis and voluntary running activity: circadian and dose-dependent effects. *J Neurosci Res* 2004; 76: 216-222
- 13) Berchtold N, Cotman C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci* 2002; 25: 295-301
- 14) Kirschenbaum B, Goldman S. Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival of neurons arising from the adult rat forebrain subependymal zone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 210-214
- 15) Benraiss A, Chmielnicki E, Lerner K, Roh D, Goldman S. Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J Neurosci* 2001; 21: 6718-6731
- 16) Cho SR, Benraiss A, Chmielnicki E, Samdani A, Economides A, Goldman S. Induction of neostriatal neurogenesis slows disease progression in a transgenic murine model of Huntington disease. *J Clin Invest* 2007; 117: 2889-2902
- 17) Olson A, Eadie B, Ernst C, Christie B. Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways. *Hippocampus* 2006; 16: 250-260
- 18) Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 2004; 429: 184-187
- 19) Farmer J, Zhao X, Praag H, Wodtke K, Gage FH, Christie B. Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo. *Neuroscience* 2004; 124: 71-79
- 20) Young D, Lawlor P, Leone P, Dragunow M, During M. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nat Med* 1999; 5: 448-453