

7 테슬라 초고자기장에 노출된 C57BL/6 마우스의 전정신경핵 변화

가천의과대학 의학전문대학원 길병원 이비인후과학교실

김미주, 정민주, 배지혜, 이은지, 김덕현, 한규철

C-fos Expression of Vestibular Nucleus in C57BL/6 Mouse Under the 7 Tesla Ultra High Magnetic Field

Mi-Joo Kim, MD, Min Joo Jung, Ji Hye Bae, Eun Ji Lee, Duk Hyun Kim, Gyu Cheol Han, MD, PhD

Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Gachon University of Medicine and Science, Graduate School of Medicine, Incheon, Korea

• Received Jan 19, 2011
Revised Feb 17, 2011
Accepted Feb 17, 2011

• Corresponding Author:
Gyu Cheol Han, MD, PhD
Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Gachon University of Medicine and Science, Graduate School of Medicine, 1198 Guwol-dong, Namdong-gu, Incheon 405-760, Korea
Tel: +82-32-460-3324
Fax: +82-32-467-9044
E-mail: hangckr@gmail.com

• Copyright © 2011 by
The Korean Balance Society.
All rights reserved.

Background and Objectives: A typical side effect of super high magnetic field is dizziness and it is expected that 7 Tesla (T) super high magnetic field will have temporary influence on vestibular nucleus. Prevalence rate of dizziness generally increases with advancing years, so this study discusses whether the influence of 7 T super high magnetic field differs depending on the age. **Materials and Methods:** C57BL/6 mice weighting from 10-40 g were categorized into 4-week-old and 16-week-old groups. They were exposed to 7 T magnetic field and immunohistochemical staining was done to observe expression of c-fos protein in vestibular nucleus of mice. **Results:** Control group with normal vestibular system did not show c-fos protein. However, mice exposed to 7 T magnetic field showed c-fos expression selectively on medial and lateral parts of vestibular nucleus and there was no significant difference of c-fos expression between both sides ($p < 0.05$). There was statistically significant difference between the different age group: 16-week-old mice group showed higher number of cells expressing c-fos protein than 4-week-old mice group did ($p < 0.05$). **Conclusion:** It is statistically significant that 7 T super high magnetic field is more influential to older age group.

Research in Vestibular Science 2011;10(1):26-29

Key Words: 7 Tesla; Magnetic resonance imaging; c-fos; Vestibular nucleus; Aging

서론

자기공명영상장치는 1970년대 말 도입된 이후 분해능을 향상시키기 위해 지속적으로 높은 자기장이 개발되고 있으며, 현재 미국 식품의약국에서 3 Tesla (T)까지 생물안정성이 인정되고 있고 전 세계적으로 7 T-21 T까지 시험운영 중이다.¹ 하지만 초고자기장의 노출에 대한 안전성 여부는 아직도 논란이 지속되고 있으며, 선행 연구가 부족한 실정이다.

현재까지 보고된 4 T 이상의 초고자기장 노출 시 일어나는 가장 대표적인 부작용은 어지럼증(99%)이다.² 일반적인 평형장애는 손상 말초전정수용기로부터 동측의 전정신경핵으로 구심성 신호의 차단에 의하여 손상 동측 전정신경핵 신경세포의 활동성 감소와 반대측 전정신경핵 신경세포의 활동성 증가로 인한 양측 전정신경핵 신경세포활동성의 비대칭을 초래하여 전정안반사와 전정척수반사의 부조화를 유발한다.³ 초고자기장에 대한 전정신경핵의 반응은 노화에

따른 전정계의 전기 생리학적인 변화에 따라 영향을 받을 것으로 예상된다.⁴

전정기관의 자극이나 손상에 의하여 전정신경핵에서 c-fos 단백질이 발현됨이 보고되어 c-fos 단백질은 전정기관의 기능을 평가하기 위한 흥분성의 표지자로 널리 이용되고 있다. c-fos 단백질은 다양한 흥분적 자극에 의해 15-90분 이내에 특히 활성화된 신경세포에서 발현되며, 일반적으로 c-fos mRNA의 경우 자극 후 수 분 이내에 출현하여 30분 내지 60분경에 최고점을 이룬 후 2시간 내지 4시간 이내에 기저치로 회복되고, c-fos 단백질의 경우 mRNA의 발현 직후부터 전사되기 시작하여 1시간 내지 3시간 경에 최고점을 이룬 후 24시간 내에 기저치로 회복되는 특성을 가지고 있다.^{5,6}

따라서 본 실험은 초고자기장 자기공명영상(magnetic resonance imaging, MRI) 안전성 여부를 규명할 때 연령에 대한 영향을 보기 위하여 7 T 초고자기장에 노출된 4주령과 16주령의 마우스의 전정신경핵에서 c-fos 단백질 발현을 측정하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물

체중 10-40 g의 C57BL/6 마우스(NarabioTec, Seoul, Korea) 139두를 암수 구별 없이 사용하였으며, 특히 전정기능이 정상인 동물을 선택하기 위하여 tail hanging test를 시행한 후 정상 동물을 선택하였다. 실험동물은 4주령과 16주령 양군으로 분류되었다. 이 실험은 가천의과학대학교 동물윤리위원회의 권고에 따라 사육 및 실험이 이루어졌다.

2. 고자기장 자극

인체에 노출되는 고자기장과 유사한 환경을 만들기 위해 마취를 시키지 않고 15×15×5 cm 크기로 구획된 아크릴 케이스의 한 칸에 한 마리씩 넣어 한번에 12마리씩 7 T의 고자기장에 노출시켰다. 실제 MRI 환경과 흡사한 고자기장을 마우스에 노출시킨 것이므로, 소음에 따른 스트레스나, 이에 따른 급성 스트레스(acute stress)로 인한 c-fos 단백질 발현은 가능하지 않다는 전제를 두었다. 이전 연구에서 자기장 노출 시간에 따른 변화를 보기 위하여, 7 T 초고자기장에 C57BL/6 마우스를 각 1시간, 2시간 4시간, 8시간에 노출시킨 결과 2시간 이상 연속 노출되는 경우에 전정 신경핵에

흥분성 신호를 유발한다는 결론이 나왔고,⁷ 이에 따라 본 연구에서는 2시간의 고자기장 자극을 사용하였다. 또한 고자기장 자극에 노출 전후의 마우스들의 내이와 전정 신경 변화에 대해서 알아보기 위해서 행동검사(behavior test)를 실시하였으며, 자극에 노출된 후에도 내이와 전정 신경에 변화가 없음을 알 수 있었다.

3. 면역조직화학염색법

실험동물을 마취 후 pH 7.4의 phosphate buffered saline (PBS)용액으로 심장을 관류하여 혈액을 제거하였다. 다시 4% paraformaldehyde로 관류시킨 후 뇌를 분리하였다. 분리된 뇌는 4% paraformaldehyde에서 3시간 동안 실온에서 고정된 후 30% sucrose에서 2일 이상 방치하였다. Cryostat (Leica, Heidelberg, Germany)를 이용하여 40 μm의 두께로 조직절편을 만들어서 세포 내 peroxidase의 활성을 억제하기 위하여 6% H₂O₂ 용액에서 30분 동안 진탕하고, 그 후 pH 7.4의 PBS 용액으로 3회 이상 세척하고, 0.3% Triton-X 100으로 30분간 진탕한 후 PBS로 3회 이상 세척하였다. 그 후 blocking agent (normal goat serum)를 실온에서 30분간 처리한 다원일차항체(cFos, AB-5, Oncogene Sci, 1:1000; FosB, SC-7203, Santa Cruz, CA, USA)를 4℃에서 하룻밤 동안 반응시킨 후 2시간 동안 실온에서 진탕시키고 PBS로 세척하였다. 이후 이차항체인 biotinylated anti-rabbit & anti-mouse immunoglobulin (DAKO, Glostrup, Denmark)을 실온에서 40분간 처리하여 PBS로 세척하고, streptavidin peroxidase (Vector ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 20분간 처리하여 PBS로 세척한 뒤 발색인자인 0.05% diaminobenzidine으로 발색하였다. PBS로 1시간 동안 세척한 후 조직을 슬라이드 글라스에 부착하여 건조하고 탈수과정을 거쳐 커버 슬라이드를 덮어 광학현미경하에서 진갈색의 c-fos 단백질 발현을 관찰하였다.

4. C-fos 양성 세포 수 측정

Visual studio 6.0, openCV ver. 1.0 (microsoft, USA)와 Prims 4 for windows (Graphpad software Inc., San Diego, CA, USA)을 이용하여 내측 전정신경핵과 외측 전정신경핵에서 c-fos 양성 세포의 수를 측정하였다.

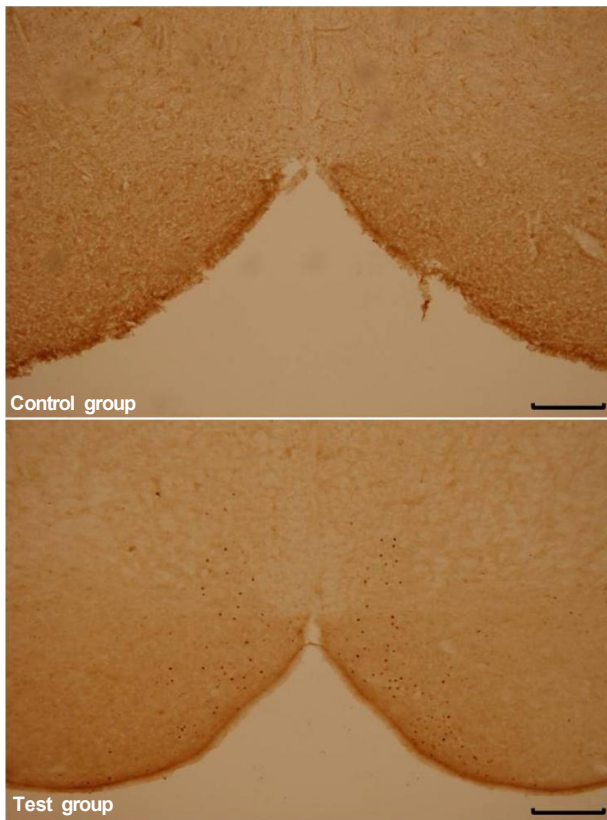


Figure 1. Expression of c-fos protein in the vestibular nuclear complex after 2 hours of exposure by 7 T MRI in C57BL/6 mouse. upper: normal control, immunohistochemical staining, $\times 40$; lower: 4 weeks old age and 2 hours exposure, $\times 40$.

5. 통계분석

엑셀(Microsoft, Redmond, WA, USA)을 이용하며 정리하였고 통계검정은 주령 간에 따른 c-fos 단백질 발현비교를 위해 Unpaired T test with F-test를 이용하여 유의수준 95%로 검증하였다.

결 과

전정기능이 정상인 마우스의 전정신경핵에서 c-fos 단백을 면역조직화학검사를 통해 관찰하였는데, 전정신경핵에서 c-fos 단백질이 관찰되지 않았다. 그러나 7 T 자기장에 2시간 노출된 마우스에서는 c-fos 단백질이 뇌간의 매우 특징적인 부분에서 발현되었는데 특히 양측 내측과 외측 전정신경핵에서 매우 선택적으로 발현되었으며 양측의 c-fos 단백질 발현을 비교하였을 때 마우스의 4주령 군에서는 좌측에서 9.90 ± 5.18 (mean \pm standard deviation)개, 우측에서 11.30 ± 8.07 개, 16주

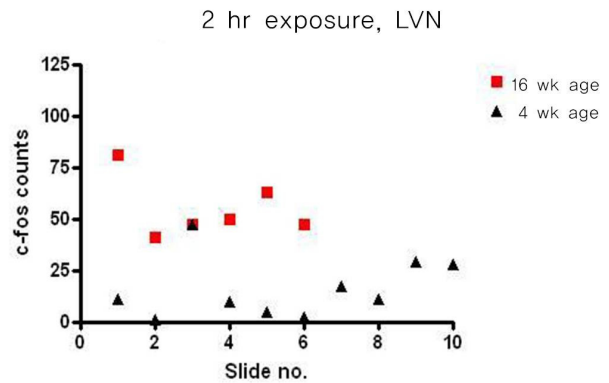


Figure 2. Expression of c-fos protein in the vestibular nuclear complex following exposure of 7 T MRI in 4 weeks and 16 weeks aged C57BL/6 mice. LVN, lateral vestibular nucleus.

령 군에서는 좌측에서 26.19 ± 8.69 개, 우측에서 26.44 ± 12.42 개의 발현을 보여 양측 간에 유의한 차이 보이지 않았다 ($p < 0.05$) (Figure 1). 또한 마우스의 4주령 군에서는 22.86 ± 6.88 개의 발현을 보였으며, 16주령 군에서는 54.83 ± 6.02 개의 발현을 보여 c-fos 양성세포 수에서 유의한 차이를 나타냈다($p < 0.05$) (Figure 2).

고 찰

초고자기장 연구는 자기장 내에서 실험을 해야 하는 연구 방법의 제약이나 어지럼증과 같은 특수 신경계와 관련된 배경지식이 필요하여 연구가 매우 제한적이다. 선행 논문들은 4 T 미만의 자기장을 이용했고 단순한 설문지 결과이며, 자기장 노출시간이 짧아 데이터의 유용성이 떨어졌다.⁸ 또한 양측성 전정질환연구에서 수술적 처치법이나 약물에 의한 화학미로절제술 등은 표준화하기 어려운 단점이 있었다.⁹

본 연구에서 관찰한 c-fos 단백질은 양측 내측 및 외측 전정신경핵에서 매우 선택적인 발현을 보였다. 외측 전정신경핵은 전정척수반사 조절에 중요한 역할을 하며, 내측 전정신경핵은 안구와 두부 및 경부의 운동조절 및 전정척수반사와 관련한 원심성 신경로가 존재한다는 것이 확인되었다.^{10,11} 따라서 본 연구에서의 c-fos 단백질 발현 양상으로 볼 때 7 T MRI의 영향은 전정척수반사나 안구와 두부 및 경부의 운동조절의 변화와 밀접한 관련이 있을 것으로 생각된다. 또한 양측 간의 c-fos 단백을 비교하였을 때 유의한 차이를 나타내지 않는 것으로 보아 일측 전정기관 손상 후에 좌우 비대칭 발현이 보고된 바와는 달리¹² 7 T MRI는 양측 전정계에 동일한 영향을 주고 있음을 시사한다.

본 연구 결과에 의하면 마우스 주령에 따라 c-fos 단백질 발현 정도가 유의하게 차이가 났으며 고령군에서 고자기장에 영향을 더 많이 받는 양상으로 나타났는데 이에 대해 아직까지 밝혀진 바는 없으나, 나이가 들수록 전정신경핵의 신경세포에서 지방갈색소의 침착, 축삭의 퇴행과 함께 신경세포의 수도 감소하게 되는데 이런 변화와 관련이 있을 것으로 생각된다.¹³⁻¹⁵

면역조직화학염색에 의해 나타난 c-fos 단백질의 수를 정량화하는 방법에서 본 연구에 사용된 방법은 측정자에 따라 다른 결과를 가져올 수 있으나, 이는 면역조직화학염색 해석에 내재된 문제로 내부적으로 흔히 사용하는 image J와 본 실험실에서 제작한 counting program을 비교하였을 때 차이는 오차범위 이내였고 오히려 사용자 위주로 제작된 프로그램이어서 사용자간 오차를 더 줄일 수 있었다($p < 0.05$).

결론

본 연구 결과에 따르면 마우스에서 연령의 증가에 따라 7 T의 영향이 증가하였다. 따라서 고령군에서 좀 더 안정한 초고자기장 노출에 대한 대책이 강구되어야 할 것이다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업입(No.313-2008-2-E00385).

중심 단어: 7 테슬라, 자기공명영상, c-fos, 전정핵, 노화

REFERENCES

1. **Schenck JF.** Safety of strong, static magnetic fields. *J Magn Reson Imaging* 2000;12:2-19.
2. **Franco G, Perduri R, Murolo A.** Health effects of occupational exposure to static magnetic fields used in magnetic resonance imaging: a review. *Med Lav* 2008;99:16-28.
3. **Jensen DW.** Survival of function in the deafferented vestibular nerve. *Brain Res* 1983;273:175-8.
4. **Hale WE, Perkins LL, May FE, Marks RG, Stewart RB.** Symptom prevalence in the elderly. An evaluation of age, sex, disease, and medication use. *J Am Geriatr Soc* 1986; 34:333-40.
5. **Kitahara T, Takeda N, Saika T, Kubo T, Kiyama H.** Effects of MK801 on Fos expression in the rat brainstem after unilateral labyrinthectomy. *Brain Res* 1995;700:182-90.
6. **Cirelli C, Pompeiano M, D'Ascanio P, Arrighi P, Pompeiano O.** c-fos Expression in the rat brain after unilateral labyrinthectomy and its relation to the uncompensated and compensated stages. *Neuroscience* 1996;70:515-46.
7. **Han GC, Lee EJ, Bae JH, Kim MJ.** Vestibular nucleus changes in C57BL/6 after exposed to 7 tesla. *Res Vestibul Sci* 2010;9(Suppl 2):S139.
8. **Schenck JF, Dumoulin CL, Redington RW, Kressel HY, Elliott RT, McDougall IL.** Human exposure to 4.0-Tesla magnetic fields in a whole-body scanner. *Med Phys* 1992; 19:1089-98.
9. **Glover PM, Bowtell R.** Measurement of electric fields induced in a human subject due to natural movements in static magnetic fields or exposure to alternating magnetic field gradients. *Phys Med Biol* 2008;53:361-73.
10. **Wilson VJ, Wylie RM, Marco LA.** Projection to the spinal cord from the medial and descending vestibular nuclei of the cat. *Nature* 1967;215:429-30.
11. **Brandt T.** Vertigo: its multisensory syndromes. 2nd ed. London: Springer Verlag; 1991. p.5-21.
12. **Goto MM, Romero GG, Balaban CD.** Transient changes in flocculonodular lobe protein kinase C expression during vestibular compensation. *J Neurosci* 1997;17:4367-81.
13. **Sturrock RR.** Age related changes in neuron number in the mouse lateral vestibular nucleus. *J Anat* 1989;166:227-32.
14. **Sloane PD, Baloh RW, Honrubia V.** The vestibular system in the elderly: clinical implications. *Am J Otolaryngol* 1989; 10:422-9.
15. **Johnson JE Jr, Miquel J.** Fine structural changes in the lateral vestibular nucleus of aging rats. *Mech Ageing Dev* 1974;3: 203-24.