



# 그렐린이 혈관성 치매 쥐의 기억 손상에 미치는 효과

박종민<sup>1</sup> · 김연정<sup>2</sup>

경희대학교 간호과학대학

## Effect of Ghrelin on Memory Impairment in a Rat Model of Vascular Dementia

Park, Jong-Min · Kim, Youn-Jung

College of Nursing Science, Kyung Hee University, Seoul, Korea

**Purpose:** The purpose of this study was to identify the effect of ghrelin on memory impairment in a rat model of vascular dementia induced by chronic cerebral hypoperfusion. **Methods:** Randomized controlled groups and the posttest design were used. We established the representative animal model of vascular dementia caused by bilateral common carotid artery occlusion and administered 80 µg/kg ghrelin intraperitoneally for 4 weeks. First, behavioral studies were performed to evaluate spatial memory. Second, we used molecular biology techniques to determine whether ghrelin ameliorates the damage to the structure and function of the white matter and hippocampus, which are crucial to learning and memory. **Results:** Ghrelin improved the spatial memory impairment in the Y-maze and Morris water maze test. In the white matter, demyelination and atrophy of the corpus callosum were significantly decreased in the ghrelin-treated group. In the hippocampus, ghrelin increased the length of hippocampal microvessels and reduced the microvessels pathology. Further, we confirmed angiogenesis enhancement through the fact that ghrelin treatment increased vascular endothelial growth factor (VEGF)-related protein levels, which are the most powerful mediators of angiogenesis in the hippocampus. **Conclusion:** We found that ghrelin affected the damaged myelin sheaths and microvessels by increasing angiogenesis, which then led to neuroprotection and improved memory function. We suggest that further studies continue to accumulate evidence of the effect of ghrelin. Further, we believe that the development of therapeutic interventions that increase ghrelin may contribute to memory improvement in patients with vascular dementia.

**Key words:** Ghrelin; Dementia; Memory Disorders

## 서론

### 1. 연구의 필요성

혈관성 치매(vascular dementia [VaD])는 혈관의 폐색이나 혈관

질환으로 발생한 만성 대뇌 저관류(chronic cerebral hypoperfusion)로 인하여 뇌의 혈류량이 감소하면서 점진적으로 기억력의 저하, 문제해결능력의 감퇴 및 사고 장애 등의 증상이 나타나는 질환으로 전체 치매 중 알츠하이머성 치매(Alzheimer's disease [AD]) 다음으로

주요어: 그렐린, 치매, 기억 장애

\* 이 논문은 제1저자 박종민의 박사학위논문의 축약본임.

\* 본 연구는 2017년도 한국연구재단 지원에 의해 수행되었음.

\* This manuscript is a condensed form of the first author's doctoral dissertation from Kyung Hee University.

\* This study was supported by the National Research Foundation of Korea funded by the Ministry of Education (NRF-2017R1A2B4012775).

Address reprint requests to : Kim, Youn-Jung

College of Nursing Science, Kyung Hee University, 26 Kyungheedaero-ro, Dongdaemun-gu, Seoul 02453, Korea

Tel: +82-2-961-0311 Fax: +82-2-961-9398 E-mail: yj129@khu.ac.kr

Received: January 11, 2019 Revised: May 2, 2019 Accepted: May 8, 2019

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution NoDerivs License. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nd/4.0>)

If the original work is properly cited and retained without any modification or reproduction, it can be used and re-distributed in any format and medium.

가장 큰 비율을 차지하고 있다[1]. VaD를 일으키는 병리적 기전은 아직 명확히 밝혀지지 않았으나, AD와는 달리 만성 대뇌 저관류로 유도된 저산소증으로 인하여 산화 스트레스, 염증, 혈관 및 혈액-뇌 장벽의 손상이 동반된다고 알려져 있다[2]. 현재까지의 연구 결과를 살펴보면 저산소증으로 유발된 산화 스트레스는 미토콘드리아의 기능 이상을 유발하며, 체내의 활성산소를 증가시켜서 혈관과 신경세포에 손상을 일으킨다[3]. 혈류 감소로 인한 저산소증은 또한 미세혈관의 형태 및 기능 이상을 일으켜 내피세포의 기능 장애, 혈액-뇌 장벽의 붕괴 및 염증을 유발한다[4]. 이 때 혈액-뇌 장벽의 붕괴 시 방출되는 염증 인자들에 의하여 백색질에서 말이집탈락, 축삭소실, 희소돌기아교세포의 퇴행이 나타난다[5]. 염증으로 인하여 미세아교세포가 활성화되고[6], 투과도가 커진 혈액-뇌 장벽을 통하여 인터루킨 1, 인터루킨 6과 같은 염증 유발인자가 침투하여 백색질의 손상을 더욱 악화시킨다[5]. 이로 인해 해마에서 신경재생, 시냅스 가소성, 가지돌기(dendrite) 밀도가 감소되고 백색질의 손상이 나타나 기억 손상이 유발된다[7]. 주로 이러한 손상은 대뇌겉질(cerebral cortex), 해마(hippocampus), 백색질(white matter)에서 나타나며 기억 손상, 기분 장애, 문제해결, 수행기능의 상실과 같은 증상들을 유발시킨다[1].

VaD의 임상적 유형은 다발경색 치매(multi-infarct dementia), 겹질밀 치매(subcortical dementia), 혼합형 치매(mixed dementia), 겹질밀 경색과 백색질 뇌증을 동반한 보통염색체우성뇌혈관병변(cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy [CADASIL]) 등이 있다[8]. 이와 같이 VaD는 다양한 임상적 특성을 나타내기 때문에 질병 발생기전의 이해 및 치료제 개발을 위하여 다양한 동물 모델이 개발되어 연구가 진행되고 있다. 대표적인 VaD 모델은 양측 온목동맥 폐색(bilateral common carotid artery occlusion [BCCAO])모델이다. BCCAO 모델은 양측 온목동맥을 영구적으로 결찰하여 만성 대뇌 저관류를 유도하며, 대뇌겉질 및 해마의 손상, 백색질의 말이집탈락, 미세혈관 기능 이상 등 사람의 VaD와 유사한 병태생리를 나타내기 때문에 동물 모델 중에서 가장 널리 사용되고 있다[9].

현재 VaD의 예방을 위하여 항고지혈증제, 항고혈압제, 항혈소판제 등 뇌혈관질환을 예방할 수 있는 약물들이 효과가 있다고 알려져 있다[8]. 치료 약물은 AD의 치료에 사용되는 N-메틸-D 아스파르트산염(N-methyl-D-aspartate [NMDA]) 수용체 길항제인 memantine과 아세틸콜린에스테라아제 억제제인 galantamine, donepezil, rivastigmine 등의 약물이 효과가 있다고 보고되었으나 VaD 치료 목적으로 Food and Drug Administration (FDA) 승인을 받은 약물은 없다[10]. 또한 비약물적 중재 대부분의 연구가 AD 환자들을 대상으로 인지기능 증진 및 행동심리증상 감소를 위하여 연구들이 진행

되었으며, 인지 훈련, 인지 자극, 신체 운동, 음악 요법, 회상 요법이 기억 능력을 향상하는데 효과가 있는 것으로 확인되었다[11]. 따라서 VaD에 대한 연구가 매우 부족한 실정으로 치매 대상자의 손상된 인지기능을 회복시키기 위하여 AD뿐만 아니라 VaD의 병태생리에 대한 정확한 이해와 치료약물 및 중재의 개발도 꼭 필요하다.

최근 들어, 그렐린(ghrelin)이 학습과 기억에 효과가 있다는 연구 결과가 보고되고 있다[12]. 그렐린은 위 기저부, 시상하부, 해마, 대뇌겉질 등에서 배고픔을 느낄 때 분비되는 호르몬으로 성장호르몬 분비촉진인자 수용체(growth hormone secretagogue receptor [GHS-R])와 결합한다[13]. 그렐린은 28개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 1999년에 Kojima 및 그의 동료들이 처음 발견한 이후로 뇌하수체 성장호르몬의 분비 자극, 식욕, 대사, 위산 분비 증진 및 위 운동 증진, 평균 동맥압 감소 등 다양한 기능을 가지고 있다고 알려져 왔다[14]. 그렐린은 주로 뇌하수체로부터 성장호르몬의 분비를 촉진하고, 시상하부의 활꼴핵(arcuate nucleus)에 있는 신경펩티드 Y (neuropeptide Y)/아구티관련펩티드(agouti-related peptide)를 주로 발현하는 신경세포를 활성화시켜 배고픔을 느끼게 하여 음식물 섭취를 유도하는 역할을 한다[13].

식욕 조절 기능 이외에도 그렐린은 해마의 가지돌기에서 새로운 가지의 생성을 증가시켜서 시냅스에서 일어나는 신경전달을 증진시키는 시냅스 가소성 및 해마의 치아이랑(dentate gyrus) 부위에서 일어나는 신경 재생을 통하여 학습과 기억 능력을 증진시킨다[15,16]. 이러한 기능은 다양한 선행연구를 통해 확인되었다[16-19]. 신경퇴행성 질환인 AD모델에서 그렐린 투여 후 대뇌의 염증과 신경세포 소실이 감소되어 신경 보호 효과가 있음을 확인하였고[15], 허혈성 뇌질환 모델에서도 대뇌겉질 및 해마의 신경세포 소실을 감소시키는 것으로 관찰되어 그렐린이 신경퇴행성 질환 및 허혈성 질환에서 신경 보호의 역할을 한다고 보고되었다[20]. 또한 세포수준의 연구에서도 허혈성 심장질환 모델에서 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor [VEGF]), 혈관내피성장인자수용체2(vascular endothelial growth factor receptor 2 [VEGFR2]), 혈관내피산화질소합성효소(endothelial nitric oxide synthase)를 증가시켜 새로운 혈관이 생성되는 혈관 신생(angiogenesis) 작용을 유도하였다[21]. 이외에 외상성 뇌 손상에서 백색질의 별아교세포(astrocyte)를 감소시켜 염증반응을 경감시켰다[22]. 따라서 선행연구들을 바탕으로 VaD에서 그렐린의 투여가 백색질 및 해마의 손상을 감소시키고 혈관신생을 통한 학습과 기억을 증진시키는 중재로서의 가능성을 검토하고자 한다. 그렐린으로 인해 해마에서 혈관신생이 유도된다면 충분한 혈액 공급으로 인하여 시냅스 가소성과 신경재생이 더욱 활발하게 일어나 기억 증진 효과가 있을 것이며, 또한 그렐린이 백색질의 말이집탈락(demyelination)을 감소시킨다면 기억을 포함한

뇌의 통합기능 향상에 효과가 있을 것이다.

이에 본 연구는 그렐린이 BCCAO로 유발된 VaD 쥐의 기억 손상에 미치는 효과를 행동학적, 분자생물학적 방법을 통해 확인하여 중재 개발을 위한 기초 자료로 활용하고자 하였다.

## 2. 연구 목적

본 연구의 목적은 VaD 쥐에게 그렐린을 4주간 복강 내 투여한 후 기억 손상에 미치는 효과를 행동학적, 분자생물학적으로 파악하기 위함이다.

## 3. 연구 가설

1) 가설 1. 그렐린 투여군은 비투여군보다 공간 학습과 기억 능력이 향상될 것이다.

2) 가설 2. 그렐린 투여군은 비투여군보다 백색질의 말아집 손상이 더 적을 것이다.

① 부가설 1. 그렐린 투여군은 비투여군보다 백색질의 말아집의 수가 더 많을 것이다.

② 부가설 2. 그렐린 투여군은 비투여군보다 백색질이 더 두꺼울 것이다.

3) 가설 3. 그렐린 투여군은 비투여군보다 해마의 신경세포와 미세혈관의 손상 정도가 더 적을 것이다.

① 부가설 1. 그렐린 투여군은 비투여군보다 해마의 신경세포의 수가 더 많을 것이다.

② 부가설 2. 그렐린 투여군은 비투여군보다 해마의 미세혈관의 수가 더 적을 것이다.

③ 부가설 3. 그렐린 투여군은 비투여군보다 해마의 미세혈관의 길이가 더 길 것이다.

4) 가설 4. 그렐린 투여군은 비투여군보다 해마의 혈관 신생 관련 인자의 발현이 더 많을 것이다.

① 부가설 1. 그렐린 투여군은 비투여군보다 해마의 VEGF 발현량이 더 많을 것이다.

② 부가설 2. 그렐린 투여군은 비투여군보다 해마의 VEGFR2 발현량이 더 많을 것이다.

③ 부가설 3. 그렐린 투여군은 비투여군보다 해마의 phospho-Akt 발현량이 더 많을 것이다.

## 연구 방법

### 1. 연구 설계

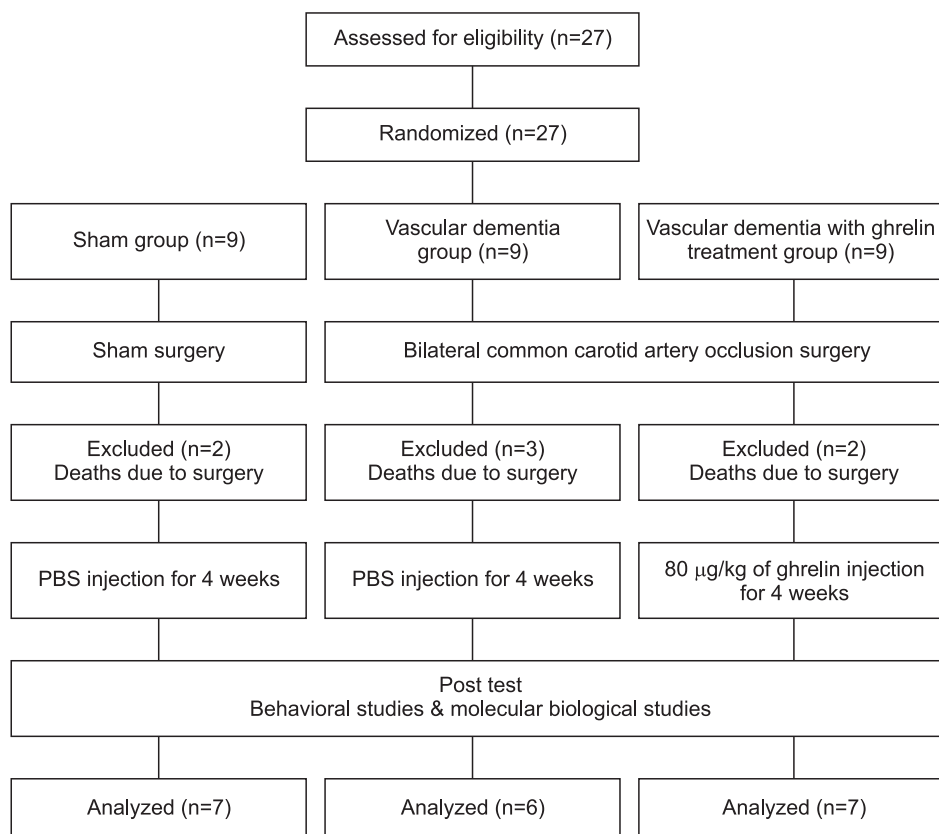
본 연구는 BCCAO로 유발된 VaD 쥐에게 그렐린을 투여한 후 기억 손상에 미치는 효과를 규명하기 위한 무작위 대조군 사후설계이다.

### 2. 연구 대상

실험동물은 11주령의 수컷 Wistar 쥐를 공급받아 무작위화 프로그램(an online random number generator, www.randomizer.or)을 이용하여 모의 대조군(sham, n=7), 양측 온목동맥 폐색군(VaD, n=6), 양측 온목동맥 폐색 및 그렐린 투여군(VaD+ghrelin, n=7)으로 무작위 배정하였다. 본 연구의 표본 수는 사전 연구 또는 선행 연구가 거의 없으므로 효과크기를 산정하기 어렵고, 검정력 분석 방법(power analysis)으로 산정하기 어려우므로 표준편차 및 효과 크기에 대한 정보가 없을 때 총 분산을 이용한 오차 추정 방법을 이용한 표본 수 산정 방법인 자원 방정식(resource equation) 방법을 이용하여 계산하였다[23]. 오차 자유도(error degrees of freedom)가 10 이하일 경우에는 결과 값에 영향을 줄 수 있고, 20 이상일 경우 위의 숫자가 증가해도 결과 값에 크게 영향을 미치지 않으므로 동물 보호를 위하여 오차 자유도 10~20사이로 유지하는 것이 적절하다. 오차 자유도는 총 마리 수의 자유도에서 실험 간 자유도(treatment degree of freedom)를 빼서 계산한다. 오차 자유도 값이 18로 적절하게 측정되기 위하여 각 그룹 당 7마리씩의 쥐가 필요하다. 따라서 양측 온목동맥 폐색으로 인한 사망률이 20% 내외로 알려진 것을 고려하여 각 군 당 9마리씩 총 27마리를 연구에 사용하였으나, 수술 후 모의 대조군에서 2마리, 양측 온목동맥 폐색군에서 3마리, 양측 온목동맥 폐색 및 그렐린 투여군에서 2마리가 사망하여 총 7마리를 제외한 20마리로 실험을 진행하였다(Figure 1). 실험기간 동안 평균 온도 23±2℃, 습도 50±2%로 유지하며, 밤낮 주기(12시간 light/12시간 dark, light turn on 6 am)가 조절되는 환경에 수용하면서 실험 기간동안 물과 고형 사료는 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

### 3. 윤리적 고려

본 연구는 K대학교 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호: KHU-ASP(SE)-16-046)을 받은 후 규정에 따라 실행하였다. 본 연구자는 실험동물 복지 및 윤리 교육과정을 이수하였으며, 동물 다루기, 마취제 투여, 통증 감소를 위한 교육을 받았다. 또한 실험동물의 3R원칙인 실험동물의 대체(replacement), 실험동물 수의 감소(reduction), 동물실험의 세련화(refinement)에 따라 동물 실험 방법을 준수하였다. 약물 투여가 중재로 사용되는 실험이기 때문에 쥐를 대상으로 한 실험 방법이 필요하였고, 동물 수를 감소시키기 위하여 자원 방정식 방법을 사용하여 실험에 참여하는 동물의 수를 최소화 하였다. 또한 수술 후 회복 기간을 포함한 실험 기간 동안 동물을 청결하고 따뜻한 환경에서 사육할 수 있도록 노력하였다.



PBS=phosphate buffered saline.

Figure 1. Flow of the study.

#### 4. 실험 방법

##### 1) 양측 온목동맥 폐색 수술(bilateral common carotid artery occlusion [BCCAO])

양측 온목동맥 폐색 수술은 VaD 대상자의 신경병리학적, 행동학적 주요 임상적 특성과 유사한 변화를 동물에게 유발시키는 방법이다. 정중선 절개를 통하여 피부 및 근육 안쪽의 온목동맥을 노출시키고, 목혈관 신경집과 미주 신경을 조심스럽게 분리한 뒤 양측의 온목동맥을 3-0 봉합사(Black Silk, Ailee Company Limited, Busan, Republic of Korea)를 이용하여 영구적으로 두 번 결찰하였다. 모의 대조군은 수술로 인한 영향을 통제하기 위하여 같은 절차를 수행하였으나 온목동맥 결찰을 시행하지 않았다. 피부 봉합 후 회복기간 동안 쥐에게 따뜻하고 청결한 환경을 제공하여 통증 및 감염을 최소화하려고 노력하였다.

##### 2) 그렐린 투여

양측 온목동맥 폐색 및 그렐린 투여 군에게 BCCAO 수술 10주

후부터 아실화 된 그렐린 80 µg/kg (Peptides International, Incorporation, Louisville, KY, USA)을 1 ml의 인산염 완충 식염수(phosphate buffered saline, PBS; Gibco Laboratories, Grand Islands, NY, USA)에 녹여 4주 간 매일 같은 시간에 복강 내 투여(intraperitoneal injection)하였다. 모의 대조군 및 양측 온목동맥 폐색군은 복강 내 주사로 인한 통증 또는 스트레스 등이 미치는 영향을 고려하여 1 ml의 PBS를 동일한 방법으로 4주 간 주입하였다.

##### 3) 행동 실험

###### (1) Y-미로 검사(Y-maze test)

Y-미로 검사는 단기 기억 중 하나인 공간 작업 기억을 평가하기 위한 검사로서 그렐린 투여 다음 날에 시행되었다[24]. 나무로 구성된 Y자형 미로는 각각의 팔이 길이 25 cm, 높이 14 cm, 너비 5 cm로 동일한 각도(120°)로 이루어져 있다. 검사는 각각의 팔을 A, B, C 영역으로 지정하고 쥐를 C 영역에서 시작하여 5분간 1회 자유롭게 움직이게 하여 쥐의 움직임을 기록하였다. 본 실험에 참여하지 않은 연구자에게 각 군의 정보를 제공하지 않은 상태에서 실시간으로



기록하며, 각 팔의 출입 기록은 쥐의 뒷다리가 미로의 절반이상을 통과하였을 때만 인정하였다. 교대(alternation)는 A→B→C 또는 C→A→B 와 같이 각각 3개의 팔을 연속으로 통과한 경우를 말하며, 공간 작업 기억 능력이 좋을수록 교대율은 높게 측정된다. 교대율을 계산하는 산식은 다음과 같다.

$$\text{교대율(\%)} = (\text{교대/팔에 들어간 총 횟수} - 2) \times 100$$

#### (2) 수중 미로 검사(Morris water maze test [MWM])

수중 미로 검사는 학습과 기억능력을 평가하기 위한 검사로서 Y-미로 검사가 끝난 다음날에 이어서 7일간 시행되었다[25]. 수중 미로는 물(22±2℃)이 채워진 원형 풀(직경 200 cm, 높이 35 cm)에 수중 시야를 흐리게 만들기 위하여 탈지분유 1 kg을 첨가하여 불투명하게 만들고, 사분면 중 한 곳에 수면에서 1.5 cm 깊이에 숨어있는 도피대를 만든다. 주위의 벽에는 다양한 색과 모양의 시각적 단서가 표시되어 있어 쥐가 공간을 기억하는데 도움이 되도록 하였고, 비디오 레코더가 천정에 달려 있어서 추적 장치(SMART video tracking system, Pan-Lab, Barcelona, Spain) 프로그램을 이용하여 쥐의 움직임을 추적하여 저장하고 사후 분석에 이용하였다. 본 검사는 6일 동안의 훈련기 후에 7일째에 1회의 프로브 검사(probe test)를 통하여 학습과 공간 기억능력을 평가하였다. 훈련기의 1회 시행 때 입수했던 지점과 다른 지점에서 출발시키고, 제거된 도피대의 위치로 쥐가 방문한 횟수를 60초 동안 측정하였다. 공간 기억 능력이 좋을수록 도피대를 제거한 위치로 방문한 횟수가 증가한다. 방문 횟수는 추적 장치의 쥐의 동선을 통하여 분석하였다.

#### 4) 분자생물학 실험

##### (1) 면역조직화학법(Immunohistochemistry)

면역조직화학법은 항원-항체 반응을 이용하여 특정 시약으로 표지된 단백질의 분포 및 양을 시각화하는 실험 방법이다. 냉동 절편기를 사용하여 뇌 조직을 40 μm 두께로 연속 관상 절편하여 부위별로 4℃ 냉장 보관된 조직을 세척 후, 내인성 과산화효소를 제거하기 위하여 30.0% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)를 1/10으로 희석하여 30분간 반응시켰다. 그리고 1%의 소 혈청 알부민(bovine serum albumin [BSA]) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)에 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 1차 항체로는 anti-NeuN (Neuronal marker; 1:1000; Millipore, Bedford, MA, USA), anti-MBP (myelin basic protein; 1:200; Abcam, Cambridge, MA, USA), anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein; 1:500; Abcam, Cambridge, MA, USA), anti-RECA-1 (rat endothelial cell antibody; 1:500; Abcam, Cambridge, MA, USA)를 차

레로 4℃에서 24시간 동안 반응시키고, 다음 날 5분씩 3회 세척하였다. 그리고 2차 항체인 anti-mouse immunoglobulin (Ig) G (1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), anti-rat IgG (1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), anti-goat IgG (1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 0.05M PBS에 5분씩 3회 세척 후 발색 전에 ABC (avidin-biotin complex, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)용액에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척 후, 발색을 위하여 diaminobenzidine (DAB)을 함유하고 있는 DAB kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 사용하여 각 군 간에 동일한 시간을 반응시켰다. 슬라이드의 조직을 탈수(dehydration) 시킨 후 커버 슬라이드를 덮었다. 조직 사진은 광학현미경(BX51, Olympus, Tokyo, Japan)으로 촬영하고 세포 수 측정, 뇌량의 두께 측정, 미세 혈관의 길이 정량 분석을 위하여 Image-Pro Plus version 6.3 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) 프로그램을 사용하였다. 백색질 부위는 최소 5개 영역 이상을 선택하여 분석을 시행하였으나 해마(cornu ammonis [CA]) 1 부위는 얇은 층으로 구성되어 있기 때문에 전 영역 분석(total analysis)을 시행하였다.

##### (2) 면역형광법(Immunofluorescence)

면역형광법은 항체의 표식에 형광 색소를 이용하여, 형광 표식을 검출하는 것으로 특정 단백질의 존재를 밝히는 방법이다. 1차 항체로는 RECA-1과 VEGFR2 (1:500; Bioworld, Louis Park, MN, USA)를 동시에 4℃에서 24시간 동안 반응시키고, 다음 날 5분씩 3회 세척하였다. 2차 항체에는 형광 색소(fluorochrome)가 결합되어 있어 어두운 곳에서 2차 항체인 Alexa Fluor 488 (1:1000; Abcam, Cambridge, MA, USA)을 상온에서 2시간 동안 반응시킨 후 PBS를 사용하여 5분씩 5회 충분히 세척하고, 조직을 슬라이드 글라스에 붙여 건조시킨 후 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)로 커버 글라스를 덮었다. 사진은 형광 현미경(E400, Nikon, Tokyo, Japan)을 사용하여 조직을 촬영하였다.

##### (3) 웨스턴블롯(Western blot)

웨스턴블롯은 단백질을 젤에서 크기 별로 분리하여, 막으로 옮겨서 항원-항체 반응을 통하여 특정 단백질의 양을 측정할 수 있는 방법이다. 해당 부위의 조직을 균질화시킨 후 단백질 정량화를 시행하였다. 단백질을 10.0% 나트륨 도데실 황산염 폴리아크릴아미드 겔 전기 이동(sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)을 통하여 80 V로 20분, 그리고 100 V로 1시간 20분간 크기별로 분해하여 폴리비닐리덴(Polyvinylidene difluoride; Merck

Millipore, Darmstadt, Germany)막 위로 전기영동시켰다. 이 후 단백질이 전이된 막을 BSA에 반응시킨 후 1차 항체로는 anti-VEGF (1:500; Abcam, Cambridge, MA, USA), anti-VEGFR2, anti-pAKT (1:500; Cell Signaling, Beverly, MA, USA)를 4℃에서 하룻밤 동안 처리한 후, 이어서 Horseradish Peroxidase (HRP)와 결합된 2차 항체 anti-mouse IgG-HRP (1:5000; Santa Cruz, San Antonio, Texas, USA), goat anti-rabbit IgG-HRP (1:5000; Santa Cruz, San Antonio, Texas, USA)를 2시간에 걸쳐 적용하였다. 그 후, 향상된 화학 발광 웨스턴블롯 검출 시스템(Bio-Rad laboratories, Richmond, CA, USA)을 사용하여 막 완충액에서 10 분 동안 3 회 세척한 후 막의 단백질 발현의 양을 암실에서 필름(Agfa, Mortsel, Belgium)으로 옮겼다. 단백질의 양을 표준화하기 위해, 모든 막에 1차 항체로  $\beta$ -actin (1:5000, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA)을 사용하여 함께 검사를 진행하여 총 단백질 양에 대한 대조군으로 사용하였다. 필름에 옮겨진 단백질 밴드를 스캔하여 Image J 1.42q (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)로 정량화하였다.

#### 5) 통계적 분석

실험결과와 통계적 분석은 SPSS version 23.0 (IBM SPSS, IL, USA)을 이용하였다. 모든 자료는 평균 $\pm$ 표준오차로 나타내었으며, 측정 변수의 정규성검정(Shapiro-Wilk) 결과, 모두 정규분포를 따르는 것으로 확인되어 일원 분산분석(one-way analysis of variance) 방법을 사용하였다. 유의수준은 .05로 분석하며, Levene 통계량을 사용하여 분산의 동질성 검사를 시행하였으며, 등분산을 가정하는 하는지 확인 후 사후 분석에서 Scheffe의 검정 방식을 채택하였다.

## 연구 결과

### 1. 가설검정

#### 1) 가설1

Y-미로를 통한 쥐의 공간 작업 기억능력을 측정한 교대율은 모의 대조군(70.57%)과 온목동맥 폐색 및 그렐린 투여군(72.14%)이 양측 온목동맥 폐색군(57.17%) 보다 높았다( $p < .001$ ).

수중 미로를 통한 쥐의 공간 학습과 기억 능력을 측정한 프로브 검사의 결과도 모의 대조군(4.00회)과 양측 온목동맥 폐색 및 그렐린 투여군(2.93회)이 양측 온목동맥 폐색군(1.96회)보다 높아서( $p < .001$ ) 가설1은 지지되었다(Table 1).

#### 2) 가설2

백색질의 대표적인 부위인 뇌량(corpus callosum) A, B, C 영역을 측정한 두께의 평균은 모의 대조군(94.60  $\mu$ m), 양측 온목동맥 폐색군(86.80  $\mu$ m), 양측 온목동맥 폐색 및 그렐린 투여군(94.45  $\mu$ m)간에 차이가 있었는데( $p = .009$ ), 추가 분석한 결과 양측 온목동맥 폐색 및 그렐린 투여군은 양측 온목동맥 폐색군보다 유의하게 높아( $p = .017$ ) 가설 2의 부가설 1은 지지되었다(Figure 2C).

뇌량에서 신경의 수초화에 중요한 역할을 하는 단백질인 MBP를 이용하여 염색된 말미집의 상대적인 광학밀도 비율(relative optical density ratio)은 모의 대조군(0.18), 양측 온목동맥 폐색군(0.12), 양측 온목동맥 폐색 및 그렐린 투여군(0.17)간에 차이가 있었는데( $p = .016$ ), 추가 분석한 결과 양측 온목동맥 폐색 및 그렐린 투여군은 양측 온목동맥 폐색군보다 유의하게 높아( $p = .034$ ) 가설 2의 부가설 2는 지지되었다(Figure 2D).

#### 3) 가설 3

해마에서 NeuN에 의해 염색된 신경세포 수는 모의 대조군(125.63개), 양측 온목동맥 폐색군(132.00개), 양측 온목동맥 폐색 및 그렐린 투여군(115.25개)간에 유의한 차이가 없어서( $p = .440$ ) 가설 3의 부가설 1은 기각되었다(Figure 2A).

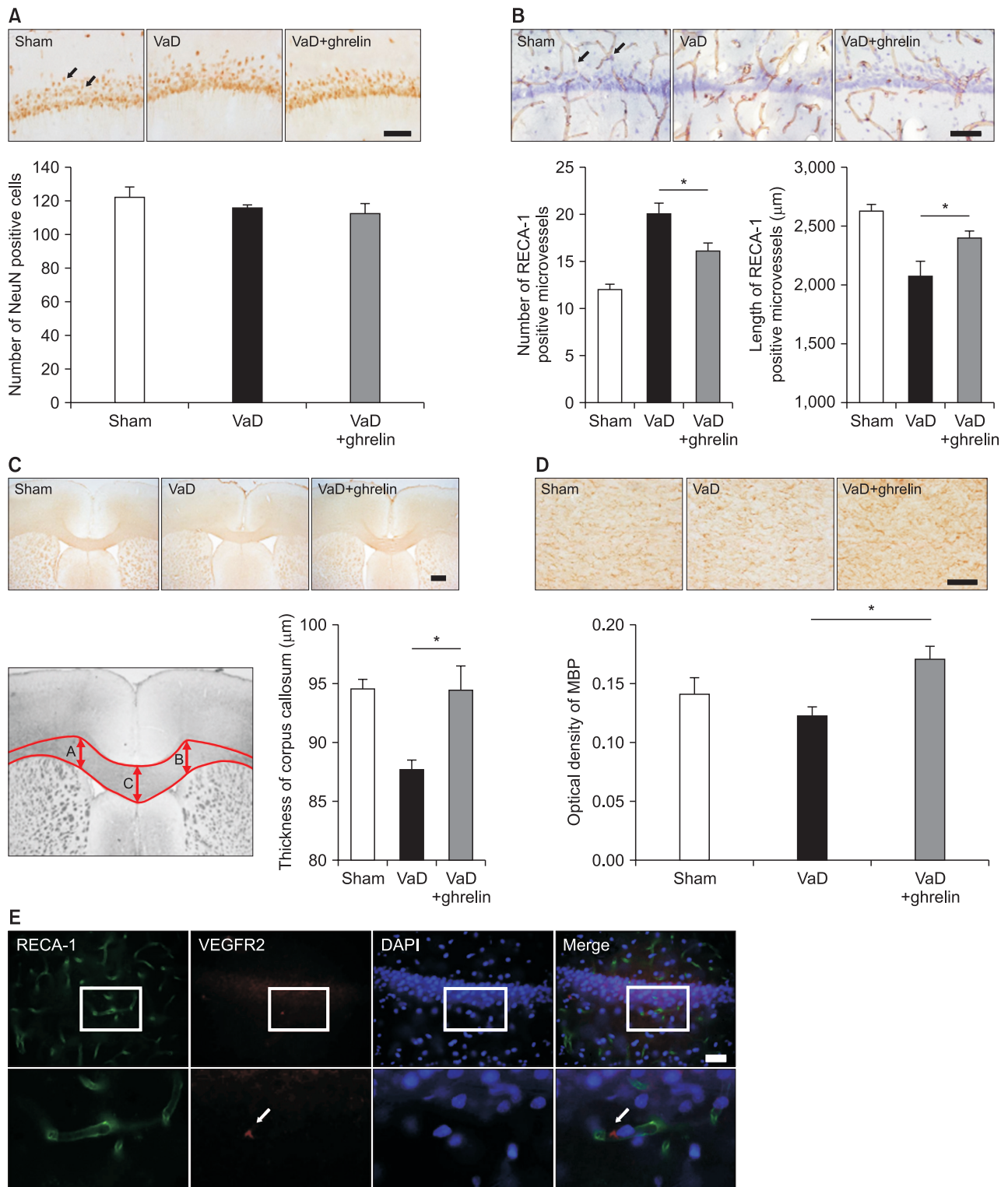
해마에서 미세혈관의 표지가 되는 RECA-1에 의해 염색된 미세혈관 수는 모의 대조군(12.00개), 양측 온목동맥 폐색군(20.00개), 양측 온목동맥 폐색 및 그렐린 투여군(13.25개)간에 유의한 차이가 있었는데( $p = .007$ ), 추가 분석한 결과 양측 온목동맥 폐색군 및 그렐린 투여군은 양측 온목동맥 폐색군보다 유의하게 적어( $p = .022$ ) 가설 3의 부가설 2는 지지되었다(Figure 2B).

해마에서의 RECA-1에 의해 염색된 미세혈관 길이는 모의 대조군(2632.02  $\mu$ m), 양측 온목동맥 폐색군(1979.75  $\mu$ m), 양측 온목동맥 폐색 및 그렐린 투여군(2438.07  $\mu$ m)간에 유의한 차이가 있었는데

**Table 1.** Results of the Behavior Test

Variable	Sham (n=7)	VaD (n=6)	VaD+ghrelin (n=7)	F	$p$	Scheffe
	M $\pm$ SEM	M $\pm$ SEM	M $\pm$ SEM			
Y-maze (% of alternation)	70.57 $\pm$ 1.51	57.17 $\pm$ 2.40	72.14 $\pm$ 2.25	15.01	<.001	a,c>b
MWM (number of visits)	4.00 $\pm$ 0.15	1.96 $\pm$ 0.18	2.93 $\pm$ 0.24	26.21	<.001	a>c>b

VaD=vascular dementia; M=mean; SEM=Standard error of mean; MWM=Morris water maze test.



VaD=vascular dementia; NeuN=neuronal marker; RECA-1=rat endothelial cell antigen-1; DAPI=4', 6-diamidino-2-phenylindole; MBP=myelin basic protein; VEGF=vascular endothelial growth factor; VEGFR2=vascular endothelial growth factor receptor 2.

**Figure 2.** Results of the immunohistochemistry analysis. (A) Staining by NeuN in the hippocampus. (B) Staining by RECA-1 in the hippocampus. (C) Photomicrographs of callosal thickness in the corpus callosum. (D) Staining by MBP in the corpus callosum. (E) Double immunofluorescence staining for VEGF and RECA-1 demonstrates their localization in the hippocampus. Scale bar represents 100 μm. \* means  $p < .05$  when compared to the VaD group.

( $p=.001$ ), 추가 분석한 결과 양측 온목동맥 폐색군 및 그렐린 투여군은 양측 온목동맥 폐색군보다 미세혈관이 길어서( $p=.012$ ) 가설 3의 부가설 3은 지지되었다(Figure 2B).

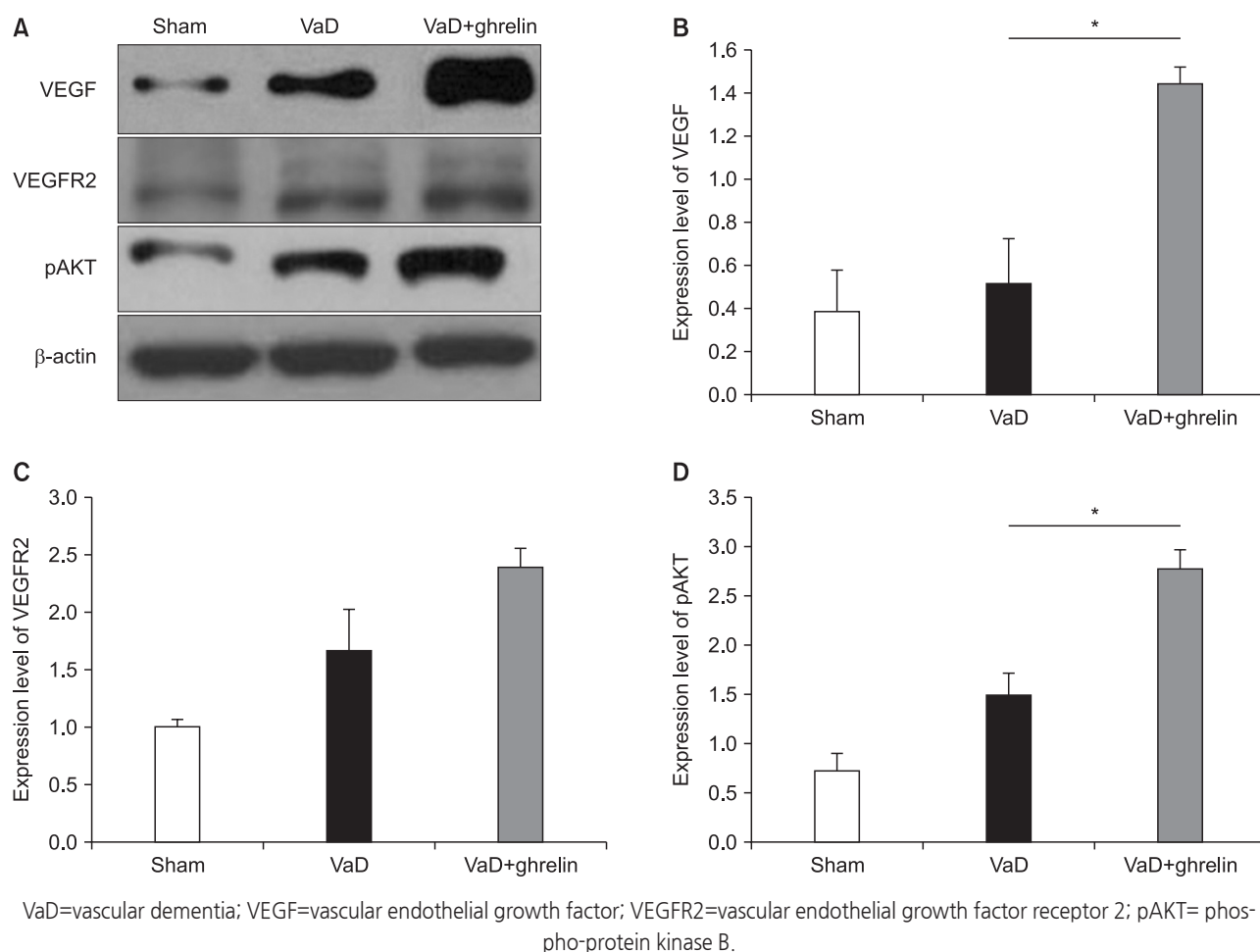
#### 4) 가설4

해마의 혈관 신생에 중요한 역할을 하는 VEGF 단백질 발현의 상대적인 광학밀도 비율(relative optical density ratio)은 모의 대조군(0.39), 양측 온목동맥 폐색군(0.52), 양측 온목동맥 폐색 및 그렐린 투여군(1.44)간에 유의한 차이가 있었는데( $p=.008$ ), 추가 분석한 결과 양측 온목동맥 폐색 및 그렐린 투여군은 양측 온목동맥 폐색군보다 광학 밀도가 유의하게 높아( $p=.022$ ) 가설 4의 부가설 1은 지지되었다(Figure 3A, B).

VEGFR2의 상대적인 광학밀도 비율(relative optical density ratio)은 모의 대조군(1.01), 양측 온목동맥 폐색군(1.74), 양측 온목동

맥 폐색 및 그렐린 투여군(2.40)간에 유의한 차이가 있었으나( $p=.006$ ), 추가 분석한 결과 양측 온목동맥 폐색 및 그렐린 투여군은 양측 온목동맥 폐색군보다 유의하게 높지 않아( $p=.122$ ) 가설 4의 부가설 2는 기각되었다(Figure 3A, C).

해마에서 발현된 VEGFR2가 미세 혈관에 작용하여 혈관신생을 유도하기 위해서는 VEGFR2가 혈관 위에 공존(colocalization)해야 한다. Figure 2E의 병합(merge)한 사진에서 RECA-1에 의해 염색된 미세혈관 위에 VEGFR2가 존재하는 것을 확인하였다. Phospho-Akt의 상대적인 광학밀도 비율(relative optical density ratio)은 모의 대조군(0.72), 양측 온목동맥 폐색군(1.49), 양측 온목동맥 폐색 및 그렐린 투여군(2.78)간에 유의한 차이가 있었는데( $p<.001$ ), 추가 분석한 결과 양측 온목동맥 폐색 및 그렐린 투여군은 양측 온목동맥 폐색군보다 유의하게 높아( $p=.012$ ) 가설 4의 부가설 3은 지지되었다(Figure 3A, D).



**Figure 3.** Result of western blot analysis. (A) Western blot analysis of VEGF, VEGFR2, and pAKT. (B) Expression level of VEGF in the hippocampus. (C) Expression level of VEGFR2 in the hippocampus. (D) Expression level of pAKT in the hippocampus.

\* means  $p<.05$  when compared to the VaD group.



## 논 의

VaD는 AD와 달리 혈관성 위험인자를 조기에 조절하면 치매를 예방할 수 있고, 또한 발병 후에도 원활한 혈액공급이 이루어진다면 시냅스 가소성을 증가시켜서 기억 손상을 늦출 수 있다[26]. 이에 본 연구자들은 VaD에 적합한 간호 중재를 개발하기 위한 초석을 다지고자 기초실험 연구를 시행하였다. 그렐린은 내인성 호르몬으로 정확한 효과를 예측하기 위하여 본 연구에서는 복강 내 투여 방법을 사용하였지만, 추후 간호 중재 개발을 위하여 식이 제한(dietary restriction) 또는 간헐적 단식(intermittent fasting)과 같은 식이요법으로 연구를 확대할 예정이다. 쥐에게 3개월간 격일로 사료를 제공하는 식이 제한요법을 시행한 선행연구에서 대조군보다 위와 해마의 그렐린 발현이 증가하고, 신경재생 또한 증진되었다고 보고되었다[27]. 또한 임상 연구에서도 비만 환자의 식이 조절로 인한 체중 감소가 혈중 그렐린을 증가시키는 것으로 확인되었다[28]. 본 연구는 그렐린에 초점을 맞추어 연구를 진행하였으나 그렐린과 상호작용을 하는 호르몬으로 잘 알려져 있는 렙틴(leptin)도 학습과 기억을 증진시키는 역할로 알려져 있다. 렙틴은 지방조직에서 분비되는 호르몬으로 해마 시냅스에서 글루타메이트 수용체 트래피킹(glutamate receptor trafficking) 및 흥분성 시냅스 강도의 급격한 변화를 촉진시켜서 시냅스 가소성을 나타낸다[29,30]. 따라서 본 연구를 통하여 확인된 그렐린의 효과와 후속연구를 통해 렙틴과의 상호작용에 대한 결과들이 진행된다면 VaD 대상자들에게 약물 치료뿐 아니라 간호 중재의 개발에 대한 근거를 제시할 수 있을 것으로 생각한다.

본 연구에서 Y-미로 검사와 수중 미로 검사를 시행한 결과 그렐린이 공간 학습과 기억 능력을 증진시키는 것을 확인하였다. 선행연구에서 그렐린 유전자를 knockout한 쥐에 식염수를 투여한 군보다 그렐린을 투여한 군에서 Y-미로 검사의 교대율이 유의하게 증가하여 본 연구의 결과와 일치하였다[21]. Y-미로 검사와 유사한 십자 미로 검사에서도 그렐린 투여군의 공간 작업 기억 능력이 더 높았다[16]. 또한 수중 미로 검사에서 그렐린 투여군이 도파대가 위치하였던 곳으로의 방문 횟수가 증가되었던 결과도 선행연구[31]와 일치하였다.

이러한 기억 증진 효과의 기전을 더 깊이 있게 이해하기 위하여 VaD 대상자들이 주로 손상받는 부위인 백색질, 해마 부위의 뇌 조직을 이용하여 탐색하였다. 백색질의 손상은 해마의 손상과 함께 만성 대뇌 저관류로 인한 기억 손상이 나타나는 중요한 원인으로 알려져 있으며, 축삭의 손상 및 말이집탈락이 대표적으로 관찰된 현상인 희박화(rarefaction)가 나타난다[32]. 뇌량은 백색질에 대한 연구에서 대표적으로 이용되는 부위로, 좌·우 대뇌 반구의 대뇌-대뇌, 대뇌-겉질밀 영역의 축삭들을 이어주는 중요한 역할을 하는 부위이다

[33]. 그렐린 투여군에서 뇌량의 두께가 높았던 것은 VaD 환자에게 나타나는 뇌량의 위축이 감소된 결과로 볼 수 있다[34]. MBP가 높게 측정된 것도 세포 수준의 연구에서 그렐린이 희소돌기세포의 세포자멸사(apoptosis)를 억제함으로써 말이집의 손상을 감소시켰던 결과와 일치한다[35].

한편 해마에서 NeuN을 통하여 신경세포를 염색하여 숫자를 세어 본 결과는 유의한 차이가 없었다. 즉, 만성 대뇌 저관류를 통한 혈류의 감소는 해마에서 신경세포의 소실에 큰 영향을 미치지 못하였다. 이는 양측 온목동맥 결찰로 인한 뇌 혈류량의 감소가 일주일 후 대뇌겉질은 35%, 해마는 26%가 회복되기 때문에 신경세포의 소실이 드물게 일어난다는 선행연구[36]와 일치하였다. 신경세포는 차이가 없었으나 산소와 영양분을 공급하고, 항상성 유지를 도우며, 대사산물을 제거하는 등의 신경세포의 성장 및 기능 유지에 중요한 역할을 하는 해마의 미세혈관 손상을 관찰할 수 있었다. 미세혈관의 손상을 확인한 결과, 해마에 작은 조각, 고리모양 또는 울퉁불퉁한 모양 등의 병리적 형태의 미세혈관이 많이 관찰되었다. 이는 amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ )를 주입하여 만든 알츠하이머 동물 모델과 알츠하이머 환자의 사후 조직에서 관찰된 혈관의 변화와 일치하는 것으로[37], 이러한 병리적 형태의 혈관이 기억에 영향을 미쳤을 것으로 생각된다.

혈관신생은 악성 종양의 성장, 침범 및 전이에 중추적인 역할을 하며, 암의 진행을 빠르게 하기 때문에 대부분 부정적인 인식을 가지고 있다[38]. 그러나 뇌의 혈관신생은 뇌혈관 질환의 치료 및 회복에 긍정적인 효과를 나타내고 있다[39]. 뇌혈관 질환 모델에서 VEGF의 증가로 유도된 혈관신생은 신경재생 및 신경보호효과를 나타내었고, AD 모델 쥐에 VEGF를 복강 내 투여한 결과 혈관 신생의 증가, 베타아밀로이드(amyloid beta)의 감소 및 기억 증진이 확인되었다[21,40]. 따라서 본 연구에서 그렐린 투여로 인한 해마에서 미세혈관 수의 감소와 길이의 증가는 만성 대뇌 저관류로 인한 보상작용으로 나타나는 혈관신생을 더욱 증가시킨 것으로 생각된다. 미세혈관 수의 증가는 작은 조각이 더 많아져 미세혈관의 통합성이 감소되었던 결과로 해석할 수 있다[37]. 미세혈관 길이의 증가도 혈관신생으로 인한 혈액 공급의 증가로 인해 신경세포들의 기능이 좋아지는 미세혈관의 통합성이 증가되었다는 의미로 신경재생, 신경보호 효과를 증진시켜 뇌혈관 질환 모델에서 기억력을 증진시켰던 선행 연구[40]의 결과와 일치한다.

해마 부위에서 그렐린 투여가 만성 대뇌 저관류로 인한 혈관신생을 증진시켰는지 분자수준에서 관찰하기 위하여 혈관신생을 유도하는 VEGF 신호 전달 체계와 PI3K/AKT 신호 전달 체계를 확인하였다. VEGF와 그의 수용체인 VEGFR2는 그렐린 투여군이 다른 군에 비하여 증가하였으나 VEGF만이 유의한 차이가 있었다. VEGFR2의

결과가 유의하지 않았던 것은 웨스턴블롯을 해마의 혈관만을 추출한 후 분석하지 않고 해마의 전체 조직으로 시행하였기 때문이라고 생각되어 선행연구와 같이 미세혈관과 VEGFR2의 공존을 면역형광법을 통해 확인함으로써 이 문제를 해결하였다[41]. Phospho-AKT의 발현량도 그렐린 투여군에서 증가하였다. Phospho-AKT는 VEGF로 받은 신호를 받아들이며 혈관내피세포의 생존, 산화질소의 생성, 세포의 이동, 튜브 형성 등을 조절하는 중요한 단백질로 혈관신생에 중요한 역할을 하는 단백질이다[42]. Phospho-AKT는 VEGF 신호 전달체계의 하위 요소로서도 작용할 수 있으나 PI3K/AKT 신호 전달체계를 통하여 혈관신생에 기여할 수 있다. 선행연구에서는 그렐린이 혈관을 구성하는 중요한 요소인 내피세포(endothelial cell)의 PI3K/AKT 신호 전달체계를 촉진하여 혈관신생을 증진시킨다고 보고하였다[43-45].

본 연구는 VaD의 간호 중재 개발을 위한 기초 연구로서 의의가 있으나 몇 가지 제한점이 있다. 동물을 이용한 전 임상단계의 연구로 단일 연구결과만으로 일반화하여 임상적으로 적용하기에는 어려움이 있다는 것이다. 그러나 동물 실험은 성장 기간이 짧고, 환경을 제어할 수 있어 다른 변수를 통제하면서 원하는 중재의 효과를 파악할 수 있으며, 인간과 유사한 신경 생리학 및 생리학 시스템 가지고 있고, 인간에게 치명적이어서 시행할 수 없는 중재 및 치료들의 실험을 진행할 수 있다. 또한 행동학적 실험뿐만 아니라 조직을 이용하여 특정 현상의 기전을 분자생물학적 기법을 사용하여 알아볼 수 있다는 장점도 가지고 있다. 추후 타액 또는 혈중 그렐린의 농도를 측정하여 임상의 적용 가능성을 높이는 임상단계의 연구가 필요하다고 생각한다. 또한 혈관성 치매의 분류는 다양하지만 본 연구에서는 만성 대뇌 저관류로 인한 기억 손상을 확인하기 위하여 BCCAO 모델을 사용하여 결과를 도출하였다는 것과 본 연구의 결과만으로 그렐린이 만성 대뇌 저관류로 인한 뇌혈관 손상의 복구에 직접 작용하였는지 또는 중간매개요인이 작용하였는지에 대한 결론을 내리기 어렵다는 제한점이 있다. 따라서 세부 기전에 대한 추가적인 연구를 통한 확인이 필요하다. 이상과 같이 몇 가지 제한점을 가지고 있으나 후속 연구들이 진행된다면 연구 결과가 축적되어 임상적으로 적용 가능한 결론을 내릴 수 있을 것이라 기대한다.

## 결론

본 연구는 무작위 대조군 순수 실험연구로 그렐린의 투여가 BCCAO로 유발된 VaD 쥐의 기억 손상에 미치는 영향을 확인하고자 시행되었으며, 행동 실험 및 뇌 조직을 통한 해마와 백색질의 변화를 분자생물학적 기법으로 측정하였다. 본연구의 결과 그렐린 투여 후 백색질 및 해마의 미세혈관 손상이 감소되었고 혈관신생이 증

진되었다. 이는 행동실험의 결과인 공간 학습과 기억의 증진으로 관찰되었다.

본 연구는 그렐린이 선행 연구에서 밝혀진 시냅스 가소성 및 신경재생의 효과 외에 만성 대뇌 저관류로 인한 기억 손상에 혈관내피 성장인자 신호 전달체계의 활성화로 미세혈관의 회복을 유도하여 기억증진의 효과를 입증함으로써 이론적 기초를 제공할 수 있다. 그리고 간호교육 측면에서 치매노인을 돌보는 간호사를 위한 교육과정이나 보수교육 프로그램에 VaD의 병태생리 및 최신 연구내용을 보완을 위한 교육 자료로 활용될 수 있으며, 간호연구 측면에서 그렐린으로 유도된 혈관신생이 손상된 미세혈관의 회복에 미치는 효과는 VaD 이외의 다른 뇌혈관 질환에 그렐린을 적용하는 추후 연구의 가능성을 제시할 수 있다. 또한 간호실무 측면에서 혈관성치매 환자의 손상된 인지기능을 증진시키기 위하여 그렐린을 이용한 간호 중재의 개발을 촉진할 수 있는 과학적 토대를 제공할 수 있다.

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors declared no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Iadecola C. The pathobiology of vascular dementia. *Neuron*. 2013;80(4):844-866. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.008>
2. Kalara RN. The pathology and pathophysiology of vascular dementia. *Neuropharmacology*. 2018;134(B):226-239. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.12.030>
3. Ma X, Sun Z, Liu Y, Jia Y, Zhang B, Zhang J. Resveratrol improves cognition and reduces oxidative stress in rats with vascular dementia. *Neural Regeneration Research*. 2013;8(22):2050-2059. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2013.22.004>
4. Candelario-Jalil E, Thompson J, Taheri S, Grossetete M, Adair JC, Edmonds E, et al. Matrix metalloproteinases are associated with increased blood-brain barrier opening in vascular cognitive impairment. *Stroke*. 2011;42(5):1345-1350. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.110.600825>
5. Chen J, Cui X, Zacharek A, Cui Y, Roberts C, Chopp M. White matter damage and the effect of matrix metalloproteinases in type 2 diabetic mice after stroke. *Stroke*. 2011;42(2):445-452. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.110.596486>
6. Simpson JE, Fernando MS, Clark L, Ince PG, Matthews F, Forster G, et al. White matter lesions in an unselected cohort of the elderly: Astrocytic, microglial and oligodendrocyte precursor cell responses. *Neuropathology and Applied Neurobiolo-*

- gy. 2007;33(4):410-419.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2007.00828.x>
7. Park HR, Park M, Choi J, Park KY, Chung HY, Lee J. A high-fat diet impairs neurogenesis: Involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience Letters*. 2010;482(3):235-239.  
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.07.046>
8. O'Brien JT, Thomas A. Vascular dementia. *The Lancet*. 2015;386(10004):1698-1706.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00463-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00463-8)
9. Jiwa NS, Garrard P, Hainsworth AH. Experimental models of vascular dementia and vascular cognitive impairment: A systematic review. *Journal of Neurochemistry*. 2010;115(4):814-828. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06958.x>
10. Baskys A, Hou AC. Vascular dementia: Pharmacological treatment approaches and perspectives. *Clinical Interventions in Aging*. 2007;2(3):327-335.
11. Olazarán J, Reisberg B, Clare L, Cruz I, Peña-Casanova J, del Ser T, et al. Nonpharmacological therapies in Alzheimer's disease: A systematic review of efficacy. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. 2010;30(2):161-178.  
<https://doi.org/10.1159/000316119>
12. Andrews ZB. The extra-hypothalamic actions of ghrelin on neuronal function. *Trends in Neurosciences*. 2011;34(1):31-40. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.10.001>
13. Park S. Ghrelin. *Endocrinology and Metabolism*. 2010;25(4):258-263.  
<https://doi.org/10.3803/enm.2010.25.4.258>
14. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999;402(6762):656-660.  
<https://doi.org/10.1038/45230>
15. Moon M, Kim S, Hwang L, Park S. Ghrelin regulates hippocampal neurogenesis in adult mice. *Endocrine Journal*. 2009;56(3):525-531.  
<https://doi.org/10.1507/endocrj.K09E-089>
16. Diano S, Farr SA, Benoit SC, McNay EC, da Silva I, Horvath B, et al. Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nature Neuroscience*. 2006;9(3):381-388. <https://doi.org/10.1038/nn1656>
17. Carlini VP, Varas MM, Cragolini AB, Schiöth HB, Scimone-li TN, de Barioglio SR. Differential role of the hippocampus, amygdala, and dorsal raphe nucleus in regulating feeding, memory, and anxiety-like behavioral responses to ghrelin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004;313(3):635-641.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.150>
18. Liu Y, Chen L, Xu X, Vicaut E, Sercombe R. Both ischemic preconditioning and ghrelin administration protect hippocampus from ischemia/reperfusion and upregulate uncoupling protein-2. *BMC Physiology*. 2009;9:17.  
<https://doi.org/10.1186/1472-6793-9-17>
19. Miao Y, Xia Q, Hou Z, Zheng Y, Pan H, Zhu S. Ghrelin protects cortical neuron against focal ischemia/reperfusion in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;359(3):795-800.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.05.192>
20. Liu Y, Wang PS, Xie D, Liu K, Chen L. Ghrelin reduces injury of hippocampal neurons in a rat model of cerebral ischemia/reperfusion. *Chinese Journal of Physiology*. 2006;49(5):244-250.
21. Wang P, Xie ZH, Guo YJ, Zhao CP, Jiang H, Song Y, et al. VEGF-induced angiogenesis ameliorates the memory impairment in APP transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011;411(3):620-626.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.07.003>
22. Lopez NE, Krzyzaniak MJ, Blow C, Putnam J, Ortiz-Pomales Y, Hageny AM, et al. Ghrelin prevents disruption of the blood-brain barrier after traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*. 2012;29(2):385-393.  
<https://doi.org/10.1089/neu.2011.2053>
23. Mead R. The design of experiments: Statistical principles for practical applications. Cambridge: Cambridge University Press; 1990. p. 7-8.
24. Spence KW, Lippitt R. An experimental test of the sign-gestalt theory of trial and error learning. *Journal of Experimental Psychology*. 1946;36(6):491-502.  
<https://doi.org/10.1037/h0062419>
25. Morris RGM, Garrud P, Rawlins JNP, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. 1982;297(5868):681-683. <https://doi.org/10.1038/297681a0>
26. Venkat P, Chopp M, Chen J. Models and mechanisms of vascular dementia. *Experimental Neurology*. 2015;272:97-108.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.05.006>
27. Kim Y, Kim S, Kim C, Sato T, Kojima M, Park S. Ghrelin is required for dietary restriction-induced enhancement of hippocampal neurogenesis: Lessons from ghrelin knockout mice. *Endocrine Journal*. 2015;62(3):269-275.  
<https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ14-0436>
28. Hansen TK, Dall R, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Christiansen JS, et al. Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. *Clinical Endocrinology*. 2002;56(2):203-206.  
<https://doi.org/10.1046/j.0300-0664.2001.01456.x>
29. Harvey J. Leptin regulation of neuronal morphology and hippocampal synaptic function. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*. 2013;5:3. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2013.00003>
30. Irving AJ, Harvey J. Leptin regulation of hippocampal synaptic function in health and disease. *Philosophical*

- Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2014;369(1633):20130155.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0155>
31. Li E, Kim Y, Kim S, Park S. Ghrelin-induced hippocampal neurogenesis and enhancement of cognitive function are mediated independently of GH/IGF-1 axis: Lessons from the spontaneous dwarf rats. *Endocrine Journal*. 2013;60(9):1065-1075. <https://doi.org/10.1507/endocrj.ej13-0045>
  32. Chen L, Xing T, Wang M, Miao Y, Tang M, Chen J, et al. Local infusion of ghrelin enhanced hippocampal synaptic plasticity and spatial memory through activation of phosphoinositide 3-kinase in the dentate gyrus of adult rats. *European Journal of Neuroscience*. 2011;33(2):266-275.  
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07491.x>
  33. Innocenti GM. General organization of callosal connections in the cerebral cortex. In: Jones EG, Peters A, editors. *Sensory-Motor Areas and Aspects of Cortical Connectivity*. Boston (MA): Springer US; 1986. p. 291-353.
  34. Wu XP, Gao YJ, Yang JL, Xu M, Sun DH. Quantitative measurement to evaluate morphological changes of the corpus callosum in patients with subcortical ischemic vascular dementia. *Acta Radiologica*. 2015;56(2):214-218.  
<https://doi.org/10.1177/0284185114520863>
  35. Lee JY, Oh TH, Yune TY. Ghrelin inhibits hydrogen peroxide-induced apoptotic cell death of oligodendrocytes via ERK and p38MAPK signaling. *Endocrinology*. 2011;152(6):2377-2386. <https://doi.org/10.1210/en.2011-0090>
  36. Neto CJB, Paganelli RA, Benetoli A, Lima KCM, Milani H. Permanent, 3-stage, 4-vessel occlusion as a model of chronic and progressive brain hypoperfusion in rats: A neurohistological and behavioral analysis. *Behavioural Brain Research*. 2005;160(2):312-322.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.12.016>
  37. Jantarantotai N, Ryu JK, Schwab C, McGeer PL, McLarnon JG. Comparison of vascular perturbations in an A $\beta$ -injected animal model and in AD brain. *International Journal of Alzheimer's Disease*. 2011;2011:918280.  
<https://doi.org/10.4061/2011/918280>
  38. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407(6801):249-257.  
<https://doi.org/10.1038/35025220>
  39. Plate KH. Mechanisms of angiogenesis in the brain. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 1999;58(4):313-320. <https://doi.org/10.1097/00005072-199904000-00001>
  40. Fan Y, Yang GY. Therapeutic angiogenesis for brain ischemia: A brief review. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2007;2(3):284-289.  
<https://doi.org/10.1007/s11481-007-9073-3>
  41. Pillai A, Mahadik SP. Differential effects of haloperidol and olanzapine on levels of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in rat hippocampus. *Schizophrenia Research*. 2006;87(1-3):48-59.  
<https://doi.org/10.1016/j.schres.2006.06.017>
  42. Shiojima I, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circulation Research*. 2002;90(12):1243-1250.  
<https://doi.org/10.1161/01.res.0000022200.71892.9f>
  43. Wang L, Chen Q, Li G, Ke D. Ghrelin stimulates angiogenesis via GHSR1a-dependent MEK/ERK and PI3K/Akt signal pathways in rat cardiac microvascular endothelial cells. *Peptides*. 2012;33(1):92-100.  
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.11.001>
  44. Chen X, Chen Q, Wang L, Li G. Ghrelin induces cell migration through GHSR1a-mediated PI3K/Akt/eNOS/NO signaling pathway in endothelial progenitor cells. *Metabolism*. 2013;62(5):743-752.  
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2012.09.014>
  45. Rossi F, Castelli A, Bianco MJ, Bertone C, Brama M, Santemma V. Ghrelin induces proliferation in human aortic endothelial cells via ERK1/2 and PI3K/Akt activation. *Peptides*. 2008;29(11):2046-2051.  
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.07.002>