

## 트레드밀 운동이 알츠하이머 질환 동물 뇌에서 철 대사에 미치는 영향 : Amyloid- $\beta$ 와 Tau 단백질 중심으로

### Treadmill exercise improves cognitive impairment by attenuating amyloid- $\beta$ and tau hyperphosphorylation levels via brain iron dyshomeostasis in transgenic mouse model of Alzheimer's disease

최동훈(건양대학교 교수) · 현아현(한국체육대학교 박사) · 엄현섭(건양대학교 교수) · 조준용(한국체육대학교 교수) · 염동철(한국체육대학교 교수)\*

Dong-Hun Choi *Konyang Univ* · Ah-Hyun Hyun *Korea National Sport Univ* · Hyun-Seob Um *Konyang Univ* · Joon-Yong Cho *Korea National Sport Univ* · Dong-Chul Yeom *Korea National Sport Univ*

#### 요약

본 연구의 목적은 트레드밀 운동이 알츠하이머 질환 뇌의 철 항상성과  $\beta$ -아밀로이드 및 타우 과인산화 조절에 미치는 영향을 관찰하는 것이다. 본 연구를 수행하기 위해 Non-AD-Control(NAD-C, n=10), AD-Control(AD-C, n=10) 및 AD-Treadmill(AD-TE, n=10)로 분류하였다. 트레드밀 운동은 운동시작 5분 동안 8m/min, 다음 5분은 11m/min, 마지막 20분은 14m/min 속도로 실시하였으며, 주5일, 12주간 실시하였다. 트레드밀 운동 효과를 규명하기 위해 수중 미로 검사와 수동 회피 검사를 이용하여 인지 기능을 측정하였고, 뇌의 해마 부분에서  $\beta$ -아밀로이드, tau, 세포사멸 관련 인자의 변화가 있는지 확인하였다. 그 결과, 트레드밀 운동은 알츠하이머 질환 동물의 뇌의 해마에서 알츠하이머병 관련 비정상 철의 축적을 감소시켜 철 항상성을 유지하였다. 다음으로 철 항상성 조절에 따른  $\beta$ -아밀로이드 축적과 Tau 과인산화에 영향을 미치는지 분석하였다. 그 결과, 알츠하이머 질환에서 비정상적인 철 축적으로 인한  $\beta$ -아밀로이드 축적과 Tau 과인산화를 확인했으며, 또한, 신경 세포 사멸과 인지 저하를 초래했습니다. 그러나 트레드밀 운동은  $\beta$ -아밀로이드 축적과 타우 과인산화를 감소시키고, 신경 세포 사멸의 감소와 인지 기능 향상을 확인하였다. 이러한 결과는 트레드밀 운동이 철 항상성을 조절하여 신경 세포 사멸과 인지 기능 저하를 완화시킨다고 볼 수 있다. 따라서 철 항상성을 유지하기 위한 트레드밀 운동은 알츠하이머 질환 환자에게 효과적이다.

#### Abstract

Alzheimer's disease (AD) is known to be a major lesion in the accumulation of neurofibrillary tangles and amyloid- $\beta$  due to hyperphosphorylation of Tau protein, and its association with abnormal brain iron metabolism is increasing recently. Therefore, the purpose of this study was to observe the effect of treadmill exercise on the regulation of cerebral iron homeostasis and  $\beta$ -amyloid and Tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease. Twenty mice with transgenic mice and ten mice with non-transgenic were divided into three groups: non-AD-control(NAD-C, n=10), AD-control(AD-C, n=10), and AD- treadmill exercise(AD-TE, n=10). AD-TE group was performed to progressive TE for 12 weeks. And then, we measured the cognitive function using water maze test and passive avoidance test and, brain hippocampus were evaluated to determine whether any changes in the oligomer A $\beta$ , tau, apoptotic-related factors biogenesis. The treadmill exercise maintained iron homeostasis by reducing the accumulation of AD-related abnormal iron in the hippocampus of the brain through aging APP-C105 mice. Next, we investigated whether treadmill exercise affects  $\beta$ -amyloid accumulation and Tau hyperphosphorylation according to iron homeostasis regulation. We confirmed  $\beta$ -amyloid accumulation and Tau hyperphosphorylation due to abnormal iron accumulation in Alzheimer's disease, which also resulted in neuronal cell death and cognitive decline. However, it was confirmed that treadmill exercise attenuated  $\beta$ -amyloid accumulation and Tau hyperphosphorylation, and improved neuronal cell death and cognitive function. These results suggest that treadmill exercise modulates iron homeostasis to alleviate neuronal cell death and cognitive decline. Therefore, treadmill exercise and therapeutic strategies to maintain iron homeostasis may be useful in AD patients.

Key words : Alzheimer's disease, amyloid- $\beta$ , Tau, Iron

\* mangjack@knsu.ac.kr

\* 이 논문은 2019년 대한민국 교육부와 한국연구재단의 인문사회분야 신진연구자지원사업의 지원을 받아 수행된 연구임(NRF-2019S1A5A8038926)

## I. 서론

알츠하이머 질환은 치매환자의 약 74.5%를 차지하는 대표적인 신경퇴행성질환으로 점진적인 기억력의 감소와 행동적 장애가 나타나는 병리학적 특징을 보이다 결국 일상생활의 기능을 상실하는 임상적 특징을 나타낸다(중앙치매센터, 2019; Lista et al., 2015; Masters et al., 2015).

현재까지 정확한 분자적 원인과 기전은 알려져 있지 않았으나 그동안의 연구를 바탕으로 세포 외 베타 아밀로이드( $\beta$ -amyloid: A $\beta$ ) 단백질의 축적과 세포 내 Tau 단백질의 과인산화로 인한 신경섬유원 농축(neurofibrillary tangle)이 독성을 일으키는 것으로 보고되고 있다(Selkoe, 2001; Querfurth & LaFerla, 2010; Selkoe & Hardy, 2016). 이중 세포 외 A $\beta$  단백질은 가장 많은 연구가 진행되고 있는 독성 단백질로 정상적인 상태에는 아밀로이드 전구 단백질(amyloid precursor protein: APP)이  $\alpha$ -secretase와  $\gamma$ -secretase에 의해 차례대로 분절되어 A $\beta$  단백질이 생성되지 않는 비 아밀로이드 생성경로(non-amyloidogenic pathway)를 거치게 되고 이는 신경 세포에 긍정적인 영향을 보고하고 있다(Selkoe, 2001; Tachida et al., 2008; Born et al., 2015).

대부분의 알츠하이머질환 치료전략은 약물치료를 통해 A $\beta$  단백질과 과인산화 된 Tau 단백질을 감소시켜 병의 진행을 완화시키거나 지연시키는데 목적이 있다. 하지만 최근 A $\beta$ 의 제거에 초점을 맞춘 다양한 약물치료제의 임상시험 실패로 인해 아직까지 뚜렷한 해결책이 없는 실정이다.

지금까지 보고된 연구에 의하면 알츠하이머 질환의 A $\beta$ 가 축적되는 뇌에서 철과 철 조절 단백질이 같은 위치에 축적됨을 발견하였고, neurofibrillary tangle이 있는 뉴런에서도 철의 축적이 관찰되어 철과의 연관성을 보고하였다(Gallagher et al., 2012; LeVine, 2007; Deibel et al., 1996; Connor et al., 1992).

철은 모든 생명체에 생명유지와 성장을 위한 필수적인 요소이다. Ferritin은 모든 생명체에 세포에서 만들어지는 철 저장 단백질이며, 철 대사를 조절하는 가장 기본적인 단백질로 생리적, 병리적 과정에 참여하며, 에너지 생산, 전자 전달, 기질의 산화와 같은 기본적인 세포 기능에 관여하는 중요한 물질이다(Palmour et al., 1971).

하지만 과도하게 증가된 철 수치는  $\alpha$ -secretases를 활성화시키는 Furin 단백질을 감소시키는 반면  $\beta$ -secretases의 활성을 증가시켜 A $\beta$ 를 축적시키는 Amyloidgenic pathway를 유도하여 신경세포의 사멸을 증가시키고 있다(Silvestri & Camaschella, 2008). 또한, 증가된 철은 tau 단백질의 과인산화를 촉진시켜 neurofibrillary tangle(NFT)을 형성하여 산화 스트레스를 유발한다고 보고하고 있다(Bodovitz et al., 1995; Rogers et al., 2002; Mantyh et al., 1993).

Crespo et al., (2014)은 알츠하이머 질환자의 뇌에서 대조군과 비교하여 혈액 내 철 수준과 ferritin, Tf, TfR이 유의하게 감소한 것을 확인하여 세포질 내 철 수준이 과도하게 축적되었음을 제시하였다. 또한, Xian-hui et al., (2015)의 연구에서는 6주와 12주된 알츠하이머 형질전환 생쥐와 정상 생쥐를 대상으로 대뇌피질의 철

과 DMT1, FPN1 수준을 비교한 결과, 알츠하이머 질환 생쥐에서 DMT1의 증가와 FPN1의 감소가 나타나 철의 축적을 증가시킨다고 보고하였다.

최근 신체활동을 포함한 운동은 알츠하이머 질환 뇌의 에너지 대사를 활성화시켜 인지기능 저하, 염증, 세포사멸, 미토콘드리아 기능 등을 개선하여 신경퇴행성 질환에 효과가 있는 것으로 보고되고 있지만 아직까지 정확한 기전은 밝혀져 있지 않다(Choi et al., 2021; Koo et al., 2017; Choi et al., 2014; Um et al., 2008; Adlard et al., 2005; Cho et al., 2003). Choi et al., (2021)의 연구에 따르면 트레드밀 운동은 알츠하이머 질환 동물의 뇌의 철 항상성을 조절하여 A $\beta$ 의 감소시키고, 신경세포사멸을 감소시켜 인지기능을 향상시켰다고 보고하였다. 하지만 알츠하이머 질환의 원인 중 대표적인 A $\beta$  침착과 Tau의 과인산화를 유발한다고 보고되고 있는 Ferritin 대사에 관한 기전 연구는 미흡한 실정이다.

또한, 지금까지 운동과 Ferritin에 대한 선행 연구는 혈액학적 수준에서 이루어진 것이 대부분이며, 단백질 수준과 같은 분자 생물학적인 메커니즘 연구는 부족한 실정이다. 운동에 의한 철 대사 와 아밀로이드 단백질의 관계를 규명한다면 약물이나 수술 없이 비침습적인 방법으로 알츠하이머 질환을 예방하거나 치료할 수 있을 것이다.

따라서, 본 연구는 트레드밀 운동이 알츠하이머 질환 동물 뇌에서 철의 항상성을 조절하는 요인의 따라 아밀로이드 단백질과 Tau 단백질의 변화를 알아보고, 이에 따른 산화스트레스와 세포사멸에 미치는 효과를 분석하여 철 대사가 뇌 건강에 미치는 영향과 운동을 통한 개선 효과를 알아보는데 있다.

## II. 연구방법

### 1. 연구대상

본 연구는 실험을 실시하기 전에 K대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 얻은 후 실행하였다. 실험동물은 13개월 된 알츠하이머 질환 모델 마우스(APP-C105 transgenic mouse, female)를 K대학교 동물사육실(온도 22±2°C, 습도 50±5%, 명암주기 12시간)에서 식이량과 물은 자유 공급하여 사육하였다. 실험동물은 비교집단(Non-AD-Con; NAD-C, n=10), 치매집단(AD-Con; AD-C, n=10), 치매 운동집단(AD-Treadmill Exercise; AD-TE, n=10)으로 구분하였다.

### 2. 운동방법

AD-TE 집단은 소동물용 트레드밀(대종기기 Model: DJ2-242, Dual Treadmill) 장비를 이용하여 트레드밀 운동을 실시하였다. 사전 적응훈련(경사도 0%, 운동시작 5분 2m/min, 다음 5분 5m/min, 마지막 20분 8m/min)은 1주간 실시하였다. 사전 적응 훈련을 마친 후 본 운동은 주 5일, 12주간 실시하였다. 본 운동의 운동 방법은 경사도를 0%로 고정한 후에 운동시작 5분 동안 8m/min, 다음 5분은 11m/min, 마지막 20분은 14m/min 속도로 Cho et al., (2003)과

choi et al., (2014)의 운동프로그램을 바탕으로 실시하였다. 연구절차는 <그림 1>과 같다.

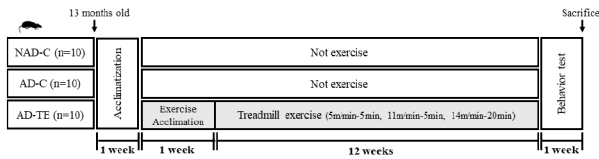


Fig 1, study design

### 3. 인지 기능 검사

#### 1) 수중 미로 검사

알츠하이머 형질전환 생쥐를 대상으로 water maze test(WMT)를 실시하여 수영 거리(escape distance), 시간(escape latency)을 컴퓨터 프로그램(SMART-LD)을 이용한 카메라로 측정하고 SMART-CS 프로그램(Panlab, Barcelona, Spain)을 활용하여 분석하였다. WMT는 원형수조(지름 1.5m×높이 40cm)에 지름 12cm인 표적(target)을 수면에서 1cm 정도 낮게 원형수조바닥에 설치하고, 물(22°C~25°C)을 받아 탈지분유를 용해 시켜 표적을 보이지 않도록 하고 검사는 처음 5일 동안 각각 2회씩 정해진 출발지점에서 시작하여 표적에 도달할 수 있도록 훈련시키고, 2회 모두 표적을 찾지 못한 생쥐에게는 표적으로 유도하여 위치를 인지시켰다. 각각의 검사는 최소한 5분 정도의 간격을 두었으며 마지막 6일째 표적을 없앴 후 출발지점에서 시작하여 표적에 도달한 결과를 실험 데이터로 이용할 것이며 이때, 실험 데이터로는 60초 이내에 표적을 2번 찾은 경우에만 활용하였다.

#### 2) 수동회피검사

수동회피실험 장치의 전실은 빛을 환히 쏘여 주는 백색의 밝은 상자(18×18×25cm), 후실은 검은색의 어두운 상자 (18×18×25cm)로 구성되어 있다. 어두운 공간의 바닥에는 전기충격을 가할 수 있는 강철 스테인레스를 설치하였고, 전실과 후실 사이의 벽에는 아래 부분에 직각 4cm되는 원형 구멍이 뚫려 있다. 이 구멍은 기요틴(guillotine)형의 문으로 개폐됨. 실험동물을 한 마리씩 다른 cage에서 1분간 방치한 후, 전실에 넣고 10초간 적응을 시킨 후 기요틴형 문을 올려서 실험동물이 자유롭게 다니도록 하였다. 실험동물의 네 개의 발이 어두운 후실로 모두 들어가면 문을 재빨리 닫고 전실에서 후실로 들어가는 데 걸린 시간(initial latency time)을 측정하고 전기충격(0.5mA)을 2초간 실시하였다. 그리고 5초가 지난 후에 실험동물을 꺼내 사육장 case에 넣었음. 72시간 후 동일한 방법으로 실시하여 전실에서 후실로 들어가는 시간(retention latency time)을 최대 300초까지 기록하였다.

### 4. 조직 준비

12주간 트레드밀 운동과 운동기능검사를 수행한 후 western

blot, 면역조직화염색 분석을 위해 집단 당 western blot 6마리, 면역조직화염색 4마리씩 구분하였다. western blot을 위한 뇌조직 적출은 동물용 챔버를 이용하여 Co2가스를 흡입시켜 마취한 후, 단백질 발현 측정을 위한 뇌 조직을 적출하여 분석 시까지 -80°C 초저온냉동고(Deep Freezer, SANYO, Japan)에서 보관하였다. 면역조직화염색 분석을 위해 동물용 챔버를 이용하여 Co2가스를 흡입시켜 마취한 후, 흉강을 열고 좌심실을 통하여 50mM 인산염 완충 식염수(phosphate buffer saline, PBS)를 5분 동안 주입하고, 0.1M 인산 완충액에 녹인 4% paraformaldehyde (PFA) 고정액을 10분 동안 관류하였다. 관류 고정 후 뇌와 골격근을 적출한 후, 4% PFA 고정액에 담아서 4°C에서 12시간 침전시켜 고정한 후 조직을 30% Sucrose 용액에서 5일 동안 침전시킨 다음 freezing microtome (Leica, Nussloch, Germany)를 이용하여 40μm 두께의 연속관상 절편을 제작하였다.

### 5. Western Blot

집단별로 분리된 대뇌피질을 Bradford(1976)법에 따라 단백질을 정량한 후 20~30μg으로 10~12% SDS-Polyacrylamide gel에 전기영동 하였다. 다음 membrane으로 전이시키기 위해 transfer를 실시하고 난 후 membrane에 폰수(Ponceau S)를 1분 발색하여 총 단백질이 잘 전이되었는지와 단백질 정량이 알맞게 분주되었는지 확인하였다. 이후 3분간 정제된 물(DW)로 membrane에 염색된 Ponceau S 제거하고 5% BSA가 첨가된 1xTBS-T 용액에 membrane을 90분간 상온에 반응(blocking)시켰다. 각각의 1차 항체(myloid-β, Furin, Light chain ferritin, Heavy chain ferritin, DMT-1, Fpn1, Tfr1, Transferrin, Calpain, p35, CDK5, p-GSK3αβ, t-GSK3αβ, t-tau, p-tau202, p-tau404, p-ERK1/2, t-ERK1/2, p-JNK, t-JNK)와 4°C에서 (12시간 이상) 반응시켰다. 이후 1xTBS-T 용액으로 8분간 4회 세척 후 2차 항체와 상온에서 90분간 반응시킨 후에 다시 1xTBS-T 용액으로 8분간 4회 세척 후, ECL 용액 (WBLUF0100; Millipore, USA)에 membrane을 1분간 반응시킨 후 이미지 분석 시스템(ChemiDoc XRS System, Bio-Rad, USA)을 이용하여 촬영하였다. 촬영 후 얻어진 단백질 발현 정도는 Quantity One 1-D Analysis Software(Bio-Rad, USA)를 사용하여 최종 단백질량을 산출하였다.

### 6. 면역 형광법

면역 형광법은 자유부유법(free-floating method)를 이용했으며, 집단 간 최소 10장 이상 선택 후, 50mM PBS로 5분씩 4번 세척 후, 항원 복구(Antigen retrieval)를 위해 0.01M sodium citrate를 30분간 적용 한 뒤, 60% Formic acid에 20분간 적용하였다. 50mM PBS로 5분 씩 3번 세척 한 후 peroxidase를 제거하기 위해 3% 과산화수소(H2O2)에 30분간 반응시키고, 다시 3번 세척한 다음 10% Normal Donkey Serum 및 0.3% Triton X-100을 이용하여 60분 동안 Blocking을 실시하였다. 1차 항체인 Amyloid beta(6E10)를 24시간

동안 4°C에서 반응시켰다. 이 후 조직을 5분씩 3번 세척한 후 2차 Alexa Fluor 400을 적용하여 2시간 동안 반응시키고, 다시 3번 세척 한 후, 슬라이드 위에 올린 후 VCTASHIELD Antifade Mounting Medium을 적용 후 Mounting을 완료하였다. Mounting한 조직은 Fluorescence microscope(Leica Microsystem, TCS SP8, Germany)을 통해 관찰하였다.

## 7. TUNEL staining

Apoptosis를 관찰하기 위해 ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit(K7100, Millipore)를 사용하였다. 각 집단의 뇌 조직을 자유부유법(free floating method)으로 각 집단 당 10장 이상 씩 선택하여 5mM PBS로 5분 씩 3번 세척한 후 항원 복구 (Antigen retrieval)를 위해 조직을 0.01M Sodium Citrate에 적용시켰다. 조직을 5분간 3번 세척한 뒤 peroxidase를 제거하기 위해 3% 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)에 5분 간 반응 시킨 후 다시 3번 세척하고, equilibration buffer를 5분간 적용한 다음 Working Strength TdT buffer Enzyme를 CO<sub>2</sub> Chamber를 이용하여 37°C로 1시간 반응시켰다. TdT buffer 반응을 멈추기 위해 조직이 담겨있는 buffer를 pipet으로 모두 제거한 뒤 wash buffer에 10분간 적용시켰다. 가슴이 가능한 습한 환경에서 30분간 Anti Digoxigenin을 30분간 반응시킨 후 조직을 5분간 3번 세척한 뒤 1차로 avidin biotin peroxidase complex(Vectastain-Elite ABC kit, Vector Laboratories)를 사용하여 발색시켰다. 그 후에 3번 세척하고 2차로 0.01M sodium acetate를 섞은 0.5%(w:v) Methyl Green을 이용하여 6분간 발색시켰다. 이후 3분씩 10번 세척 후 gelatin으로 코팅된 슬라이드에 조직을 올리고 24시간 건조 후 70%, 80%, 90%, 100% 에탄올에 각 1분씩 탈수시키고 xylene을 이용하여 투명화 시켜 Premount를 사용하여 봉인한 뒤 광학 현미경으로 관찰하였다.

## 8. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

각 집단에서 철의 수준을 측정하기 위해 Iron assay kit (MAK025, Sigma-aldrich, USA)를 사용하였으며 샘플은 대뇌피질 조직(10mg)을 막자사발과 액화질소를 이용하여 함께 파쇄하고, Iron assay buffer와 혼합하여 균질화 시킨 후 원심분리기 (Micro-centrifuge, 5417R, Eppendorf)를 사용하여 원심분리 (14,000rpm, 10min, 4 °C) 한 후 상층액을 얻었다. 96 well plate에 샘플 30 µL와 Assay buffer 70 µL를 혼합하여 100 µL를 넣었다. 그 후 각 시료에 5 µL의 Iron Reducer를 추가 후 수평 셰이커를 사용하여 실온에서 30분간 반응을 일으킨 후 100 µL의 Iron probe를 추가적으로 넣고 다시 수평 셰이커를 사용하여 실온에서 30분간 적용하였다. 이 과정이 끝난 후 Micropalate Reader를 이용하여 593nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한, 산화스트레스 수준을 알아보기 위해 malondialdehyde(MDA)를 분석하였다. MDA 분석은 Graidsience(E-BC-K025-S, Graidsience, 중국)의 키트를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 분석하였다. MDA는 532nm에서 흡광도를

측정하였으며, MDA 수준은 mg당 단백질 nmol로 표현하였다.

## 9. 자료처리

실험을 통해서 얻어진 결과는 SPSS version 20.0 통계 프로그램을 이용하여 평균과 표준편차(Mean±SD)를 산출하였다. 집단 간 변인의 차이를 확인하기 위해 일원변량분석(one-way ANOVA)을 실시하였으며, 사후 검정은 Bonferroni's 검정방법을 사용하였다. 모든 검증의 통계적 유의수준은  $\alpha=.05$ 로 설정하였다.

# III. 연구결과

## 1. Concentration of iron의 변화

12주간의 트레이드밀 운동 후 해마 부분의 철 농도를 확인하기 위해 효소면역측정법(ELISA) 분석을 실시하였다<fig 2B>. Total fe, Fe<sup>2+</sup>와 Fe<sup>3+</sup>를 분석한 결과 집단간 통계적으로 유의한 차이가 나타나 사후 분석을 실시하였다(Total fe: F=105.908,  $p=.001$ , Fe<sup>2+</sup>: F=61.978,  $p=.001$ ; Fe<sup>3+</sup>: F=30.173,  $p=.001$ ). 세 변인 모두 AD-C 집단은 NAD-C 집단보다 유의하게 증가한 결과가 나타났으며(Total fe:  $p=.001$ , Fe<sup>2+</sup>:  $p=.001$ ; Fe<sup>3+</sup>:  $p=.001$ ), AD-TE 집단은 AD-C 집단에 비해 유의하게 감소한 결과가 나타났다(Total fe:  $p=.010$ , Fe<sup>2+</sup>:  $p=.002$ ).

다음으로 12주간의 트레이드밀 운동 후 해마 부분의 철의 항상성을 조절하는 단백질과 ferritin subunit을 분석하였다<fig 2A, C>. 먼저, 철을 세포내로 유입하는데 관여하는 인자인 DMT-1, Transferrin, TfR1을 분석한 결과, 모든 변인에서 통계적으로 유의한 차이가 나타나 사후검증을 실시하였다(DMT-1: F=41.569,  $p=.001$ , Transferrin: F=15.522,  $p=.001$ ; TfR1: F=21.726,  $p=.001$ ). 세 변인 모두 AD-C 집단은 NAD-C 집단보다 유의하게 증가한 결과가 나타났으며(DMT-1:  $p=.001$ , Transferrin:  $p=.001$ ; TfR1:  $p=.001$ ), AD-TE 집단은 AD-C 집단에 비해 유의하게 감소한 결과가 나타났다(DMT-1:  $p=.001$ , Transferrin:  $p=.005$ ; TfR1:  $p=.001$ ).

또한, 세포외로 철을 수출하는 단백질인 Fpn1 역시 집단간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다(F=5.714,  $p=.014$ ). 사후 검증한 결과 AD-C 집단은 NAD-C 집단보다 유의하게 감소한 결과가 나타났으며( $p=.028$ ), AD-TE는 AD-C 집단에 비해 유의하게 증가한 결과가 나타났다( $p=.035$ ). 다음으로 세포 내 철을 저장하는 ferritin의 subunit인 L-chain ferritin과 H-chain ferritin을 분석한 결과 집단 간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다(L-chain ferritin: F=92.172,  $p=.001$ , H-chain ferritin: F=42.825,  $p=.001$ ). 사후검증을 실시한 결과, 두 단백질 모두 AD-C 집단은 NAD-C 집단보다 유의하게 증가한 결과가 나타났으며(L-chain ferritin:  $p=.001$ , H-chain ferritin:  $p=.001$ ), AD-TE는 AD-C 집단에 비해 유의하게 감소한 결과가 나타났다(L-chain ferritin:  $p=.001$ , H-chain ferritin:  $p=.001$ ).

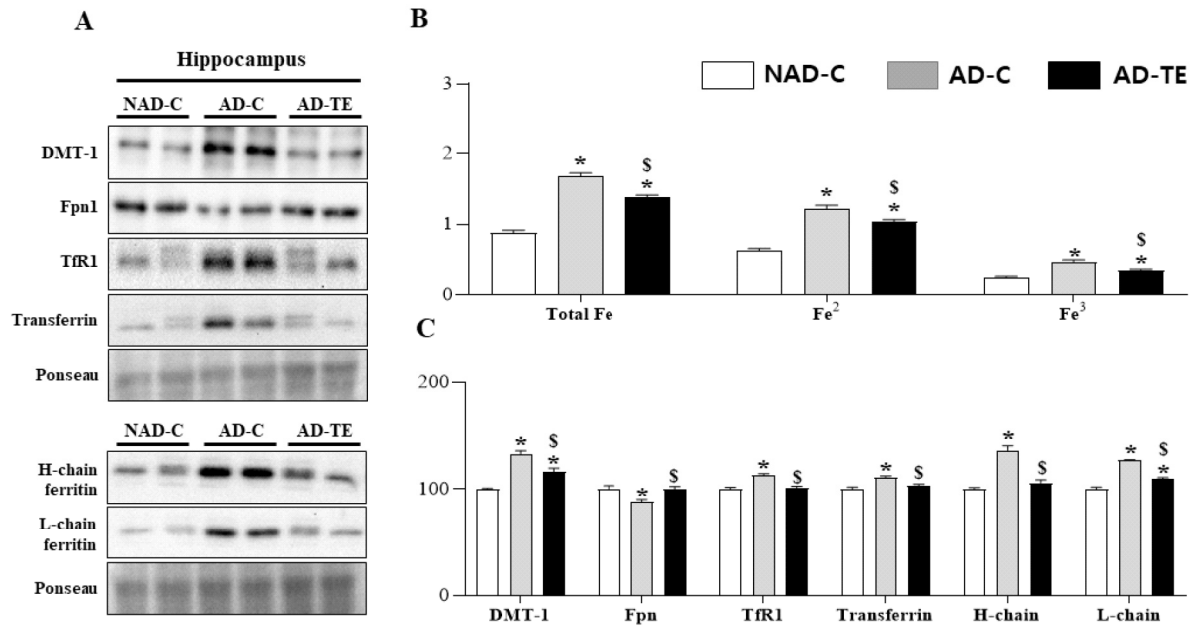


Fig 2. Treadmill exercise alleviates brain iron dyshomeostasis in the hippocampus of AD mice. (A) Representative western blot image of DMT-1, FPN1, TfR1, Transferrin, H-chain ferritin and L-chain ferritin (n=6 per group). (B) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of iron level in the hippocampus of all groups of mice, Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> and total Fe levels by ELISA analysis (n=6 per group). (C) Quantitation for DMT-1, Fpn1, TfR1, Transferrin, L-chain ferritin and H-chain ferritin levels. Bonferroni post hoc test after ANOVA. Values are mean±SD. \**p*<0.05, vs. NAD-C; \$*p*<0.05, vs. AD-C.

## 2. Amyloid-β의 변화

12주간의 트레드밀 운동 후 해마 부분에서 non-amyloidogenic의 신호전달을 유도하는 furin과 amyloid-β를 분석하였다(Fig 3A). furin과 amyloid-β는 집단 간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다(furin: *F*=10.057, *p*=0.002, amyloid-β: *F*=27.197, *p*=0.001). 사후검증을 실시한 결과 두 단백질 모두 AD-C 집단은 NAD-C 집단보다 유의한 차이가 나타났으며(furin: *p*=0.002, amyloid-β: *p*=0.001), AD-TE는 AD-C 집단에 비해 유의한 차이가 나타났다(furin: *p*=0.029, amyloid-β: *p*=0.001). Immunofluorescence 방법을 이용해 조직내 amyloid-β(6E10)을 분석한 한 결과 해마에서 AD-C 집단에서 Aβ-6E10 염색 수준이 NAD-C 집단과 비교하여 증가된 것으로 확인되었지만 운동을 실시한 AD-TE 집단에서 그 염색 수준이 유의하게 감소된 것으로 나타났다(Fig 3E). 마지막으로 해마에 축적된 total Fe와 amyloid-β의 상관도를 분석한 결과 매우 높은 정적 상관관계를 가지는 것으로 나타났다(Fig 3D).

## 3. Tau와 Tau 인산화 관련 단백질의 변화

12주간의 트레드밀 운동 후 해마 부분의 tau 과인산화를 억제하는 단백질을 분석하였다(Fig 4A). tau 과인산화를 억제하는 단백질인 Calpain, p35, CDK5와 GSK3αβ를 분석한 결과, 모두 집단 간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다(Calpain: *F*=122.508, *p*=0.001, p35: *F*=49.099, *p*=0.001; CDK5: *F*=13.724, *p*=0.001, GSK3αβ: *F*=46.973, *p*=0.001). 사후검증을 실시한 결과, calpain, p35과 CDK5에서 AD-C 집단은 NAD-C 집단보다 유의하게 증가한 결과가 나타났으며

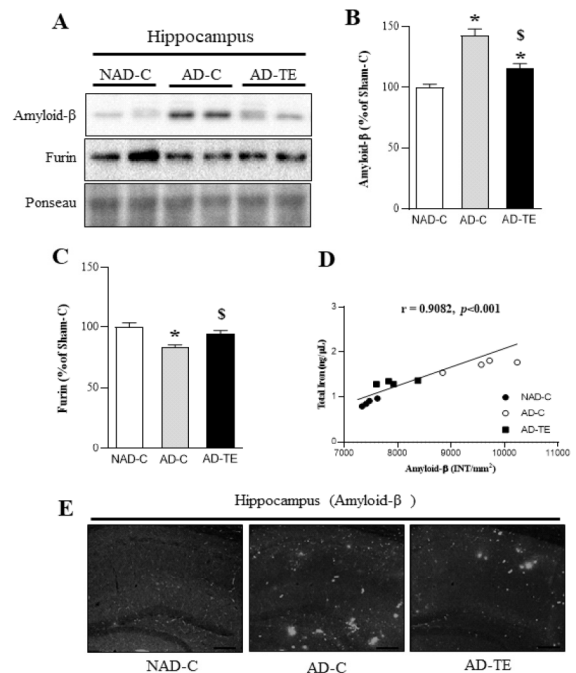


Fig. 3. Treadmill exercise alleviates brain Amyloid-β and Furin in the hippocampus of AD mice. (A) Representative western blot image of Amyloid-β and Furin (n=6 per group). (B, C) Quantitation for Amyloid-β and Furin levels. (D) Correlation analysis of Amyloid-β and total iron in the hippocampus. (E) Representative Immunofluorescence of Amyloid-β(6E10) in the hippocampus (n=4 per group). Bonferroni post hoc test after ANOVA. Data represent the mean±SD. \**p*<0.05, vs. NAD-C; \$*p*<0.05, vs. AD-C.

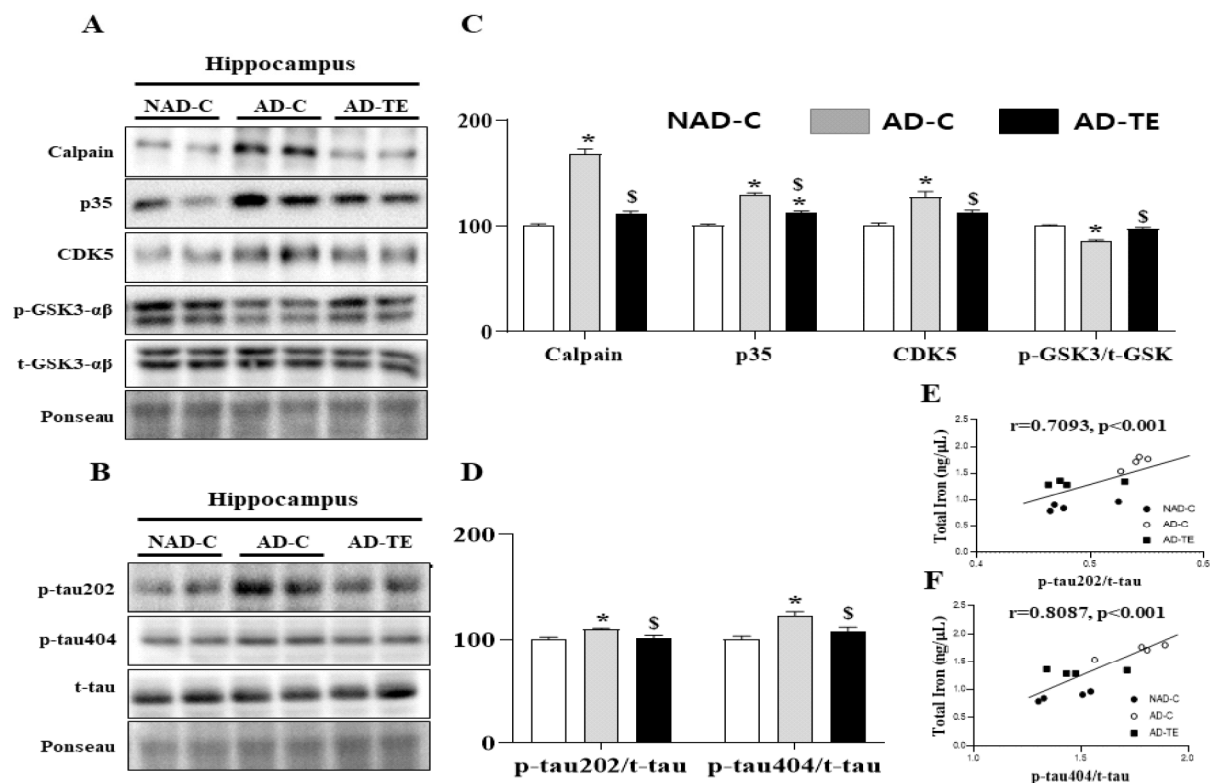


Fig 4. Treadmill exercise alleviates tau phosphorylation-related protein in the hippocampus of AD mice. (A-B) Representative western blot image of Calpain, p35, CDK5, p-GSK3- $\alpha\beta$ , p-tau202 and p-tau404 (n=6 per group). (C-D) Quantitation for Calpain, p35, CDK5 and p-GSK3- $\alpha\beta$  levels. Bonferroni post hoc test after ANOVA. (E-F) Correlation analysis of p-tau202, p-tau404 and total iron in the hippocampus. Data represent the mean $\pm$ SD. \* $p<0.05$ , vs. NAD-C; \$ $p<0.05$ , vs. AD-C.

(Calpain:  $p=0.001$ , p35:  $p=0.001$ ; CDK5:  $p=0.001$ ), AD-TE는 AD-C 집단 에 비해 유의하게 감소한 결과가 나타났다(Calpain:  $p=0.001$ , p35:  $p=0.001$ ; CDK5:  $p=0.004$ ). 또한, GSK3  $\alpha\beta$ 에서 AD-C 집단은 NAD-C 집단보다 유의하게 감소한 결과가 나타났으며( $p=0.001$ ), AD-TE는 AD-C 집단에 비해 유의하게 증가한 결과가 나타났다( $p=0.001$ ).

다음으로 12주간의 트레드밀 운동 후 해마 부분의 tau 과인산화의 변화를 분석하였다<fig 4B>. tau의 인산화 단백질 중 p-tau202와 p-tau404를 분석한 결과, 모두 집단 간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다(p-tau202:  $F=7.264$ ,  $p=0.006$ , p-tau404:  $F=10.231$ ,  $p=0.002$ ). 사후검증을 실시한 결과, p-tau202와 p-tau404에서 AD-C 집단은 NAD-C 집단보다 유의하게 증가한 결과가 나타났으며 (p-tau202:  $p=0.009$ , p-tau404:  $p=0.001$ ), AD-TE는 AD-C 집단에 비해 유의하게 감소한 결과가 나타났다(p-tau202:  $p=0.029$ , p-tau404:  $p=0.034$ ). 또한, 해마에 축적된 total Fe와 tau 단백질의 상관도를 분석한 결과 높은 정적 상관관계를 가지는 것으로 나타났다 (p-tau202:  $r=0.7093$ ,  $p=0.001$ ; p-tau404:  $r=0.8087$ ,  $p=0.001$ ).

#### 4. ferroptosis의 변화

12주간의 트레드밀 운동 후 해마 부분의 ferroptosis의 변화를 분석하였다<fig 5A>. 세포의 분화와 증식에 중요한 역할을 하는 ERK와 JNK를 분석한 결과, 모두 집단 간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다(ERK:  $F=10.231$ ,  $p=0.002$ , JNK:  $F=7.264$ ,  $p=0.006$ ). 사후검증을 실시한 결과, ERK와 JNK에서 AD-C 집단은 NAD-C 집단보다 유의하게 증가한 결과가 나타났으며(ERK:  $p=0.001$ , JNK:  $p=0.009$ ), AD-TE는 AD-C 집단에 비해 유의하게 감소한 결과가 나타났다 (ERK:  $p=0.034$ , JNK:  $p=0.029$ ). 또한, 산화 스트레스의 주요 지표인 malondialdehyde(MDA)를 분석한 결과 집단 간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다( $F=20.413$ ,  $p=0.001$ ). 사후검증을 실시한 결과 AD-C 집단은 NAD-C 집단보다 유의하게 증가한 결과가 나타났으며 ( $p=0.001$ ), AD-TE는 AD-C 집단에 비해 유의하게 감소한 결과가 나타났다( $p=0.006$ , Fig 5C). Ferroptosis를 분석하기 위해 TUNEL staining을 실시한 결과 세포사멸의 수준이 NAD-C 집단과 비교하여 증가된 것으로 확인되었지만 운동을 실시한 AD-TE 집단에서 그 염색 수준이 유의하게 감소된 것으로 나타났다(Fig 5D).

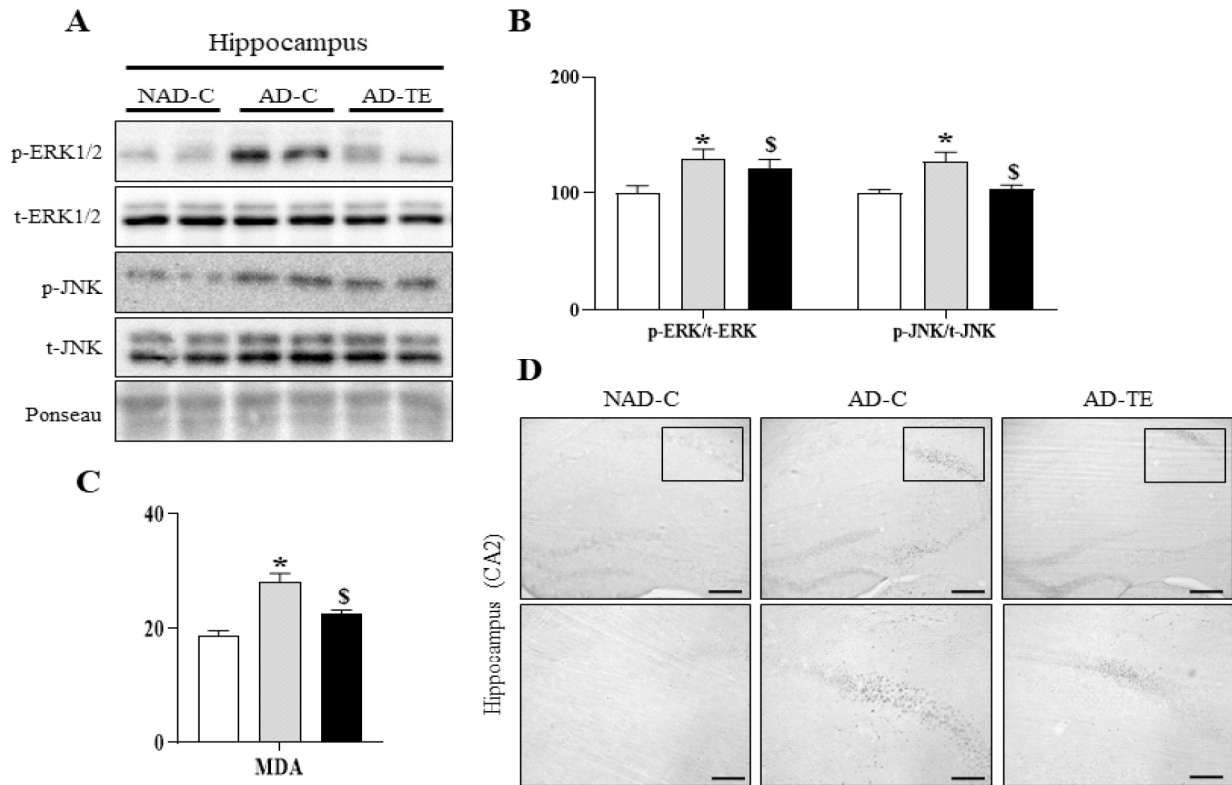


Fig. 5. Treadmill exercise alleviates ferroptosis in the hippocampus of AD mice. (A) Representative western blot image of p-ERK1/2 and p-JNK (n=6 per group). (B) Quantitation for p-ERK1/2 and p-JNK levels. (C) MDA levels by ELISA analysis (n=6 per group). (D) Representative images of neuronal cell death marker TUNEL in the hippocampus(CA2) regions (n=4 per group). Bonferroni post hoc test after ANOVA. Data represent the mean±SD. \* $p<0.05$ , vs. NAD-C; \$ $p<0.05$ , vs. AD-C.

## 5. 인지기능의 변화

12주간의 트레드밀 운동 후 인지기능의 변화를 알아보기 위해 행동검사를 실시하였다. 먼저 수중미로검사를 실시한 결과<fig 6A, B>, 처음으로 도피대에 도달한 수영시간과 수영거리를 분석한 결과 집단간 유의한 차이가 나타났다(Latency:  $F=222.666$ ,  $p=0.001$ , Distance:  $F=14.630$ ,  $p=0.001$ ). 사후검증을 실시한 결과, 수중미로검사의 Latency와 Distance에서 AD-C 집단은 NAD-C 집단보다 유의하게 증가한 결과가 나타났으며(Latency:  $p=0.001$ , Distance:  $p=0.001$ ), AD-TE는 AD-C 집단에 비해 유의하게 감소한 결과가 나타났다(Latency:  $p=0.001$ , Distance:  $p=0.001$ ).

다음으로 수동회피검사를 실시한 결과<fig 6C>, 집단간 유의한 차이가 나타났다( $F=221.872$ ,  $p=0.001$ ), 사후검증을 실시한 결과, AD-C 집단은 NAD-C 집단보다 유의하게 감소한 결과가 나타났으며( $p=0.001$ ), AD-TE는 AD-C 집단에 비해 유의하게 증가한 결과가 나타났다( $p=0.001$ ).

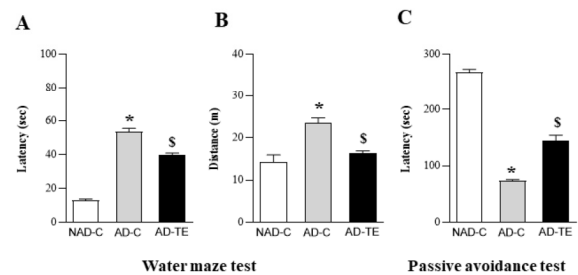


Fig 6. The effects of treadmill exercise on behavioral function in aged APP-C105 mice. (A-B) Experimental protocol for Water maze test (n=10 per group). Distance and Latency to target in the probe trial. (C) Experimental protocol for passive avoidance test (n=10 per group). Latencies to entry into the dark chamber on retention testing session after 72 hours of acquisition trial. Bonferroni post hoc test after ANOVA. Values are mean±SD. \* $p<0.05$  vs. NAD-C; \$ $p<0.05$  vs. AD-C.

## IV. 논의

본 연구의 목적은 12주간 트레드밀 운동이 알츠하이머 질환 동물에서 철 항상성을 조절하는 단백질들의 발현 수준에 미치는 영향을 알아보고자 하였으며, 이에 따른 Amyloid- $\beta$ ( $\Lambda\beta$ )와 tau 단백질

질의 변화를 분석하였고, 흥미로운 결과를 얻었다. 첫째, 트레드밀 운동은 AD 동물의 해마에서 철 조절 단백질의 기능을 향상시킴으로서 과잉 축적된 철의 감소를 확인하였다. 둘째, 트레드밀 운동은 AD 동물의 해마에서 Furin 단백질을 증가시켜 Non Amyloidgenic pathway로 진행시켜 A $\beta$ 를 감소시켰다. 셋째, 트레드밀 운동은 AD 동물의 해마에서 tau 인산화 조절 단백질의 기능향상으로 tau 과인산을 억제하였다. 넷째, 트레드밀 운동은 AD 동물의 해마에서 산화스트레스 지표인 MDA를 감소시켰으며, 신경세포사멸을 억제하여 인지기능 향상시켰다. 이러한 결과는 트레드밀 운동이 알츠하이머 질환에서 철 대사의 항상성을 유지하여 A $\beta$ 의 축적과 tau 과인산화를 억제하여 인지기능을 개선하는데 관련이 있음을 입증하였습니다.

뇌내 철은 노화와 함께 증가하는데, 철의 축적이 알츠하이머 질환과의 관련성을 보고하였다(Gallagher et al., 2012; LeVine, 2007; Tannir et al., 2006). 본 연구에서는 AD 질환의 해마에서 철(Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> 및 Total Fe)의 수준이 증가하였지만, 트레드밀 운동을 통해 NAD-C의 동물과 유사한 수준으로 감소하였다. 이러한 결과는 트레드밀 운동이 뇌의 철 수준을 조절하여 알츠하이머 질환과 노화로 인한 인지기능 손상을 개선시키는 핵심 요소로 볼 수 있다.

세포내에 철 수준의 항상성은 주로 두 가지로 조절된다. 혈중에 있는 철은 Transferrin(Tf)과 결합하여 세포막에 있는 Transferrin Receptor 1(TfR1)을 통해 유입되거나 세포막에 있는 Divalent Metal iron Transporter 1(DMT-1)을 통해 유입된다. 세포 밖으로 철을 유출하는 기전은 대표적으로 Ferroportin 1(FPN1)을 통해 배출한다고 알려져 있다(Tandara et al., 2012; Moos et al., 2007; Deane et al., 2004). 본 연구에서는 철을 세포내로 유입하는 Transferrin, TfR1과 DMT1을 분석한 결과 알츠하이머 집단에서 유의하게 증가된 것을 확인하였다. 또한, 철을 세포 밖으로 유출하는 FPN1을 분석한 결과 알츠하이머 집단에서 유의하게 감소하였다. 이러한 이유로 세포 내 철 항상성의 균형을 무너져 철을 저장하는 단백질인 H/L-chain ferritin의 수준이 증가된 것으로 사료된다.

트레드밀 운동은 FPN1의 수준을 증가시켰고, Transferrin, TfR1과 DMT1을 감소시켜 세포 내 과잉 축적된 철을 조절한 것으로 볼 수 있다. 이는 Choi et al., (2021)의 연구 결과와 일치한다. 트레드밀 운동은 철의 항상성 개선에 매우 중요한 역할을 한다고 볼 수 있다.

알츠하이머 질환의 대표적인 병리학적인 특징은 Amyloid precursor protein(APP)의 분해로 발생하는 Amyloid- $\beta$ (A $\beta$ )가 축적되는 것이다. Furin 단백질은 세포내 철의 수준에 따라 A $\beta$ 의 생성을 조절하는 기능을 가지고 있다(Silvestri & Camaschella, 2008). 본 연구에서는 APP-Amyloid plaque formation 관련된 단백질인 Furin과 A $\beta$ 를 분석하였다. Furin은 알츠하이머 질환에서 감소하였으며, 결과적으로 A $\beta$ 에서도 알츠하이머 질환에서 유의하게 증가하였다. 이는 Hoe et al., (2007)의 연구에서 보고한 바와 같이 과잉 축적된 철에 의해 sAPP $\alpha$ 의 생산을 조절하는 furin 수준이 감소하여  $\alpha$ -secretase를 감소시키고,  $\beta$ -secretases를 증가시킨 결과

와 일치한다.

트레드밀 운동은 Furin을 유의하게 증가하였고, A $\beta$ 는 유의하게 감소하였다. Choi et al., (2021)의 연구에서도 트레드밀 운동은 세포내 철의 농도를 감소시킴으로서 Furin과 ADAM10을 활성화시켜 Non Amyloidgenic pathway로 진행되어 신경보호 역할을 하는 것으로 보고하였다. 즉, 세포내 철의 감소는 알츠하이머 질환 뇌의 A $\beta$  축적을 감소하여 개선하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

알츠하이머 질환은 세포 외 A $\beta$ 와 더불어 세포 내 tau 단백질의 과인산화로 인한 신경섬유원 농축(neurofibrillary tangle)의 축적을 원인으로 보고되고 있다(Selkoe and Hardy, 2016). 또한, Tau의 과인산화로 인해 축적된 neurofibrillary tangles에도 철이 존재하고 있으며(Good et al., 1992; Smith et al., 1997), 철은 tau와 결합하여 과인산화를 유발할 수 있다고 보고되었다(Garcia et al., 1993; Sayre et al., 1997). 철의 조절은 tau 인산화 및 tau 인산화 조절 단백질의 중요한 역할을 나타냈지만 이에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

본 연구에서도 알츠하이머 질환에서 tau 인산화 형태인 p-tau202와 p-tau404가 증가하였지만, 트레드밀 운동을 통해 감소한 것으로 나타났다. 또한, 알츠하이머 질환에서 tau 과인산에 영향을 미치는 Calpain이 하면서 하부 전달 경로인 p35와 CDK5가 증가하면서 Tau 인산화를 가속화시켰으며, GSK3A $\beta$ 의 감소도 Tau 과인산화에 영향을 끼쳐 신경 섬유 엉킴(NFT)의 형성을 유도하여 선행연구의 결과와 일치하였다(Hanger et al., 2009; Zhang et al., 2018). 하지만, 트레드밀 운동은 Calpain, p35와 CDK5도 감소시켰다. 또한, GSK3A $\beta$ 의 증가시키며 tau 인산화를 감소시켰다. 이는 과잉 축적된 철이 tau 과인산화를 유도하지만, 트레드밀 운동이 이를 억제하는 것을 발견하였다. 따라서, 트레드밀 운동이 비정상적인 철 대사를 개선할 수 있고 알츠하이머병의 진행을 예방하는 효과적인 전략이 될 수 있음을 시사한다.

알츠하이머 질환 뇌의 과잉 축적된 철은 독성 활성 산소의 생성으로 세포를 손상시키고 결국 신경세포사멸을 유도한다(Crichton et al., 2011; Friedman et al., 2011; Honda et al., 2004). 특히, 세포내 Fe<sup>2+</sup>는 Fenton 반응을 통해 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)와 반응하여 활성산소종을 생성하여 산화스트레스를 유발한다고 보고하고 있다(Greenough et al., 2013; Winterbourn et al., 2002). 산화스트레스 지표인 지질과산화물 중의 하나인 Malondialdehyde(MDA)는 알츠하이머 질환에서 높게 나타났으며, 12주간의 트레드밀 운동후에는 감소한 것으로 나타났다. 이는 여러 선행연구의 결과와 일치한다(Souza et al., 2013; Xu et al., 2014; Um et al., 2011). 규칙적인 신체활동은 산화 스트레스를 감소시키고, 에너지 대사를 증가시켜 알츠하이머 질환 개선에 효율적인 것으로 볼 수 있다(Radak et al., 2010).

철의 과잉 축적으로 산화스트레스가 증가하게 되면 세포사멸에 관여하는 ERK와 JNK의 인산화가 증가한다고 보고되고 있다(Wang et al., 2017; Wu et al., 2013). 본 연구에서는 알츠하이머 질환에서 p-ERK와 p-JNK의 증가가 나타났으며, TUNEL 양성 세포수가 증가

한 것으로 신경세포 사멸을 확인하였다. 이는 철 축적으로 인한 산화스트레스로 유발된 세포 사멸의 한 유형인 페로프토시스(ferroptosis)를 발생시킨다(Wu et al., 2013; Shi et al., 2010; Li et al., 2020). 하지만, 트레드밀 운동은 산화스트레스로부터 p-ERK와 p-JNK를 감소시켰으며, 결국 TUNEL 양성 세포의 수가 감소한 결과가 나타났다. 이 결과는 트레드밀 운동이 피질과 해마 치상회에서 TUNEL 양성 세포와 세포 사멸 단백질의 수를 크게 감소시킨다는 이전의 연구와 일치한다(Wu et al., 2013; Um et al., 2011; Do et al., 2018). 이것은 트레드밀 운동이 AD에서 신경 세포 사멸의 억제제를 통해 신경 기능을 향상시킨다고 볼 수 있다.

이와 같은 결과가 나타나는 알츠하이머 질환과 관련된 다수의 연구에서 인지 기능 및 학습 장애가 관련이 있음이 보고되고 있다(Kang et al., 2013; Koo et al., 2017; Choi et al., 2014; Cho et al., 2003). 따라서, 본 연구에서는 수증미로검사와 수동회피검사를 통해 트레드밀 운동이 알츠하이머 질환에서 나타나는 인지 기능 및 학습 장애에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다. 트레드밀 운동은 수증미로검사에서 타겟을 찾아가는 시간과 거리를 단축시켰으며, 수동회피검사에서도 기억능력을 향상시켰다. 이러한 결과는 선행 연구와 일치한다(Choi et al., 2014; Yu et al., 2019). 위에서 언급한 바와 같이, 트레드밀 운동은 인지 결손을 회복시켜 운동이 알츠하이머병의 진행을 예방하거나 늦출 수 있음을 시사한다.

본 연구는 처음으로 트레드밀 운동이 과잉 축적된 철의 수준을 감소시켜, A $\beta$ 의 축적과 tau의 과인산화를 완하시켰다. 또한, 트레드밀 운동은 철의 축적으로 인한 산화스트레스를 감소시킴으로써 신경 세포 사멸을 감소시키는 것으로 볼 수 있다. 따라서, 트레드밀 운동에 의한 과잉 축적된 철의 관리는 알츠하이머 질환의 인지 기능을 향상시킬 수 있는 새로운 연구 주제로 사료된다.

## V. 결론 및 제언

본 연구는 트레드밀 운동이 알츠하이머 질환 동물 뇌에서 철의 항상성을 조절하는 요인의 따라 아밀로이드 단백질과 Tau 단백질의 변화를 알아보고, 이에 따른 산화스트레스와 세포사멸에 미치는 효과를 분석하여 철 대사가 뇌 건강에 미치는 영향과 운동을 통한 개선 효과를 알아보는데 있다. 12주간의 트레드밀 운동은 철의 항상성을 개선하여 세포 내 철의 축적을 감소하였으며, A $\beta$ 와 tau의 과인산화를 감소시켰다. 또한, 과잉 축적된 철에 의해 발생하는 산화스트레스와 신경세포사멸이 감소하여 궁극적으로 인지 기능이 향상되었다. 따라서 트레드밀 운동은 알츠하이머 질환의 예방 및 치료에 효과적일 것이다. 추후 알츠하이머 질환과 같은 신경퇴행성 질환과 철의 관계를 규명하고자 후속 연구가 필요하다.

## 참고문헌

- 중앙치매센터. (2018). 2018 중앙치매센터 연차보고서(www.nid.or.kr).
- Adlard, P. A., Perreau, V. M., Pop, V., & Cotman, C. W. (2005). Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 25(17):4217-4221.
- Born, H. A. (2015). Seizures in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 286:251-263.
- Cho, J. Y., Hwang, D. Y., Kang, T. S., Shin, D. H., Hwang, J. H., Lim, C. H., Lee, S. H., Lim, H. J., Min, S. H., Seo, S. J., Song, Y. S., Nam, K. T., Lee, K. S., Cho, J. S., & Kim, Y. K. (2003). Use of NSE/PS2m-transgenic mice in the study of the protective effect of exercise on Alzheimer's disease. *Journal of Sports Science and Medicine*, 21(11):943-951.
- Choi, D. H., Kwon, K. C., Hwang, D. J., Koo, J. H., Um, H. S., Song, H. S., Kim, J. S., Jang, Y., & Cho, J. Y. (2021). Treadmill Exercise Alleviates Brain Iron Dyshomeostasis Accelerating Neuronal Amyloid- $\beta$  Production, Neuronal Cell Death, and Cognitive Impairment in Transgenic Mice Model of Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*, 58(7):3208-3223.
- Choi, D. H., Kwon, I. S., Koo, J. H., Jang, Y. C., Kang, E. B., Byun, J. E., Um, H. S., Park, H. S., Yeom, D. C., Cho, I. H., & Cho, J. Y. (2014). The effect of treadmill exercise on inflammatory responses in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry*, 18(2):225-233.
- Crespo, Â. C., Silva, B., Marques, L., Marcelino, E., Maruta, C., Costa, S., Timóteo, A., Vilares, A., Couto, F. S., Faustino, P., Correia, A. P., Verdelho, A., Porto, G., Guerreiro, M., Herrero, A., Costa, C., de Mendonça, A., Costa, L., & Martins, M. (2014). Genetic and biochemical markers in patients with Alzheimer's disease support a concerted systemic iron homeostasis dysregulation. *Neurobiology of Aging*, 35(4):777-85.
- Grichton, R. R., Dexter, D. T., & Ward, R. J. (2011). Brain iron metabolism and its perturbation in neurological diseases. *Journal of Neural Transmission*, 118:301-314.
- Deane, R., Zheng, W., & Zlokovic, B. V. (2004). Brain capillary endothelium and choroid plexus epithelium regulate transport of transferrin-bound and free iron into the rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 88(4):813-820.
- Do, K., Laing, B. T., Landry, T., Bunner, W., Mersaud, N.,

- Matsubara, T., Li, P., Yuan, Y., et al (2018) The effects of exercise on hypothalamic neurodegeneration of Alzheimer's disease mouse model. *PLoS One*, 13(1):e0190205.
- Friedman, A., Arosio, P., Finazzi, D., Koziorowski, D., & Galazka-Friedman, J. (2011). Ferritin as an important player in neurodegeneration. *Parkinsonism & Related Disorders*, 17(6):423-30.
- Gallagher, J. J., Finnegan, M. E., Grehan, B., Dobson, J., Collingwood, J. F., & Lynch, M. A. (2012). Modest amyloid deposition is associated with iron dysregulation, microglial activation, and oxidative stress. *J Alzheimers Dis* 28: 147-161.
- Good, P. F., Perl, D. P., Bierer, L. M., & Schmeidler, J. (1992). Selective accumulation of aluminum and iron in the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: a laser microprobe (LAMMA) study. *Ann. Neurol* 31, 286-292.
- Greenough, M. A., Camakaris, J., & Bush, A. I. (2013). Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 62, 540-555.
- Hanger, D. P., Anderton, B. H., & Noble, W. (2009). Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol. Med* 15, 112-119.
- Hoe, H. S., Cooper, M. J., Burns, M. P., Lewis, P. A., van der Brug, M., Chakraborty, G., Cartagena, C. M., Pak, D. T., Cookson, M. R., & Rebeck, G. W. (2007). The metalloprotease inhibitor TIMP-3 regulates amyloid precursor protein and apolipoprotein E receptor proteolysis. *Journal of Neuroscience*, 27:10895-10905.
- Honda, K., Casadesus, G., Petersen, R. B., Perry, G., & Smith, M. A., (2004). Oxidative stress and redox-active iron in Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1012:179-182.
- Kang, E. B., Kwon, I. S., Koo, J. H., Kim, E. J., Kim, C. H., Lee, J., Yang, C. H., Lee, Y. I. & et al (2013) Treadmill exercise represses neuronal cell death and inflammation during A $\beta$ -induced ER stress by regulating unfolded protein response in aged presenilin 2 mutant mice. *Apoptosis*, 18(11):1332-1347.
- Koo, J. H., Kang, E. B., Oh, Y. S., Yang, D. S., & Cho, J. Y. (2017). Treadmill exercise decreases amyloid- $\beta$  burden possibly via activation of SIRT-1 signaling in a mouse model of Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*, 288:142-152.
- Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., & Cummings, J. L. (2015). Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primers*, 1, 15056.
- Moos, T., Rosengren Nielsen, T., Skjorringe, T., & Morgan, E. H. (2007). Iron trafficking inside the brain. *Journal of Neurochemistry*, 103:1730-1740.
- Li, J., Cao, F., Yin, H. L., Huang, Z. J., Lin, Z. T., Mao, N., Sun, B., & Wang, G. (2020). Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis*, 11(2).
- Lista, S., O'Bryant, S. E., Blennow, K., Dubois, B., Hugon, J., Zetterberg, H., & Hampel, H. (2015). Biomarkers in Sporadic and Familial Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 47(2), 291-317.
- Palmour, R. M., & Sutton, H. E. (1971). Vertebrate transferritins, molecular weights, chemical compositions, and iron-binding studies. *Biochemistry*. 10: 4026-4032,
- Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 362(4): 329-344.
- Radak, Z., Hart, N., Sarga, L., Koltai, E., Atalay, M., Ohno, H., & Boldogh, I. (2010). Exercise plays a preventive role against Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(3):777-83.
- Rogers, J. T., Randall, J. D., Cahill, C. M., Eder, P. S., Huang, X., Gunshin, H., Leiter, L., McPhee, J., Sarang, S. S., Utsuki, T., Greig, N. H., Lahiri, D. K., Tanzi, R. E., Bush, A. I., Giordano, T., & Gullans, S. R. (2002). An iron-responsive element type II in the 5'-untranslated region of the Alzheimer's Amyloid precursor protein transcript. *The Journal of Biological Chemistry*, 277:45518-45528.
- Sayre, L. M., Perry, G., Harris, P. L. R., Liu, Y., Schubert, K. A., & Smith, M. A. (2000). In situ oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease: a central role for bound transition metals. *J Neurochem*, 74: 270-9.
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews* 81(2): 741-66.
- Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 8(6): 595-608.
- Shi, Z. H., Nie, G., Duan, X. L., Rouault, T., Wu, W. S., Ning, B., Zhang, N., Chang, Y. Z. & et al. (2010). Neuroprotective mechanism of mitochondrial ferritin on 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell damage: implication for neuroprotection in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*, 13(6):783-796.
- Silvestri, L., & Camaschella, C. (2008). A potential pathogenetic role

- of iron in Alzheimer's disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12:1548-1550.
- Smith, M. A., Harris, P. L., Sayre, L. M., Perry, G. (1997). Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 9866-9868
- Souza, L. C., Filho, C. B., Goes, A. T., Fabbro, L. D., de Gomes, M. G., Savegnago, L., Oliveira, M. S., & Jesse, C. R. (2013). Neuroprotective effect of physical exercise in a mouse model of Alzheimer's disease induced by  $\beta$ -amyloid1-40 peptide. *Neurotox Res*, 24(2):148-163.
- Tachida, Y., Nakagawa, K., Saito, T., Saido, T. C., Honda, T., Saito, Y., Murayama, S., Endo, T., Sakaguchi, G., Kato, A., Kitazume, S., & Hashimoto, Y. (2008). Interleukin-1 $\beta$  up-regulates TACE to enhance  $\alpha$ -cleavage of APP in neurons: resulting decrease in A $\beta$  production. *Journal of Neurochemistry*, 104(5):1387-93.
- Tandara, L. & Salamunic, I. (2012). Iron metabolism: current facts and future directions. *Biochemical Medicine*, 22(3):311-28.
- Um, H. S., Kang, E. B., Koo, J. H., Kim, H. T., Jin, L., Kim, E. J., Yang, C. H., An, G. Y. & et al. (2011). Treadmill exercise represses neuronal cell death in an aged transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci Res*, 69(2):161-173.
- Um, H. S., Kang, E. B., Leem, Y. H., Cho, I. H., Yang, C. H., Chae, K. R., Hwang, D. Y., & Cho, J. Y. (2008). Exercise training acts as a therapeutic strategy for reduction of the pathogenic phenotypes for Alzheimer's disease in an NSE/APPsw-transgenic model. *International Journal of Molecular Medicine*, 22(4):529-539.
- Wang, P., Wu, Q., Wu, W., Li, H., Guo, Y., Yu, P., Gao, G., Shi, Z., Zhao, B., & Chang, Y. Z. (2017). Mitochondrial Ferritin Deletion Exacerbates  $\beta$ -Amyloid-Induced Neurotoxicity in Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1020357.
- Winterbourn, C. C., Peskin, A.V., & Parsons-Mair, H. N., (2002). Thiol oxidase activity of copper, zinc superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 277:1906-1911.
- Wu, W. S., Zhao, Y. S., Shi, Z. H., Chang, S. Y., Nie, G. J., Duan, X. L., Zhao, S. M., Wu, Q., Yang, Z. L., Zhao, B. L., & Chang, Y. Z. (2013). Mitochondrial ferritin attenuates  $\beta$ -amyloid-induced neurotoxicity: reduction in oxidative damage through the Erk/P38 mitogen-activated protein kinase pathways. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18:158-169.
- Xian-hui, D., Wei-juan, G., Tie-mei, S., Hong-lin, X., Jiang-tao, B., Jing-yi, Z., & Xi-qing, C. (2015). Age-related changes of brain iron load changes in the frontal cortex in APPsw/PS1 $\Delta$ E9 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 30:118-123.
- Xu, P. X., Wang, S. W., Yu, X. L., Su, Y. J., Wang, T., Zhou, W. W., Zhang, H., Wang, Y. J. & et al. (2014). Rutin improves spatial memory in Alzheimer's disease transgenic mice by reducing A $\beta$  oligomer level and attenuating oxidative stress and neuroinflammation. *Behav Brain Res*, 264:173-180.
- Yu, R., Topiwala, A., Jacoby, R., & Fazel, S. (2019). Aggressive behaviors in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: systematic review and meta-analysis. *Am J Geriatr Psychiatry*, 27(3):290-300
- Zhang, Y. H., Wang, D. W., Xu, S. F., Zhang, S., Fan, Y. G., Yang, Y. Y., Guo, S. Q., Wang, S., Guo, T., Wang, Z. Y., & Guo, C. (2018).  $\alpha$ -Lipoic acid improves abnormal behavior by mitigation of oxidative stress, inflammation, ferroptosis, and tauopathy in P301S Tau transgenic mice. *Redox Biol*, 14:535-548.

