

트레드밀 지구성 운동과 PDE5 억제제가 알츠하이머질환 동물 모델의 병리학적 특징과 인지기능에 미치는 영향

The effect of treadmill endurance exercise and PDE5 inhibitor on pathologic features and cognitive function in the mouse model of Alzheimer's disease

정지행(한국체육대학교 박사과정) · 조준용(한국체육대학교 교수)*

Jee-Haeng Jeong *Korea National sport Univ* · Joon-Yong Cho* *Korea National sport Univ*

요약

본 연구는 aluminium chloride(AlCl_3) 투여에 의한 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease: AD) 동물 모델을 대상으로 트레드밀 지구성 운동(treadmill endurance exercise, TEE)과 PDE5 inhibitor 억제제인 실데나필(sildenafil, SIL) 처치가 AD의 병리학적 특징과 그에 따른 인지 및 행동적 장애 기전에 미치는 영향을 확인하는데 있다. 총 60일간 AlCl_3 (40mg/kg)를 처치해 AD 동물 모델을 유도하고 난 후 TEE의 강도를 점진적으로 증가시켜 총 4주간 실시하였으며(10-20m/min, 50 min/day, 5 days/week), 같은 기간 내 SIL 처치는 주 5일간 하루 7mg/kg을 투여하였다. 먼저 AlCl_3 투여로 인해 증가한 아밀로이드 베타 단백질과 세포사멸 인자인 cleaved caspase-3 발현 수준은 TEE와 SIL 처치를 통해 감소한 것으로 나타났다. 또한, AlCl_3 투여는 low density lipoprotein receptor-related protein-1(LRP-1) 단백질을 감소시킨 반면 receptor for advanced glycation end products (RAGE) 단백질을 증가시켰다. 하지만 TEE와 SIL 처치는 감소된 LRP-1 단백질을 증가시켰다. 게다가 AlCl_3 투여는 항산화효소(SOD-1, SOD-2, catalase)들의 활성을 감소시켰지만 TEE와 SIL 처치를 통해 발현 수준이 일부 회복된 것으로 나타났다. 마지막으로 TEE와 SIL 처치는 AD 동물 모델에서 나타나는 인지기능과 nest formation score를 완화 시킨 것으로 나타났다. 따라서 TEE와 SIL 처치는 아밀로이드 베타 단백질 수준을 감소시키고 뇌혈관 기능 완화 및 항산화 효소들의 발현 수준을 증가시켜 결과적으로 인지 및 행동 장애를 개선시킬 수 있는 효율적인 방법이라고 사료된다.

Abstract

The purpose of the study was to evaluate the impact of treadmill endurance exercise(TEE) and/or Sildenafil(SIL) treatment, a PDE5 inhibitor on pathological main hallmarks and cognitive deficits of AlCl_3 -induced Alzheimer's Disease(AD) mice model. To induce AD in an animal model, all mice except the CON group were administrated AlCl_3 (40mg/kg) for 60 days. After last treatment, AlCl_3 -induced AD mice were conducted TEE(10-20m/min, 50 min, 5 days/week) and/or SIL treatment(7mg/kg/day, 5 days/week) for 4 weeks. Increased the level of amyloid- β and cleaved caspase-3 induced by AlCl_3 was decreased following TEE and/or SIL treatment. In addition, low-density lipoprotein receptor-related protein-1(LRP-1) protein was reduced and the receptor for advanced glycation end products (RAGE) was increased induced by AlCl_3 treatment. However, only LRP-1 protein was elevated following TEE and/or SIL treatment. Moreover, reduced antioxidant enzymes such as superoxide dismutase-1(SOD-1), superoxide dismutase-2(SOD-2), and catalase were increased by TEE and/or SIL treatment. Finally, cognitive function and Nest formation score were significantly reduced following AlCl_3 treatment, but it was improved following TEE and/or SIL treatment. Collectively, our data suggested that TEE and/or SIL treatment may regulate amyloid- β expression, cerebrovascular function, and antioxidant enzymes, thereby ameliorating AlCl_3 -induced cognitive deficits in AD mice.

Key words : amyloid- β , apoptosis, sildenafil, blood-brain barrier integrity, antioxidant enzyme

I. 서론

알츠하이머 질환(Alzheimer's disease, AD)은 치매의 70% 이상을 차지하는 대표적인 신경퇴행성질환으로 점진적인 인지기능 감소와 행동적인 장애가 나타나는 특징을 보이지만 아직까지 정확한 분자적 원인과 기전은 알려져 있지 않다. 하지만 그동안의 선행연구를 바탕으로 베타 아밀로이드(β -amyloid: $A\beta$) 단백질의 축적과 타우 단백질의 과인산화로 인한 신경섬유원 농축(neurofibrillary tangle)이 독성을 일으키는 것으로 보고되었다(selkoe and Hardy, 2016; Greenberg et al., 2020). 이중 $A\beta$ 단백질은 가장 많은 연구가 진행되고 있는 독성 단백질로 세포내 다양한 인슐린 저항성(insulin resistance), 소포체 스트레스(endoplasmic reticulum-stress), 미토콘드리아 기능이상(mitochondrial dysfunction), 염증(inflammation) 및 오토파지 기능이상(impaired autophagy)을 유도하여 결과적으로 신경세포의 사멸을 유도하는 것으로 보고되었다(Mullins et al., 2017; Liu et al., 2017; Ardura-Fabregat et al., 2017; Mossmann et al., 2014). 따라서 세포에 축적되는 $A\beta$ 단백질을 감소시키거나 억제시키는 것이 AD를 완화 시킬 수 있는 효과적인 방법이라고 제시되고 있다.

최근 AD에서 뇌혈관 장애와 신경세포 사멸과의 연관성이 보고되고 있는 가운데 그 중심에 $A\beta$ 단백질의 축적이 관련되어 있다고 제시되었다(Dorr et al., 2012; Lai et al., 2015). 흥미롭게도 de la Torre와 Mussivand, (1993)는 $A\beta$ 단백질의 축적이 신경세포 사멸을 초래하기 이전에 먼저 뇌혈관의 기능장애가 나타나 생성된 $A\beta$ 단백질을 효율적으로 제거하지 못해 뇌에 축적된다는 가설을 처음으로 제시하였다. 이후 많은 선행연구에서 뇌혈관의 기능 저하가 $A\beta$ 단백질의 축적과 관련이 있다는 결과를 보고하였으며 결국 뇌 혈관기능을 개선시키는 것이 AD를 치료할 수 있는 또 하나의 효과적인 방법이라고 제시하고 있다(Zlokovic, 2011; Rius-Pérez et al., 2015; Sagare et al., 2013; Nielsen et al., 2017).

뇌혈관의 기능장애 중 뇌-혈관 장벽(Blood-brain barrier : BBB) 기능 이상은 주위에 존재하는 pericyte 세포의 기능 감소로 BBB의 투과성이 증가되어 뇌 속에 생성된 $A\beta$ 단백질을 제거하는 능력을 떨어뜨린다고 보고하였다(Sagare et al., 2013; Zhu et al., 2018). 주목할 점은 최신의 신경이미징 기술을 활용한 연구에서도 경도인지 장애(mild cognitive impairment: MCI) 혹은 AD 초기 BBB 기능 저하가 나타난다는 것이다(Montagne et al., 2015; van de Haar et al., 2016; van de Haar et al., 2017). 뇌에서 생성된 $A\beta$ 단백질의 70-85%는 BBB에 존재하는 수용체인 LRP-1(Low density lipoprotein receptor-related protein1) 단백질과 결합하여 뇌에서 혈액으로 이동되어 제거된다(Deane et al., 2004; Tarasoff-Conway et al., 2015; Zhao et al., 2015). 반면 혈액 속의 $A\beta$ 단백질은 RAGE(Receptor for advanced glycation end products) 수용체 단백질과 결합하여 혈액에서 뇌 속으로의 유입될 수 있으며 이는 결국 산화적 스트레스를 유도하여 신경세포의 사멸을 초래한다(Zlokovic, 2008; Deane et al., 2012). 따라서 $A\beta$ 단백질을 효과적으로 제거하기 위해서는 LRP-1 단백질의 활성을 증가시키는 반면 RAGE 단백질의 활성을

억제시켜 BBB의 기능을 회복시키는 것이 중요하다고 생각된다.

운동은 신경세포의 생성과 성장에 필요한 요인들을 증가시킬 뿐만 아니라 선택적으로 뇌의 혈류량을 증가와 함께 혈관생성에 긍정적인 영향을 미친다고 알려져 있다(Pereira et al., 2007; Huang et al., 2013). 운동에 의한 AD의 BBB 기전을 살펴보면 지구성 운동은 기억력과 신경재생을 증가시키고 $A\beta$ 단백질을 뇌 안에서 혈액으로 유출시켜 제거하는 필수적인 단백질인 LRP-1을 증가시키지만 혈액에서 뇌 안으로 $A\beta$ 단백질 유입하는 RAGE 단백질에는 아무런 영향을 미치지 않는다고 보고되었다(Lin et al., 2015). 반면 Lin et al. (2018)의 연구에서는 AD 생쥐를 대상으로 지구성 운동이 기억력의 향상을 증가시켰지만 LRP-1과 RAGE 단백질 발현을 오히려 감소시킨다고 보고하였다. 따라서 운동에 의한 BBB의 기능과 그에 따른 $A\beta$ 단백질의 유입 혹은 유출로 인한 감소 기전을 확인할 수 있는 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

치매 예방을 위한 많은 약물 가운데 최근 PDE5 (Phosphodiesterase Type-5) 억제제인 실데나필(Sildenafil, SIL) 섭취는 혈관 생성 증가, 염증 감소 및 인지기능 완화에 효과적인 것으로 보고되었다(Ibrahim et al., 2021; Yazdani et al., 2021; Fang et al., 2021). 특히 Puzzo et al. (2014)과 Orejana et al. (2012)은 노화 쥐를 대상으로 실데나필을 처치한 결과 신경세포의 생성이 증가된 반면 신경세포의 사멸이 억제되어 $A\beta$ 단백질의 생성을 감소시켰다고 보고하였다. 따라서 운동과 실데나필의 투여는 $A\beta$ 단백질 생성경로와 뇌혈관 기능에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 기대할 수 있지만 아직까지 이와 관련된 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 $AlCl_3$ 투여에 의한 AD 동물 모델을 대상으로 트레드밀 지구성 운동과 실데나필의 투여가 AD의 대표적 병리학적 특징인 $A\beta$ 단백질 축적, 세포사멸, 뇌-혈관 기능 및 항산화 효소와 그로 인한 인지기능 개선 효과를 확인하는데 있다.

II. 연구방법

1. 실험동물 및 처치방법

실험동물은 8주령 된 C57BL/6 마우스($n=40$, female)를 대상으로 기간 내 동물실험윤리위원회의 승인을 받은 후 실험동물실(온도: $22\pm1^\circ\text{C}$, 습도: $50\pm5\%$, 주야간 점등과 소등, 12시간)에서 실시하였다. AD 동물 모델 제작을 위해서 60일간 aluminum Chloride($AlCl_3$, Sigma 40mg/kg)를 복강내 투여하였다. 집단 구분은 정상 비교 집단 control (CON, $n=8$), $AlCl_3$ 투여 집단 (ALCL, $n=8$), $AlCl_3$ 투여 및 트레드밀 지구성 운동집단 (ALCL-TEE, $n=8$), $AlCl_3$ 투여 및 실데나필 처치집단 (ALCL-SIL, $n=8$) 및 $AlCl_3$ 투여 및 복합처치 집단 (Combiend, $n=8$)으로 구분하였다.

2. 실데나필 투여 및 트레드밀 지구성 운동 프로토콜

$AlCl_3$ 투여 후 트레드밀 지구성 운동과 실데나필(Sildenafil citrate) 약물을 처치하였다. 먼저 실데나필은 Orejana et al. (2012)의 연구

에서 제시한 용량(7mg/kg/day)을 기준으로 주 5회 총 4주간 복강내 투여하였다. 또한, 트레드밀 지구성 운동을 실시한 집단은 동물실험용 트레드밀 지구성 운동 기기(8-Lanes treadmill, Daemyung scientific Co, Ltd, Korea)를 이용하여 운동을 수행하였다. 먼저 본 운동 전 사전 적응운동(10min, 10m/min, 5일)을 실시하고 난 후 본 운동으로 단계적으로 강도를 높여서 총 4주간(10~20m/min, 50min, 5일/주) 실시하였다.

3. 수중미로검사

인지기능을 분석하기 위해 수중미로검사(water maze test, WMT)를 실시하여 수영 시간(escape latency)과 거리(escape distance)를 컴퓨터 프로그램(SMART-LD)을 이용하여 측정한 뒤 SMART-CS 프로그램(Panlab, Barcelona, Spain)으로 분석하였다. 먼저 WMT는 원형수조(지름×높이, 1.5m×40cm)에 지름이 약 12cm인 목표 표적(target)을 2cm 정도 수면 아래 설치하고 물(22°C~24°C)을 채운 후 우유를 용해시켜 목표 표적이 보이지 않도록 설치하였다. 검사는 총 5일 동안 하루 2회씩 정해진 출발지점에서 시작하여 목표 지점에 도달할 수 있도록 수행하였으며, 만일 2회 모두 목표 표적을 찾지 못한 경우에는 목표 지점으로 유도하여 위치를 인지시켰다. 검사는 최소한 5분 정도의 간격을 두고 실시하였으며 마지막 6일째 실전 검사는 표적을 없앤 후 출발지점에서 시작하여 60초 동안 표적에 도달한 결과를 실험 데이터로 이용하였다.

4. Nest Building behavior test

정사각형 모양의 Nestlet(Nestlets, Cotton Bedding, 5×5cm) 재료를 개별 케이지에 넣어 하루 밤 동안 측정하는 방식으로 진행하였다. 측정 방법을 표준화하기 위해 한 케이지당 정확히 3.0g의 Nestlet을 소등 전 1시간 전 케이지에 배분하였다. 다음날 아침 8시에 모든 실험동물의 둥지 형성 정도에 따른 주관적 평가를 Deacon 등(2006)에서 제시한 근거를 바탕으로 1~5 점수로 부여하여 분석하였다.

5. 조직적출

모든 실험처치가 종료된 후 pentobarbital sodium (50 mg/kg)을 복강 내 투여하여 마취시키고 실험목적에 따라 빠르게 뇌 조직(대뇌피질, 해마)을 적출하였다. 이후 조직을 액화 질소에 동결시켜 -80°C 초저온냉동기(Deep Freezer, SANYO, Janpen)에 분석시까지 보관하였다.

6. Western blotting

집단별로 분리된 뇌 조직을 정량한 후 단백질량이 15~20μg으로 SDS-Polyacrylamide gel(10~15%)에 전기영동 한 후 membrane으로 전이하였다. 이후 5% BSA가 첨가된 TBS-T 용액으로 90분 동안 실온에서 blocking 시키고 1차 항체를 4°C에서 overnight 시켰다. 다음 날 TBS-T 용액으로 10분간 4회 세척하고 난 후 2차 항체를 60분간 상온에서 반응시켰다. 이후 TBS-T 완충 용액으로 10분간 4회 세척 한 후 ECL solution(Millipore, WBLUF0100)에 1분간 membrane을 발색하고 Image J 이미지 분석 프로그램인 사용하여 총 단백질 발현 수준을 산출하였다.

7. 자료처리

본 연구에서 수집된 모든 자료는 SPSS Statistics 24.0 통계 프로그램을 사용하여 각 변인들에 대한 기술통계치인 평균과 표준오차(Mean±SEM)로 산출하였다. 집단과 시기 간에 따른 변인들의 차이를 검증하기 위해 일원변량분석(One-way ANOVA)을 실시하고 그 차이에 대한 사후 검증으로는 Least significant difference(LSD)를 이용하였다. 이때 통계적 유의수준은 $\alpha = .05$ 로 설정하였다.

III. 연구결과

1. 트레드밀 지구성 운동과 실데나필 섭취에 따른 아밀로이드 대사와 세포사멸에 미치는 영향

TEE와 SIL 섭취 후 Aβ 단백질 대사와 세포사멸에 미치는 영향을 확인한 결과 집단 간 통계적으로 유의한 차이가 나타나 사후검증

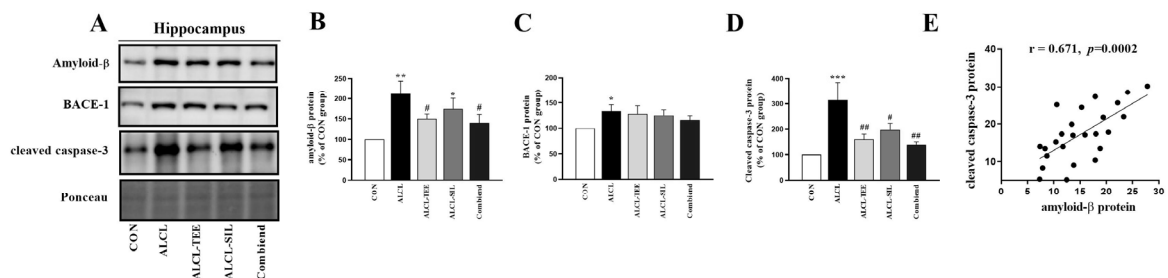


그림 1. The effect of TEE and/or SIL treatment on amyloid-β expression and apoptosis. A-D) Representative blot and densitometry quantification of western bands for amyloid-β, BACE-1, and cleaved caspase-3. E) Correlation between amyloid-β and cleaved caspase-3. All bars shown represent the mean ± SEM. One-way ANOVA followed by LSD post-hoc test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus CON group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, versus ALCL group

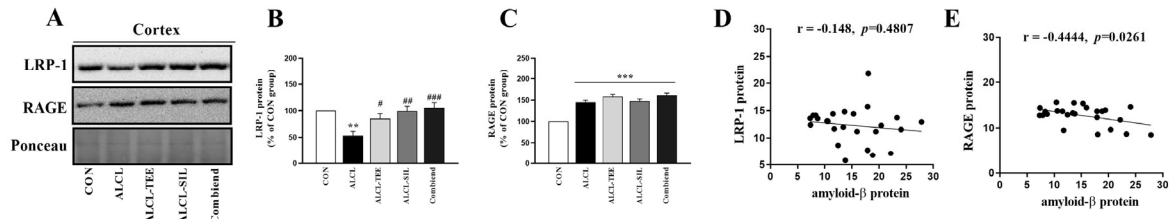


그림 2. The effect of TEE and/or Sil treatment on blood-brain barrier integrity. A, B). Representative blot and densitometry quantification of western bands for LRP-1 and RAGE protein. D) Correlation between amyloid-β and LRP-1. E) Correlation between amyloid-β and RAGE. All bars shown represent the mean \pm SEM. One-way ANOVA followed by LSD post-hoc test: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus CON group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ versus ALCL group

을 실시하였다(그림 1). 먼저 CON 집단과 비교하여 $AlCl_3$ 처리한 ALCL 집단의 해마에서 $A\beta$ 단백질과 beta-site amyloid precursor protein (APP)-cleaving enzyme (BACE-1) 발현 수준은 통계적으로 유의하게 증가되었다(그림 1B, C). 하지만 TEE 혹은 복합 처리는 $AlCl_3$ 에 의해 증가된 $A\beta$ 단백질의 발현을 유의하게 감소시켰다. 한편 BACE-1 단백질 발현 수준은 TEE와 SIL 섭취 후 감소하는 경향으로 나타났지만 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 마지막으로 세포사멸과의 관련성을 확인하기 위해 cleaved caspase-3 단백질 발현을 확인하였다. 예상한 바와 같이 CON 집단과 비교하여 $AlCl_3$ 처리에 의해 $A\beta$ 단백질 수준이 증가된 ALCL 집단에서 통계적으로 유의하게 증가한 것으로 나타났다(그림 1D). 하지만 TEE, SIL 및 복합 처리는 cleaved caspase-3 단백질 수준을 유의하게 감소시킨 것으로 나타났다. $A\beta$ 단백질 수준과 cleaved caspase-3 단백질 수준의 상관도를 분석한 결과 정적 상관관계를 나타냈다(그림 1E, $r=0.671, p=0.002$).

2. 트레드밀 지구성 운동과 실데나필 섭취가 뇌혈관기능에 미치는 영향

TEE와 SIL 섭취 후 뇌혈관 기능에 관련된 단백질(LRP-1, RAGE) 발현 수준은 집단 간에 통계적으로 유의하게 차이가 나타나 사후 검증을 실시하였다(그림 2). 먼저 대뇌피질에서 CON 집단과 비교하여 ALCL 집단의 LRP-1 단백질 수준은 통계적으로 유의하게 감

소한 것으로 나타났고, RAGE 단백질 발현 수준은 CON 집단과 비교하여 모든 집단에서 유의하게 증가한 것으로 나타났다(그림 2B, C). 하지만 감소된 LRP-1 단백질 수준은 TEE, SIL 및 복합 처리에 의해 유의하게 증가하는 것으로 나타났다. 또한, $A\beta$ 단백질 수준과 LRP-1($r=-0.148, p=0.4087$) 및 RAGE($r=-0.4444, p=0.0261$). 단백질 수준의 상관도를 분석한 결과 각각 부적 상관관계를 나타냈다(그림 2D, E).

3. 트레드밀 지구성 운동과 실데나필 섭취가 항산화효소 활성에 미치는 영향

TEE와 SIL 섭취 후 항산화효소인 superoxide dismutase-1(SOD-1), superoxide dismutase-1(SOD-2) 및 catalase 단백질 발현 수준을 분석한 결과 집단 간 통계적으로 유의한 차이가 나타나 사후 검증을 실시하였다(그림 3). 먼저 ALCL 집단의 SOD-1, SOD-2 및 catalase 단백질 발현은 CON 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 감소된 것으로 나타났다(그림 3B-D). 하지만 TEE, SIL 및 복합 처리에 의해 감소된 SOD-1, SOD-2 및 catalase 단백질 발현이 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 나타났다.

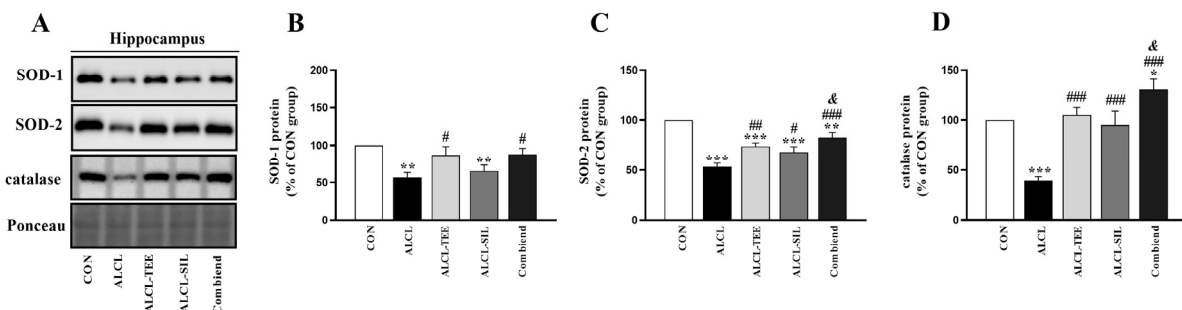


그림 3. The effect of TEE and/or Sil treatment on the level of antioxidant enzyme. A-D). Representative blot and densitometry quantification of western bands for SOD-1, SOD-2, and catalase protein. All bars shown represent the mean \pm SEM. One-way ANOVA followed by LSD post-hoc test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus CON group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ versus ALCL group; & $p < 0.05$ versus ALCL-SIL group.

4. 트레드밀 지구성 운동과 실데나필 섭취가 인지기능과 Nest building test에 미치는 영향

TEE와 SIL 섭취 섭취에 따른 인지기능을 확인하기 위해 수중미로 검사를 실시하였다(그림 4). 먼저 $AlCl_3$ 약물을 투여한 ALCL 집단 은 CON 집단과 비교하여 수행 거리 및 시간이 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 나타났다(그림 4A, B). 이는 $AlCl_3$ 투여에 의한 인지기능 감소가 유도된 것으로 생각된다. 하지만 TEE, SIL 및 복합 처치는 $AlCl_3$ 투여로 인한 거리와 시간의 증가를 일부 감소시켰다. TEE와 SIL 섭취에 따른 nest building test를 분석한 결과 집단 간에 통계적으로 유의한 차이가 나타나 사후 검증을 실시하였다(그림 5). 먼저 ALCL 집단은 CON 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 nest formation score가 감소한 것으로 나타났다(그림 4C). 하지만 TEE, SIL 및 복합 처치는 감소된 nest formation score를 통계적으로 유의하게 증가시킨 것으로 나타났다.

IV. 논의

아밀로이드 베타(Amyloid- β , A β) 단백질의 축적은 AD의 대표적인 병리학적 특징으로 뇌 속에 과도하게 축적된 형태로 발견되는 노인성 반점(senile plaque)의 주요 성분이다. A β 의 생성 기전을 살펴보면 정상적인 상태에서는 아밀로이드 전구 단백질(amyloid precursor protein: APP)이 α -secretase와 γ -secretase에 의해 차례대로 분절되어 A β 단백질이 생성되지 않는 비 아밀로이드 생성 경로(non-amyloidogenic pathway)를 거치게 되지만 APP 단백질이

β -secretase와 γ -secretase에 의해 차례대로 분절되면 A β 단백질 생성이 증가된다(Bertram & Tanzi, 2005). 이렇게 세포에 축적된 A β 단백질은 다양한 스트레스 상황을 초래하여 결과적으로 신경세포의 사멸을 유도하여 인지기능을 감소시킨다(Mullins et al., 2017; Liu et al., 2017). 따라서 지금까지도 세포에 축적된 A β 단백질을 감소시키거나 혹은 생성을 억제시키는 것을 목적으로 많은 연구가 진행되고 있다.

$AlCl_3$ 약물 처치는 AD에서 나타나는 병리학적 특징인 인지기능 저하와 A β 단백질의 축적을 유발하는 것으로 보고되었다(Abdulkadir et al., 2021; Mohamed et al., 2022).

본 연구에서도 $AlCl_3$ 약물을 투여한 집단에서 A β 단백질과 BACE-1 단백질 발현이 CON 집단과 비교하여 유의하게 증가된 것을 확인하였다(그림 1). 따라서 $AlCl_3$ 투여에 의한 AD 동물 모델은 본 연구에서 확인하고자 하는 요인들을 검증하는데 적합하다고 생각된다. 앞서 제시한 것처럼 A β 단백질 축적은 미토콘드리아 기능(mitochondrial function), 염증반응(inflammation), 오토파지(autophagy)와 같은 세포 내 중요한 기전들의 활성을 억제하여 결과적으로 신경세포의 사멸을 초래한다. 이와 유사하게 본 연구에서도 $AlCl_3$ 처치한 ALCL집단이 CON 집단과 비교하여 cleaved caspase-3 단백질 발현이 유의하게 증가하였다(그림 1D). 이는 $AlCl_3$ 의한 A β 단백질 축적이 세포사멸을 초래한 것으로 해석될 수 있으며 A β 단백질과 cleaved caspase-3 단백질 발현량에 대한 상관도를 분석한 결과에서도 정적 상관관계($r=0.671$, $p=0.002$)로 나타나 본 연구의 가설을 뒷받침할 수 있다. 한편 TEE, SIL 처치 및 복합처치는 $AlCl_3$ 의한 A β 단백질 수준을 유의하게 감소시킨 것

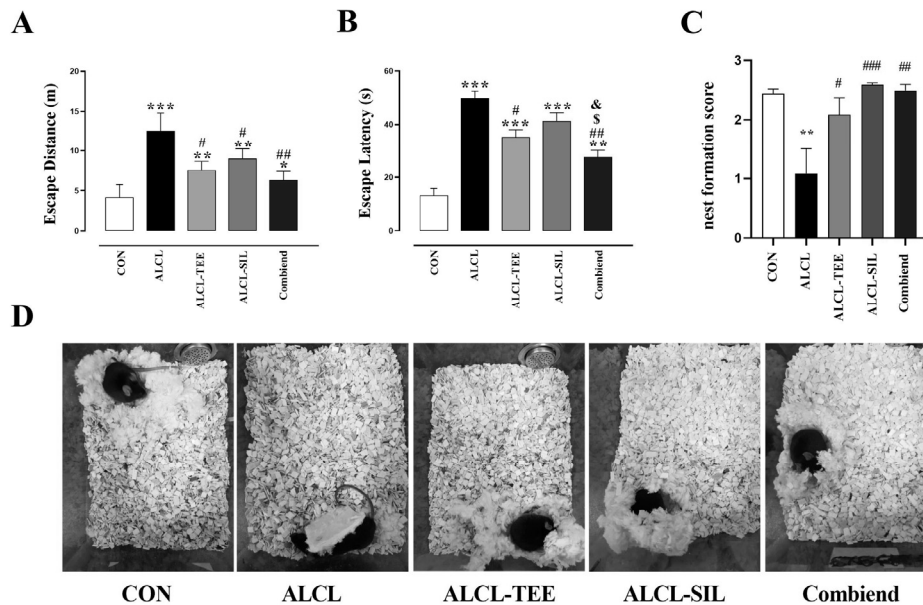


그림 4. The effect of TEE and/or Sil treatment on cognitive deficits and nest formation score. A, B) Escape latency and escape latency of probe test, C) nest formation score. D) Representative nests constructed. All bars shown represent the mean \pm SEM. One-way ANOVA followed by LSD post-hoc test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus CON group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ versus ALCL group; \$ $p < 0.05$ versus ALCL-TEE group; & $p < 0.05$ versus ALCL-SIL group.

으로 나타나 TEE 혹은 SIL 처치에 의해 A β 단백질 감소를 보고한 선행연구와 일치하는 결과를 나타냈다. 하지만 예상과 달리 A β 생성에 관여하는 효소인 BACE-1 단백질 발현은 운동 혹은

SIL 처치에 의해 감소하는 경향이 나타났지만 유의한 차이는 나타나지 않았다. 따라서 TEE 혹은 SIL 처치에 의한 A β 단백질 감소는 A β 단백질의 생성을 억제하는 것인지 아니면 생성된 A β 단백질을 제거하는 기전에 영향을 미치는지 추후 연구를 통해 확인할 필요가 있다고 생각된다.

TEE 혹은 SIL 처치에 의한 A β 단백질 감소가 어떠한 기전으로 진행되는지 확인하기 위해 뇌-혈관장벽(Blood-brain barrier : BBB)에 관련된 단백질의 발현 수준을 확인하였다. 앞서 제시한 것처럼 뇌에서 생성된 A β 단백질은 LRP-1 단백질에 의해 제거되는 반면 RAGE 수용체 단백질과는 결합되어 다시 뇌 속으로 유입되어 산화적 스트레스를 유발한다(Tarasoff-Conway et al., 2015; Deane, 2012). 본 연구에서도 A β 단백질의 증가가 나타난 ALCL 집단이 CON 집단과 비교하여 LRP-1 수준은 감소된 것으로 나타났고 RAGE 수준은 증가된 것으로 나타났다(그림 2). 이는 뇌 속에 생성된 A β 단백질을 제거하는 능력이 감소 되었다고 추측된다. 하지만 TEE 혹은 SIL 처치는 감소된 LRP-1 단백질 수준을 유의하게 증가시킨 것으로 나타났지만 RAGE 단백질 수준에는 유의한 차이가 나타나지 않았다. 이는 선행연구에서 보고한 결과들과 일부 일치하는 결과를 나타냈다. 한편, 본 연구에서도 A β 단백질과 위 두 단백질 간에 상관도를 분석한 결과 LRP-1 단백질은 유의한 차이가 나타나지 않은($r=-0.148$, $p=0.4807$) 반면 RAGE는 부적 상관관계가 나타났다($r=-0.4444$, $p=0.0261$). 따라서 AD에서 TEE 혹은 SIL 처치에 대한 BBB의 기능과 그에 따른 A β 단백질의 유입 혹은 유출로 인한 감소 기전은 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

AD에서 산화적 스트레스와 A β 단백질 증가는 매우 밀접하게 관련되어 있다(Caruso et al., 2019; Zhang et al, 2020). 본 연구에서도 A β 단백질 수준이 증가된 ALCL 그룹에서 SOD-1, SOD-2 및 catalase 단백질 수준이 유의하게 감소한 것으로 나타났다. 이는 A β 단백질 축적에 의해 항산화 효소의 활성이 감소되고 결과적으로 산화적 스트레스가 증가되었다는 것을 의미한다. 대부분의 선행연구에서 운동은 항산화효소의 활성을 증가시키는 것으로 보고되었다(Nogueira et al., 2018). 또한, SIL 섭취도 활성산소를 제거할 수 있는 항산화 효소들의 활성을 증가시킬 수 있다고 보고되었다(Maziero Alves et al., 2020; Ibrahim et al., 2021). 이와 유사하게 본 연구에서도 TEE, SIL 및 복합처치는 SOD-1, SOD-2 및 catalase 단백질 수준을 유의하게 증가시킨 것으로 나타나 산화적 스트레스가 일부 완화된 것으로 판단된다.

A β 단백질 축적은 노인성 반점과 함께 인지기능 저하와 매우 밀접하게 관련이 있다. 본 연구에서도 A β 단백질 축적이 나타난 ALCL 집단이 CON 집단과 비교하여 인지기능이 저하된 것으로 나타나(그림 4) 선행연구에서 제시한 연구결과와 일치하는 경향을 나타냈다. 또한, 기억력을 담당하는 해마(hippocampus)에 의해 조절되는 nest building test는 AD 상황에서 해마의 위축으로 등지 형성

의 결손이 나타날 수 있다고 보고되었다(Deacon et al., 2006). 흥미롭게도 본 연구에서도 ALCL 그룹에서 등지형성 점수가 CON 집단과 비교하여 유의하게 감소된 것으로 나타나 해마의 신경변화 혹은 손상이 진행된 것으로 판단된다. 하지만 저하된 인지기능과 감소된 nest formation score는 TEE, SIL 및 복합 처치를 통해 일부 회복된 것으로 나타났고, 특히 TEE와 함께 SIL 약물을 투여한 집단은 단일 처치한 집단보다 통계적으로 유의하게 수행시간을 감소시킨 것으로 나타났다.

따라서 연구의 결과를 종합해 보면 TEE, SIL 및 복합 처치는 BBB 기능 개선과 항산화효소 활성을 유도하여 결과적으로 A β 축적에 의한 A β 단백질 축적을 감소시키고 인지기능 및 행동기능 장애를 관리할 수 있는 효율적인 방법이라고 생각된다.

V. 결론 및 제언

본 연구는 A β 단백질 축적에 의한 AD 동물 모델을 대상으로 4 주간의 TEE, SIL 및 복합처치에 의한 A β 단백질 수준, 뇌-혈관기능, 항산화효소의 활성 및 인지기능을 확인하여 다음과 같은 결론을 도출하였다. TEE, SIL 및 복합처치는 A β 단백질과 cleaved caspase-3 단백질 발현을 감소시켰다. 또한, TEE, SIL 및 복합처치는 뇌-혈관기능에 관련된 LRP-1 단백질 수준을 증가시킨 것으로 나타났다. 게다가 항산화효소 단백질인 SOD-1, SOD-2 및 catalase 단백질 수준도 TEE, SIL 및 복합처치에 의해 증가된 것으로 나타났다. 마지막으로 A β 축적에 의한 인지기능과 행동기능 장애가 TEE, SIL 및 복합처치에 의해 일부 회복되는 것으로 나타났다. 따라서 4주간의 비침습적인 TEE, SIL 및 복합처치는 AD의 병리학적 특징들을 조절할 수 있는 효과적인 방법이라고 생각된다.

참고문헌

- Abdulkadir, T. S., Dawud, F. A., Isa, A. S., Ayo, J. O. (2021). Taurine and Camel Milk Modulate Neurobehavioral and Biochemical Changes in Aluminum Chloride-Induced Alzheimer's Disease in Rats. *J Alzheimers Dis*, 84(1):291-302.
- Ardura-Fabregat, A., Boddeke, E., Boza-Serrano, A., Brioschi, S., Castro-Gomez, S., Ceyzeriat, K., et al. (2017). Targeting Neuroinflammation to Treat Alzheimer's Disease. *CNS drugs*, 31(12), 1057-1082. <https://doi.org/10.1007/s40263-017-0483-3>
- Bertram, L., & Tanzi, R. E. (2005). The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *The Journal of clinical investigation*, 115(6), 1449-1457.
- Caruso, G., Spampinato, S. F., Cardaci, V., Caraci, F., Sortino, M. A., Merlo, S., et al. (2019). β -amyloid and Oxidative Stress: Perspectives in Drug Development. *Curr Pharm Des*,

- 25(45):4771-4781.
- Deacon, R. M., (2006). Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction. *Nat Protoc*, 1(1):118-21.
- Deane R. J. (2012). Is RAGE still a therapeutic target for Alzheimer's disease?. *Future medicinal chemistry*, 4(7), 915-925.
- Deane, R., Wu, Z., Sagare, A., Davis, J., Du Yan, S., Hamm, K., et al.. (2004). LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms. *Neuron*. 43(3):333-44.
- de la Torre, J. C., & Mussivand, T. (1993). Can disturbed brain microcirculation cause Alzheimer's disease?. *Neurological research*, 15(3), 146-153.
- Fang, J., Zhang, P., Zhou, Y., Chiang, C. W., Tan, J., Hou, Y., et al. (2021). Endophenotype-based in silico network medicine discovery combined with insurance record data mining identifies sildenafil as a candidate drug for Alzheimer's disease. *Nat Aging*, 1(12):1175-1188.
- Greenberg, S. M., Bacskaï, B. J., Hernandez-Guillamon, M., Pruzin, J., Sperling, R., van Veluw, S. J., et al. (2020). Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease - one peptide, two pathways. *Nat Rev Neurol*, 16(1):30-42.
- Huang, T., Larsen, K. T., Ried-Larsen, M., Møller, N. C., Andersen, L. B. (2014). The effects of physical activity and exercise on brain-derived neurotrophic factor in healthy humans: A review. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 24(1).
- Ibrahim, M. A., Haleem, M., AbdelWahab, S. A., Abdel-Aziz, A. M. (2021). Sildenafil ameliorates Alzheimer disease via the modulation of vascular endothelial growth factor and vascular cell adhesion molecule-1 in rats. *Hum Exp Toxicol*, 40(4):596-607.
- Lai, A. Y., Dorr, A., Thomason, L. A., Koletar, M. M., Sled, J. G., Stefanovic, B., et al. (2015). Venular degeneration leads to vascular dysfunction in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Brain*. 138(Pt 4):1046-58.
- Lin, T. W., Shih, Y. H., Chen, S. J., Lien, C. H., Chang, C. Y., Huang, T. Y., et al. (2015). Running exercise delays neurodegeneration in amygdala and hippocampus of Alzheimer's disease (APP/PS1) transgenic mice. *Neurobiology of learning and memory*, 118, 189-197.
- Lin, T. W., Tsai, S. F., & Kuo, Y. M. (2018). Physical Exercise Enhances Neuroplasticity and Delays Alzheimer's Disease. *Brain plasticity (Amsterdam, Netherlands)*, 4(1), 95-110.
- Liu, X. J., Wei, J., Shang, Y. H., Huang, H. C., Lao, F. X. (2017). Modulation of A β PP and GSK3 β by Endoplasmic Reticulum Stress and Involvement in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 57(4):1157-1170.
- Maziero Alves, G., Aires, R., de Souza Santos, V., Zambom Côco, L., Peters, B., de Leone Evangelista Monteiro Assis, A., et al. (2021). Sildenafil attenuates nonsteroidal anti-inflammatory-induced gastric ulceration in mice via antioxidant and antigenotoxic mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 48(3):401-411.
- Mohamed, E. A., Ahmed, H. I., Zaky, H. S., Badr, A. M. (2022). Boswellic acids ameliorate neurodegeneration induced by AIC3: the implication of Wnt/ β -catenin pathway. *Environ Sci Pollut Res Int*.
- Montagne, A., Barnes, S. R., Sweeney, M. D., Halliday, M. R., Sagare, A. P., Zhao, Z., et al. (2015). Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron*. 85(2):296-302.
- Mossmann, D., Vögtle, F. N., Taskin, A. A., Teixeira, P. F., Ring, J., Burkhart, J. M., et al. (2014). Amyloid- β peptide induces mitochondrial dysfunction by inhibition of preprotein maturation. *Cell Metab*. 20(4):662-9.
- Mullins, R. J., Diehl, T. C., Chia, C. W., Kapogiannis, D. (2017). Insulin Resistance as a Link between Amyloid-Beta and Tau Pathologies in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*. 9:118.
- Nogueira, J. E., Passaglia, P., Mota, C. M. D., Santos, B. M., Batalhão, M. E., Carnio, E. C., et al. (2018). Molecular hydrogen reduces acute exercise-induced inflammatory and oxidative stress status. *Free Radic Biol Med*, 129:186-193.
- Orejana, L., Barros-Miñones, L., Jordán, J., Puerta, E., Aguirre, N. (2012). Sildenafil ameliorates cognitive deficits and tau pathology in a senescence-accelerated mouse model. *Neurobiology of aging*, 33(3), 625.e11-625.e6.25E20.
- Pereira, M. I., Gomes, P. S., Bhamhani, Y. N. (2007). A brief review of the use of near infrared spectroscopy with particular interest in resistance exercise. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 37(7).
- Puzzo, D., Loreto, C., Giunta, S., Musumeci, G., Frasca, G., Podda, M. V., et al. (2014). Effect of phosphodiesterase-5 inhibition on apoptosis and beta amyloid load in aged mice. *Neurobiology of aging*, 35(3), 520-531.
- Rius-Pérez, S., Tormos, A. M., Pérez, S., Taléns-Visconti, R. (2015). Vascular pathology: Cause or effect in Alzheimer disease?.

-
- Neurologia. S0213-4853(15)00185-1.
- Sagare, A. P., Bell, R. D., Zhao, Z., Ma, Q., Winkler, E. A., Ramanathan, A., et al. (2013). Pericyte loss influences Alzheimer-like neurodegeneration in mice. *Nat Commun.* 4:2932.
- Selkoe, D. J., Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO molecular medicine*, 8(6), 595-608.
- Tarasoff-Conway, J. M., Carare, R. O., Osorio, R. S., Glodzik, L., Butler, T., Fieremans, E., et al. (2015). Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 11(8):457-70.
- van de Haar, H. J., Burgmans, S., Jansen, J. F., van Osch, M. J., van Buchem, M. A., Muller, M., et al. (2016). Blood-Brain Barrier Leakage in Patients with Early Alzheimer Disease. *Radiology*, 281(2),
- van de Haar, H. J., Jansen, J., Jeukens, C., Burgmans, S., van Buchem, M. A., Muller, M., et al. (2017). Subtle blood-brain barrier leakage rate and spatial extent: Considerations for dynamic contrast-enhanced MRI. *Medical physics*, 44(8), 4112-4125.
- Yazdani, A., Howidi, B., Shi, M. Z., Tugarinov, N., Khoja, Z., Wintermark, P. (2021). Sildenafil improves hippocampal brain injuries and restores neuronal development after neonatal hypoxia-ischemia in male rat pups. *Sci Rep*, 11;11(1):22046.
- Zhang, S., Duangjan, C., Tencomnao, T., Liu, J., Lin, J., Wink, M., et al. (2020). Neuroprotective effects of oolong tea extracts against glutamate-induced toxicity in cultured neuronal cells and β -amyloid-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Food Funct*, 23;11(9):8179-8192.
- Zhao Y, Gong CX. (2015). From chronic cerebral hypoperfusion to Alzheimer-like brain pathology and neurodegeneration. *Cell Mol Neurobiol.* 2015 Jan;35(1):101-10.
- Zhu D, Su Y, Fu B, Xu H. (2018). Magnesium Reduces Blood-Brain Barrier Permeability and Regulates Amyloid- β Transcytosis. *Mol Neurobiol.* 2018 Jan 30.
- Zlokovic, B. V. (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci.* 12(12):723-38.