

유해환경요인 노출에 의해 유도된 퇴행적 신경변화에 대한 운동과 미토콘드리아 표적 항산화제 MitoQ의 신경보호 효과 : 알츠하이머성 치매질환을 중심으로

Neuroprotective effect of exercise and mitochondria-targeted antioxidant MitoQ against environmental toxicant linked to the neurodegenerative disorder : Implication for Alzheimer's disease

엄현섭(건양대학교 교수) · 황동주* (한국체육대학교 박사후연구원)

Hyun-Seob Um *Konyang Univ* · Dong-Joo Hwang *Korea National Sport Univ*

요약

본 연구는 유해환경요인 노출에 의해 산발적으로 유도되는 알츠하이머 질환 동물모델을 대상으로 운동과 미토콘드리아 표적 항산화제 MitoQ의 신경보호효과를 규명해보고자 한다. C57BL/6 마우스를 대상으로 알츠하이머 질환을 유도하기 위해 90일 간 Aluminum chloride (40mg/kg)를 투여하였으며, 집단은 Control 집단 (Con, n=10), AlCl₃ 집단 (AlCl₃ : 10마리), AlCl₃-Exercise 집단 (AlCl₃-EX : 10마리), AlCl₃-MitoQ 집단 (AlCl₃-MitoQ : 10마리), AlCl₃-Exercise-MitoQ 집단 (AlCl₃-Combined : 10마리)으로 구분하였다. 트레드밀 운동은 6주간 저강도(0°, 12m/min, 40min, 5days/week)로 실시하였으며, MitoQ 섭취는 250 μmol를 유효농도로 설정하여 6주간 음수로 처치하였다. AlCl₃ 처치에 의해 증가한 알츠하이머 질환 주요 병리지표 [Amyloid beta (Aβ or Abeta)], phosphorylated Tau (p-tau(s202)) 및 세포사멸 (Apoptosis) 관련인자의 발현수준이 MitoQ 및 운동과 MitoQ 복합처치에 의해 감소되어 인지기능 향상에 기여하는 것으로 확인하였다. 결론적으로, 유해환경요인 노출에 의해 유도되는 뇌 신경계 퇴행적 변화과정에서 산화적 불균형을 완화시키는 미토콘드리아 표적 항산화제의 섭취가 알츠하이머 질환의 치료 전략이 될 수 있을 것으로 판단된다.

Abstract

The purpose of this study was to investigate the neuroprotective effect of exercise and mitochondria-targeted antioxidant MitoQ in AlCl₃-induced Alzheimer's disease mice. Following the administration of the neurotoxic chemical, Aluminum chloride, at a dose of 40mg/kg for 90 days, C57BL/6 mice were given access to treadmill exercise (40-min sessions, five times/week for 6 weeks) and treatment with MitoQ supplementation (at a concentration of 250 umol for 6 weeks), and the experimental groups were divided into a Control group (Con, n=10), AlCl₃ group (AlCl₃: n=10), AlCl₃-Exercise group (AlCl₃-EX: n=10), AlCl₃-MitoQ group (AlCl₃-MitoQ: n=10), AlCl₃-Exercise-MitoQ group (AlCl₃-Combined: n=10). The results showed that the increased expression of pathological hallmarks [Amyloid beta (Aβ or Abeta), phosphorylated Tau, and apoptosis-related factor (Bcl-2)] were decreased by MitoQ and combined treatment of exercise and MitoQ, which is accompanied by restoration of cognitive impairment. Taken together, these findings demonstrated that MitoQ supplementation intake could be a therapeutic strategy to alleviate an oxidative imbalance induced by exposure to harmful environmental factors for AD.

Key words : Alzheimer's disease, Aluminum, Exercise, MitoQ, Antioxidant

* dongzoo87@gmail.com

* 이 논문은 2019년 대한민국 교육부와 한국연구재단의 인문사회분야 신진연구지원사업의 지원을 받아 수행된 연구임(NRF-2019S1A5A8038832)

I. 서론

최근, 대기오염으로 인한 미세먼지(PM·Particulate Matter) 노출과 같은 유해환경요인이 건강에 미치는 치명적인 영향에 대한 국내외적인 관심이 높아지고 있다. 특히, 저명 학술지에 “THE POLLUTED BRAIN”이라는 제목으로 게재된 한편의 논의는 최근 제기되고 있는 유해환경요인 노출에 따른 퇴행성 신경질환의 유병률 증가에 대한 위험성을 고취시킨다(Underwood, 2017).

치매환자의 약 60~70%를 차지하는 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease)은 90% 이상이 노화와 함께 원인을 알 수 없는 산발적(Sporadic) 형태로 나타나며, 초기에는 점진적인 기억력의 감소가 진행되고 병이 진행함에 따라 일상생활의 기능을 상실하여 결국 사망에 이르게 하는 임상적 특징을 나타낸다(Lista et al., 2015; Masters et al., 2015). 선행연구에 의하면 아밀로이드 베타(Amyloid- β : A β)로 구성된 노인성 반점(Senile plaque)과 Tau 단백질의 과인산화에 의한 신경섬유원 농축(Neurofibrillary tangle; NFTs)은 독성을 일으켜 뇌 신경계의 비가역적인(Irreversible) 신경세포 소실을 유발하는 알츠하이머 질환의 주요 병변으로 인식되고 있지만 아직 명확한 원인은 밝혀지지 않은 실정이다(Harrington, 2012; Demetrius & Driver, 2013). 하지만, 알츠하이머 질환을 이해하려는 관련분야 전문가들의 다양한 시도는 뇌 신경계에서 나타나는 대사적 결함(Metabolic dysfunction), 염증 및 산화 스트레스(Inflammation & Oxidative stress)의 증가와 같은 특징적인 병변들이 알츠하이머 질환의 발병에 기여하는 근본적인 원인이 될 수 있다고 제안하였다(Daulatzai, 2010; Lista et al., 2015).

미세먼지, 직업적인 작업환경 및 일상생활에서 접하기 쉬운 금속이온 중의 하나인 알루미늄(Aluminum)에 대한 지속적인 노출과 알츠하이머 질환을 포함한 퇴행성 뇌질환의 높은 관련성은 오랜 기간 동안 연구자들에 의해 논의되어 왔으며, 최근 알루미늄 노출과 인지기능 감소에 대한 과학적 근거가 지속적으로 보고되었다(Tomljenovic, 2011). 흥미롭게도, 다수의 선행연구에 따르면 지속적인 알루미늄에 대한 노출은 대뇌피질(Cortex)과 해마(Hippocampus) 부위를 포함한 뇌 전반에서 알츠하이머 질환의 주요 병변으로 대표되는 A β 단백질의 축적과 Tau 단백질의 과인산화를 촉진시키는 대사과정에 관여하여 신경독성을 유발하는 것으로 나타났다(Castorina et al., 2010; Kandimalla et al., 2016). 게다가, 알루미늄 노출은 분자생물학적 수준에서 산화적 불균형의 원인이 되는 반응성 산소 종(Reactive oxygen species: ROS)의 증가를 중심으로 에너지대사 결함, 미토콘드리아 기능이상, 염증반응과 같은 뇌 신경계 항상성 조절 시스템에 장애를 유발한다는 다양한 학술적 결과들이 보고되었다(Abulfadl et al., 2018). 즉, 미세먼지와 같이 일상생활에서 높은 수준의 유해환경에 노출되어 발생할 수 있는 퇴행성 뇌질환에 대한 연구적 관점에서 알루미늄 노출을 통해 산발적으로 유도되는 알츠하이머 질환 모델은 앞서 언급한 뇌 신경계의 다양한 병리기전과 A β 단백질의 축적 및 응집과정의 상호 관련성에 대한 규명과 함께 궁극적으로 인지기능 손상에 기여하는 알츠하이머 질환 초기 치료전략에 대한 탐색을 가능하게 할 것으로 추론된다.

한편, 운동과학 분야에서는 신체활동(Physical exercise)을 알츠하이머 질환의 예방 및 치료적 접근을 위한 효과적인 대안으로 제안하였다. 심폐순환계(Cardiovascular system)의 자극을 통해 뇌와 근육에 영향을 미치는 유산소성 운동(Aerobic exercise)은 신경퇴행성 질환의 치료적 접근을 위한 효과적인 운동형태로 알려져 있으며, 관련기관에 따르면 치매환자의 경우 자각적 운동강도(Rating of perceive exertion: RPE) 10~15수준의 규칙적 운동을 수행하는 것이 권장되기도 한다(Moore et al., 2016; Cai et al., 2017). 하지만, 일부 선행연구들이 정상상태에서 항상성 조절을 통해 신체의 산화적 균형을 유지시키는 운동이 병적상태에서 증가된 대사적 활성에 의해 오히려 과도한 활성산소의 증가를 초래할 수 있다고 보고함에 따라(Day, 2014; Bouzid et al., 2015), 이를 중재하는 전략으로서 항산화 제제(Antioxidant supplementation) 섭취의 효과 규명을 제안하였다(Albarracin et al., 2012).

최근, 세포 내 활성산소의 주요 생성기관인 미토콘드리아를 표적하여 작용하는 항산화 제제 MitoQ는 다양한 질병에 대한 치료적 적용 가능성으로 인해 많은 관심을 받고 있다. MitoQ는 미토콘드리아의 산화적 인산화 과정의 중요한 기질로서 이용되는 유비퀴논(Ubiquinone)에 지용성(Lipophilic) 작용기인 Triphenylphosphonium(TPP) 양이온을 결합시킨 물질로서 수용성과 미토콘드리아 막에 대한 투과성을 높여 내막(Mitochondria inner membrane)에 고농도로 축적되어 항산화 기능을 발휘한다(Tauskela, 2007; Tiwari & Chaturvedi, 2014). 게다가, MitoQ 처치는 후성유전학적(Epigenetic) 변화를 발생시킬 가능성이 낮아 장기간 섭취에 의해 보상적으로 나타날 수 있는 내인성(Endogenous) 항산화 효소의 감소를 배제시킬 수 있다는 측면에서 신경퇴행성 질환에 대한 긍정적 효과의 기대 가능성이 높다(Murphy & Smith, 2007). 하지만, 아직까지 유해환경요인에 의해 산발적으로 발생하는 뇌 신경계 퇴행적 변화의 개선에 기여하는 운동과 MitoQ의 신경보호효과에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

따라서, 본 연구는 Aluminum chloride 노출에 의해 산발적으로 유도되는 알츠하이머성 치매 질환 동물모델을 대상으로 운동과 미토콘드리아 표적 항산화제 MitoQ의 신경보호에 따른 인지기능 개선효과를 알아보는데 있다.

II. 연구방법

1. 실험동물

본 연구는 K대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 얻어 실험을 진행하였다. 실험동물은 C57BL/6 마우스(n=50)를 대상으로 K대학교 동물사육실 온도 22±2℃, 습도 50±5%, 명암주기 12시간)에서 식이량과 물은 자유 공급하여 사육하였다. 실험집단은 Control (Con: n=10), AlCl₃-Control (AlCl₃: n=10), AlCl₃-Exercise (AlCl₃-Ex: n=10), AlCl₃-MitoQ supplementation (AlCl₃-MitoQ: n=10), AlCl₃-Exercise-MitoQ (AlCl₃-Combined: 10마리)으로 구분하였다.

2. 알츠하이머성 질환 동물모델 유도

Aluminum chloride($AlCl_3$)는 신경독성물질로서 장기간 노출에 의해 뇌를 포함한 인체 전반에 축적되어 알츠하이머성 치매질환의 특성을 유발하는 것으로 보고됨(Julka et al., 1996). $AlCl_3$ 의 처치는 Saba et al. (2017)의 연구를 참고하여 90일 간 40mg/kg의 농도로 생리식염수에 희석된 용액을 복강주사(Intraperitoneal injection: IP)하여 적용하였다.

3. 운동방법

$AlCl_3$ -EX 집단과 $AlCl_3$ -Combined 집단을 대상으로 실험동물용 트레드밀(8-Lanes treadmill, Daemyung scientific Co, Ltd, Korea)을 이용하여 7일간의 사전적응 훈련(경사도 0°, 10m/min, 8min)을 실시하였다. 본 운동은 실험동물대상이 질병 모델인 점을 감안하여 Okamoto et al. (2015)와 Koo et al. (2017)이 제시한 운동 프로토콜을 근거로 연구대상에 적용 가능하도록 수정하여 약 6주간 저강도(0°, 10m/min, 40min, 5days/week)의 트레드밀 운동을 실시하였다. 동시에, 운동을 실시하지 않는 통제집단의 경우 환경변화에 따른 변수를 배제하기 위해 운동수행 집단과 동일한 시간동안 고정된 트레드밀 위에 머무르도록 하였다.

4. MitoQ

MitoQ는 『MRC Mitochondria Biology Unit, Cambridge, UK』의 프로그램 리더인 Dr. Mike Murphy와 Antipodean Pharmaceuticals, Inc.』를 통해 제공받았으며, $AlCl_3$ -MitoQ 집단과 $AlCl_3$ -Combined 집단의 MitoQ 섭취방법 및 농도설정은 관련 선행연구를 참고하여 수정·보완하였다. MitoQ는 100 μ mol 농도를 유효농도로 설정하여 6주간 음수로 제공하였다.

5. 인지 기능 검사

1) 수중 미로 검사

수중미로검사는 원형수조(지름 1.5m×높이 40cm)에 지름 12cm인 표적(target)을 수면에서 1cm 정도 잠기도록 원형수조바닥에 위치시킨 후 물(20~22°C)에 탈지분유를 용해시켜 표적을 보이지 않도록 설치하였다. 검사시작 후 5일 동안 정해진 출발지점에서 시작하여 표적에 도달할 수 있도록 각 2회씩 훈련시키고 2회 모두 표적을 찾지 못한 생쥐는 표적으로 유도하여 위치를 인지시켰다. 마지막 6일째 표적을 없앤 후 출발지점에서 시작하여 표적에 도달한 결과를 SMART-CS 프로그램(Panlab, Barcelona, Spain)을 이용하여 분석하였고, 주요 검사변인은 실험동물의 수영거리(escape distance), 시간(escape latency) 및 수영패턴(swimming pattern)으로 설정하였다.

2) 수동회피검사

인지기능 검사를 위해 운동 종료 3일전에 수동회피반응 검사(passive avoidance test)를 실시하였다. 이 장치는 밝은 공간과 어두운 공간으로 구성되어 있으며 어두운 공간의 바닥에는 전기자극을 가할 수 있는 스테인레스 철판이 설치되어 있다. 사전검사(acquisition trial)에서 집단 별 실험동물을 밝은 공간에 60초간 머무르게 한 다음 밝은 공간과 어두운 공간을 구분하는 문을 열어 흰쥐가 어두운 공간에 들어갈 때까지의 시간(initial latency time)을 기록하였다. 흰쥐가 어두운 공간에 들어간 상태에서 전기충격(75V, 0.5mA, 50Hz)을 2초간 가한 후 72시간 뒤 사전검사와 동일한 방식으로 실험을 진행하여 밝은 공간에서 어두운 공간으로 들어가는 시간을 측정하였다.

6. 혈액 및 조직추출

실험처치가 끝난 실험동물을 CO_2 챔버에서 약 2분간 호흡시켜 마취시킨 뒤 개복하여 실험목적에 따라 혈액과 뇌 조직을 추출하였다. 추출된 혈액은 원심분리기를 이용하여 혈청 및 혈장을 분리하였으며, 뇌 조직에서 분리된 해마(Hippocampus)는 미토콘드리아 분석용을 제외하고 액체질소에 급속 냉동시켜 분석 시까지 -80°C의 냉동기에 보관하였다.

7. 분광분석법

혈중 지질과산화물(Lipid Peroxidation, MDA) 수준의 측정은 상업적으로 판매되고 있는 분석 키트(MDA, Sigma aldrich, MAK085)를 이용하여 분광학적 방법을 통해 분석하였다. 간략하게 설명하면 농도가 다른 표준용액을 통해 표준 곡선을 작성하고, 전 처리 과정을 거친 샘플의 불필요한 효소반응을 억제한 뒤 전용 Buffer와 반응시켜 MDA는 532nm 파장의 흡광도를 microplate reader (HIDEX, Finland) 장비를 통해 측정하였다.

8. Western Blot

적출된 조직을 균질화(Homogenization) 시킨 뒤 원심분리하여 얻은 상층액을 처리하여 샘플을 준비하였다. 준비된 샘플은 분자량에 따라 10%와 12%의 SDS-PAGE에 동량을 분주하여 80 volt에서 전기영동 하고, 1시간 30분 동안 단백질을 MeOH에 적신 PVDF membrane으로 전사시킬 것임. 상온에서 60분 동안 Blocking 한 membrane은 4°C에서 1차 항체에 반응시킨 후 상온에서 2시간 동안 2차 항체와 반응시킨 뒤 Luminata Forte Western HRP Substrate(Millipore, USA)에 2분간 발색시켜 얻어진 membrane을 이미지 분석 시스템(Molecular Imager ChemiDoc XRS System, Bio-Rad, USA)을 이용하여 분석하였다.

9. 자료처리

본 연구에서 얻어진 모든 자료는 GraphPad Prism v8 (GraphPad Software Inc., LaJolla, CA, USA)을 이용하여 기술 통계지 (mean±SEM)를 산출하였다. 각 검사변인에 대한 집단 간 차이를 분석을 위해 일원변량분석(One way ANOVA)을 실시하고, 집단 간 유의한 차이가 있을 경우 Bonferroni post hoc 방법을 이용하여 사후 검증을 실시하였다. 이때 통계적 유의수준은 $\alpha=0.05$ 로 설정하였다.

III. 연구결과

1. $AlCl_3$ 처치에 따른 실험동물의 체중변화 양상

$AlCl_3$ 처치에 따른 실험동물의 체중변화 양상을 분석하였다 (Fig.1). 그 결과, 유해환경요인의 하나인 $AlCl_3$ 를 투여받은 모든 그룹의 실험동물 체중이 Con 집단과 비교하여 감소하는 경향을 나타냈으며, 특히 MitoQ를 섭취한 $AlCl_3$ -MitoQ와 $AlCl_3$ -Combined 집단의 경우 $AlCl_3$ 와 $AlCl_3$ -EX 집단과 비교하여 $AlCl_3$ 처치 후반으로 갈수록 체중감소 현상이 더 두드러지게 나타났다.

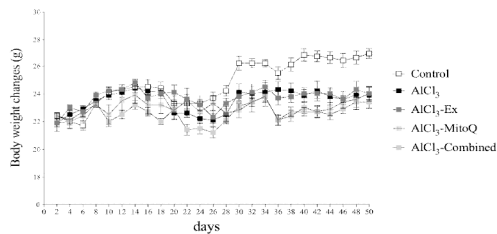


Fig 1. Body weight changes and cognitive function in $AlCl_3$ -induced mouse model of Alzheimer's disease.

2. 운동과 미토콘드리아 표적 항산화제 MitoQ 섭취에 따른 실험동물의 인지기능 개선효과

$AlCl_3$ 처치에 따른 신경 퇴행적 변화양상과 운동 및 MitoQ 트레드밀 운동에 의해 유도되는 신경보호효과를 검증하기 위해 인지 기능 수준을 판단하는 수중미로검사(WMT)와 수동회피검사(PAT)를 실시하였다(Fig.2). 그 결과, 수중미로검사의 경우 실험동물의 Hidden platform zone에 머문시간(Time spent)을 나타내는 지표에서 MitoQ를 섭취한 $AlCl_3$ -MitoQ와 $AlCl_3$ -Combined 집단이 $AlCl_3$ 집단과 비교하여 유의하게 증가한 것을 확인하였다($AlCl_3$ -MitoQ: $p<0.05$; $AlCl_3$ -Combined: $p<0.05$, Fig. 2). 수중미로검사의 마지막 날 테스트에 측정된 Hidden platform crossing 횟수도 통계적으로 유의하진 않지만 같은 경향의 결과를 나타내는 것을 확인하였다. 수동회피검사 결과의 경우 수중미로검사 결과와 유사하게 $AlCl_3$ -MitoQ 집단의 감정적 인지 기능 수준이 $AlCl_3$ 집단과 비교하여 유의하게 회복된 것이 확인된 반면($AlCl_3$ -MitoQ: $p<0.001$, Fig. 2), $AlCl_3$ -Ex와 $AlCl_3$ -Combined 집단은 유의한 개선효과를 나타내지 않았다.

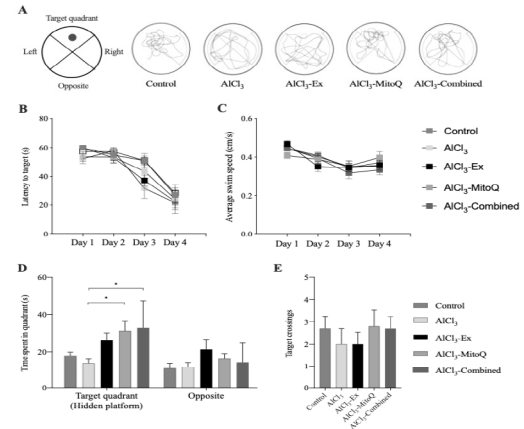


Fig 2. Neuroprotective effect of exercise, MitoQ and combined administration on cognitive function in $AlCl_3$ -induced mouse model of Alzheimer's disease. (A) Representative swimming path of each group in probe test. (B) Escape latency to hidden platform and (C) average swim speed in each training trial. (D) Time spent in each quadrant during probe test. (E) Number of target crossings in the probe test. Data are presented as mean \pm SEM, $n = 10$ /group. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

3. 운동과 미토콘드리아 표적 항산화제 MitoQ 섭취에 따른 알츠하이머 질환의 주요 병리지표의 변화

$AlCl_3$ 처치에 따른 알츠하이머 질환의 주요 병리지표 발현양상과 운동 및 MitoQ 처치에 의해 유도되는 개선효과를 단백질 수준에서 검증하였다 (Fig. 3). 그 결과, 알츠하이머 질환의 주요 병리지표인 아밀로이드 베타[Amyloid beta ($A\beta$ or Abeta)]의 발현수준이 Con 집단과 비교하여 $AlCl_3$ 와 $AlCl_3$ -Ex 집단에서 통계적으로 유의하게 증가한 것을 확인하였으며($AlCl_3$: $p<0.05$; $AlCl_3$ -Ex: $p<0.01$, Fig. 3), $AlCl_3$ -MitoQ와 $AlCl_3$ -Combined 집단의 경우 $AlCl_3$ 와 비교하여 $A\beta$ 발현수준이 감소경향을 나타내는 것을 확인하였다 (Fig. 3). Tau 단백질의 인산화 수준을 확인해본 결과 $A\beta$ 발현수준과 유사하게 Con 집단과 비교하여 $AlCl_3$ 집단에서 phospho-tau(s202)의 발현수준이 높은 것을 확인하였으며($AlCl_3$: $p<0.001$), $AlCl_3$ -MitoQ와 $AlCl_3$ -Combined 집단의 경우 $AlCl_3$ 집단과 비교하여 Tau 단백질의 인산화 수준이 감소경향을 나타내는 것을 확인하였다 ($AlCl_3$ -MitoQ: $p<0.01$; $AlCl_3$ -Combined: $p<0.001$, Fig. 3).

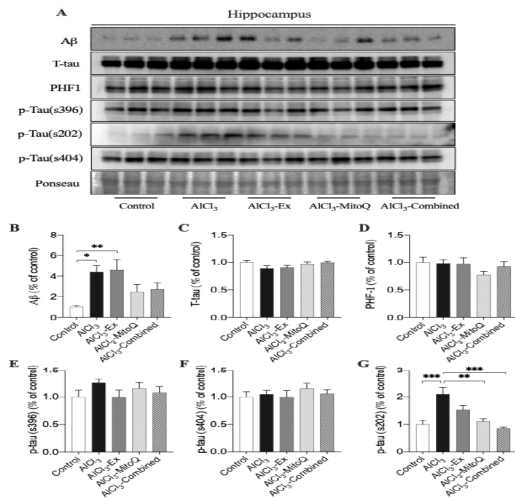


Fig 3. A) Representative images of western blot for A β , T-tau, PHF1, p-Tau(s396), p-tau(s202), and p-tau(s404) in the hippocampus. B-G) Densitometry quantification of the A β , T-tau, PHF1, p-Tau(s396), p-tau(s202), and p-tau(s404) in the hippocampus. Ponceau S was probed as a loading control. Data are presented as mean \pm SEM, n=6/group. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

4. 운동과 미토콘드리아 표적 항산화제 MitoQ 섭취에 따른 신경 세포사멸 조절인자의 변화

뇌 신경계에서 발생하는 신경세포사멸(Apoptosis)의 수준을 확인한 결과, Pro-apoptotic 지표인 Bcl-2 단백질의 경우 유의한 차이가 나타나지 않은 반면, Anti-apoptotic 지표인 Bax의 경우 Con 집단과 비교하여 AICl₃ 집단에서 유의하게 증가한 발현수준이 MitoQ 섭취에 의해 유의하게 감소하는 것을 나타냈다(p < 0.01, Fig. 4).

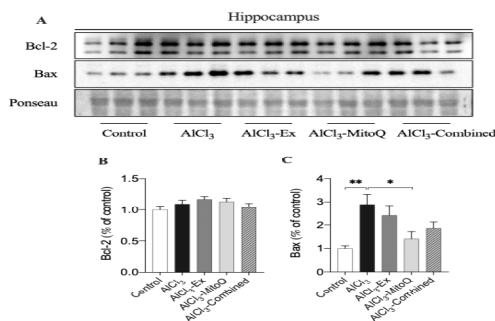


Fig 4. A) Representative images of western blot for Bax and Bcl-2 in the hippocampus. B-C) Densitometry quantification of the Bax and Bcl-2 in the hippocampus. Ponceau S was probed as a loading control. Data are presented as mean \pm SEM, n=6/group. * p < 0.05; ** p < 0.01.

5. 운동과 미토콘드리아 표적 항산화제 MitoQ 섭취에 따른 산화 스트레스 및 항산화 효소 발현변화

AICl₃ 처치에 따른 뇌 조직 내 산화스트레스 수준 및 항산화 효

소 발현양상과 운동 및 MitoQ 처치에 의해 유도되는 개선효과를 검증하였다(Fig. 5). 그 결과, 산화 스트레스 수준을 나타내는 간접적인 지표인 지질과산화물(MDA)의 수준이 Con 집단과 비교하여 AICl₃ 집단에서 유의하게 증가하였으며(AICl₃: p < 0.001, Fig. 5), 운동, MitoQ, 그리고 복합처치 실시에 의해 유의하게 감소하는 것을 확인하였다 (AICl₃-Ex: p < 0.01; AICl₃-MitoQ: p < 0.01; AICl₃-Combined: p < 0.001, Fig. 5). 또한, 4-HNE의 발현수준도 통계적으로 유의하진 않지만 AICl₃ 집단에서 증가하는 경향을 나타냈으며, 반대로 AICl₃-Ex, AICl₃-MitoQ, 그리고 AICl₃-Combined 집단에서 감소하는 경향을 확인할 수 있었다. 게다가, 세포 내 항상성 조절의 일환으로 산화적 균형유지에 관여하는 항산화 효소 단백질 Catalase, Mn-SOD, 그리고 Cu/Zn-SOD 발현수준을 확인한 결과, Control 집단과 비교하여 AICl₃-Combined 집단에서 SOD1 발현수준이 유의하게 높은 것을 제외하고 특이적인 변화를 확인할 수 없었다(Fig. 5).

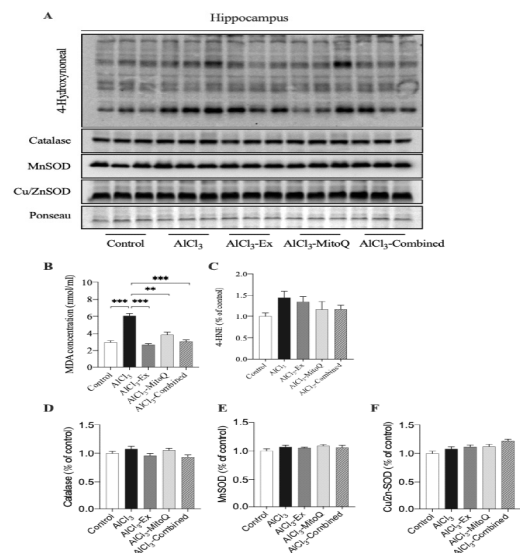


Fig 5. A) Representative images of western blot for 4-Hydroxynoneal, Catalase, MnSOD, and Cu/ZnSOD in the hippocampus. B-F) Densitometry quantification of the 4-Hydroxynoneal, Catalase, MnSOD, and Cu/ZnSOD in the hippocampus. Ponceau S was probed as a loading control. Data are presented as mean \pm SEM, n=6/group. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

6. 운동과 미토콘드리아 표적 항산화제 MitoQ 섭취에 따른 뇌 조직 내 미토콘드리아 생합성과 융합 및 분열조절 관련인자의 발현변화

운동, MitoQ 및 복합처치에 따른 뇌 조직 내 미토콘드리아 생합성(Mitochondrial biogenesis)과 융합(Fusion) 및 분열(Fission)조절 관련인자의 발현변화를 검증하였다(Fig. 6). 그 결과, 미토콘드리아 생합성관련인자인 PGC1- α 와 Tfam의 발현수준은 집단 간 차이를 나타내지 않았다. 하지만, PGC1- α 의 short isoform인 NT-PGC1- α 의 발현수준이 AICl₃ 집단과 비교하여 AICl₃-Combined 집단에서 통계적으로 유의한 차이를 나타냈으며(AICl₃-Combined: p < 0.01, Fig. 6), 운동과 MitoQ를 섭취한 집단의 경우 상대적으로 증가하는 경향을

나타냈다. 또한, 미토콘드리아 융합 및 분열 관련인자의 발현수준을 분석한 결과, AlCl_3 -Ex 집단과 비교하여 AlCl_3 -Combined 집단에서 통계적으로 유의하게 감소한 Mitofusin-1(MFN1)을 제외하고 (AlCl_3 -Combined: $p < 0.01$, Fig 6), Mitofusin-2(MFN2)와 Dynamin-related Protein-1(DRP1)은 유의한 차이를 나타내지 않았다. 추가적으로 미토콘드리아 산화적 인산화(Oxidative phosphorylation, OXPHOS) 복합체 구성 요인들의 발현수준을 확인한 결과 OXPHOS I to V complex 의 유의한 차이는 나타나지 않았다(Fig. 6).

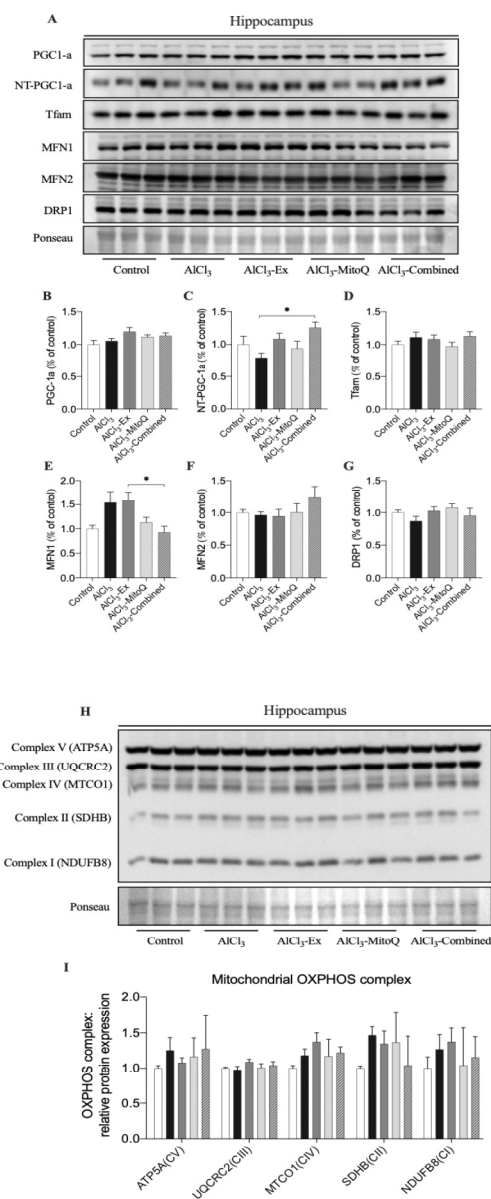


Fig 6. A) Representative images of western blot for PGC1- α , NT-PGC1- α , Tfam, MFN1, MFN2, and DRP1 in the hippocampus. B-G) Densitometry quantification of the PGC1- α , NT-PGC1- α , Tfam, MFN1, MFN2, and DRP1 in the hippocampus. H) Representative images of western blot for mitochondrial OXPHOS complex proteins in the hippocampus. I) Densitometry quantification of the mitochondrial OXPHOS I-V complex in the hippocampus. Ponceau S was probed as a loading control. Data are presented as mean \pm SEM, n=6/group. * $p < 0.05$.

IV. 논의

최근, 미세먼지와 같은 유해환경요인에 대한 노출이 뇌 신경계 위험인자로 작용하여 인지기능 감소를 동반한 치매질환의 발병률을 높일 수 있다는 연구결과들이 보고되고 있는 가운데, 병리학적 맥락에서 이에 대한 근본적인 원인규명과 예방 및 치료적 대안에 대한 연구는 부진한 상황이다. 이러한 관점에서, 본 연구는 미세먼지, 직업적인 작업환경 및 일상생활에서 접하기 쉬운 금속 이온 중의 하나인 알루미늄에 대한 지속적인 노출에 의해 유도된 알츠하이머성 치매 질환 동물모델에서 운동과 미토콘드리아 표적 항산화제 MitoQ의 신경보호효과를 규명하고자 하였다.

알츠하이머 질환의 명확한 원인은 밝혀지지 않았지만 노화의 진행과 관련이 깊은 항산화 기능이 질병의 진전에 중요한 역할을 한다는 것은 잘 알려져 있다(Kudryavtseva et al., 2016). 다수의 선행연구들은 알루미늄(AlCl_3) 노출이 알츠하이머성 치매질환의 주요 병변으로 대표되는 A β 단백질의 축적과 Tau 단백질의 과인산화를 촉진시키는 대사과정에 관여하여 신경독성을 유발하여 결국 인지기능 결함을 유발하는 것으로 보고하였다(Mold et al., 2020; Mold et al., 2021). 본 연구에서 수중미로검사를 통해 인지기능 수준을 분석한 결과, 유의하진 않지만 AlCl_3 에 노출된 실험동물의 인지기능 수준이 Con집단과 비교하여 상대적으로 낮은 것으로 확인되었다. 이는 AlCl_3 노출에 의해 해마(Hippocampus)부위에서 유의하게 증가된 A β 단백질, Tau 과인산화[p-tau(s202)], Pro-apoptotic 조절인자 Bax 단백질 수준에 의해 설명될 수 있으며, 결국 유해환경요인에 의해 산발적으로 나타날 수 있는 알츠하이머성 치매질환의 유발 가능성을 실험적으로 증명한 선행연구들과 일치한다(Kandimalla et al., 2016; Igboke et al., 2019). 반면, MitoQ 단일처치와 운동과 MitoQ 복합처치는 A β 단백질과 Tau 과인산화 수준의 감소시켰으며, 인지기능 수준을 개선시키는 것으로 확인되었다. 같은 맥락에서 운동이 기대수준의 신경보호효과를 유도하지 못한 점은 신경 퇴행적 변화가 진행되는 과정 중 과도한 운동유발 대사적 활성화에 의한 산화적 불균형에서 기인하는 것으로 추론할 수 있다.

기존의 선행연구들은 항산화 제제의 섭취가 산화적 불균형에 의해 유발된 뇌 신경계의 퇴행적 변화를 완화시킬 수 있는 전략임을 제안하였다, 하지만, 실질적으로 산소의 단계적 환원(연소과정)에서 부산물로서 다량의 활성산소를 생성하는 기관인 미토콘드리아에 직접적으로 작용하지 못하며, 수용성 제제의 경우 대부분 뇨(Urine)로 배출되어 효율성이 떨어지기 때문에 더 효과적인 항산화제제의 역할 규명과 도입이 요구되고 있다(Albarracin et al., 2012). 세포 내 산화 방어체제로서 존재하는 항산화 효소에 의해 조절되지 못할 정도로 과도하게 증가한 활성산소는 산화적 불균형을 초래하여, 결국 세포 내 소기관과 생체분자들을 산화시켜 세포의 사멸을 촉진시킨다(Kahi et al., 2004). 이를 근거로, 실험동물의 과산화물 생성과 항산화 효소의 발현수준을 분석한 결과, AlCl_3 노출에 의해 해마부위에서 유의하게 증가한 4-HNE의 발현수준이 운동과 MitoQ, 그리고 복합처치에 의해 감소하는 경향을 나타냈으며, 지질 과산화물 MDA 생성의 경우 유의하진 않지만 일부 개선효과가

MitoQ, 그리고 복합치치 집단에서 나타났다. 하지만, 대표적인 세포 내 항산화 효소인 Catalase, MnSOD, 그리고 Cu/ZnSOD의 발현 수준은 모든 집단에서 큰 변화가 나타나지 않은 점을 고려할 때, AlCl₃ 노출에 의한 산화 스트레스 증가 그리고 치료 중재전략들에 의한 개선효과는 내인성(Endogenous) 항산화 효소의 구조, 기능적 변화와는 무관한 것으로 판단된다. 이러한 결과는 산화적 불균형의 개선을 통해 알츠하이머성 치매질환의 뇌 신경계 퇴행적 변화를 완화시키는 대안으로서 운동과 MitoQ의 역할을 제안한 선행연구의 결과와 일치한다(Jeong et al., 2021). 하지만, 산화 스트레스 증가 및 감소를 조절하는 유력한 기전으로 알려진 내인성 항산화 효소의 조절에는 변화가 없는 점은 본 연구의 제한점으로서 추후 후속연구를 통해 면밀히 검증해야 할 과제로 남아있다.

주요 에너지 생성 기관이자 활성산소의 생성기관으로서 세포 내 환경변화에 맞춰 역동적인 형태변화를 일으키는 미토콘드리아는 생합성(Mitochondrial biogenesis)과 융합(Fusion) 및 분열(Fission)의 역동적인 과정을 통해 구조적, 기능적 안정성을 유지한다(Yoo & Jung, 2018). 이러한 관점에서 세포 내 환경변화에 의해 발생하는 미토콘드리아 생합성과 융합 및 분열조절 능력의 결함은 변성된(denatured) 미토콘드리아의 발생확률을 높여 뇌 신경계의 퇴행적 변화의 원인이 되는 에너지 생성능력의 감소, 산화 스트레스의 증가를 유도할 수 있다. 이에 따라, 미토콘드리아 생합성 인자(PGC-1 α)와 융합(MFN1 and MFN2) 및 분열(DRPF1) 조절관련 단백질의 발현수준을 분석한 결과, 전사 활성화 및 핵 수용체 결합 도메인을 보유하는 기능적 전사 보조 활성화의 역할을 하는 PGC1- α 의 short isoform인 NT-PGC1- α 의 발현수준이 AlCl₃ 노출에 의해 감소하였지만, 운동과 MitoQ 복합치치에 의해 통제집단 수준으로 회복되는 것으로 나타났다. 게다가, AlCl₃ 노출에 의해 증가된 미토콘드리아 융합을 조절하는 MFN1 단백질의 발현수준이 오직 MitoQ 섭취집단과 운동과 MitoQ 복합치치 집단에서 감소하는 경향을 나타냈다. 이 결과는 아직 원인은 명확하지 않지만, 세포 내 에너지 생성을 유지하기 위해 미토콘드리아 풀(Pool)을 유지하는 과정에서 융합 및 생합성을 통해 생성되는 변성된 미토콘드리아의 과도한 생성이 결국 세포사멸 기전으로 작용했을 가능성을 뒷받침하며, 이를 완화시키는 효과는 주로 미토콘드리아 표적 항산화제 MitoQ에 의존적으로 발생하는 것으로 판단된다. 정리하자면, 결국 유해환경요인으로 작용하는 AlCl₃은 미토콘드리아를 포함한 세포 내 생체분자들을 산화시키는 산화적 불균형을 초래하여 신경세포의 사멸을 유도할 수 있다. 이때, 신경퇴행성 질환에 대한 치료적 전략으로서 기대효과가 높은 운동은 병적상태에서 과도한 대사적 활성화에 따른 산화 스트레스 증가 이외에 유익한 효과를 나타내지 못하지만, 미토콘드리아 표적 항산화제 MitoQ 섭취의 경우 운동의 약점을 보완하는 효과적인 대안이 될 수 있다고 생각된다.

따라서, 본 연구는 유해환경요인에 대한 노출이 뇌 신경계의 퇴행적 변화를 유발함으로써 알츠하이머성 치매질환 환자에게서 나타나는 인지기능 결함을 일으킬 수 있음을 증명하였다. 이에 더하여, 세포 내 산화적 불균형을 완화시키는 미토콘드리아 표적 항산

화제 MitoQ의 섭취가 비침습적 신경퇴행성 질환 치료전략인 신체 활동의 긍정적 기대효과를 모방하는 대안이 될 수 있음을 제안한다.

V. 결론 및 제언

본 연구는 유해환경요인(AlCl₃) 노출에 의해 산발적으로 유도되는 알츠하이머성 치매질환 동물모델을 대상으로 운동과 미토콘드리아 표적 항산화제 MitoQ의 신경보호효과와 그에 따른 인지기능 개선효과를 알아보는데 있다. 그 결과, AlCl₃ 노출은 알츠하이머성 치매질환의 주요 병리적 지표(A β and Tau phosphorylation)와 산화적 불균형에서 기인하는 신경세포의 사멸을 증가시키는 것으로 나타났다. 이에 대하여, 미토콘드리아 표적 항산화제 MitoQ는 변성된 미토콘드리아의 과도한 생성을 제한하는 기전을 통해 산화적 불균형 및 세포사멸을 완화시켜 궁극적으로 인지기능 개선에 기여하는 것으로 나타났다. 종합해보면, 이 결과는 알츠하이머성 치매질환의 예방과 치료를 위한 합리적 중재요인의 선택 및 프로그램 개발에 대한 단서를 제공할 수 있을 것으로 예상되며, 무엇보다도 운동과 식이섭취를 통한 건강관리의 중요성을 환기시킬 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

- Abulfadl, Y. S., El-Maraghy, N. N., Ahmed, A., Nofal, S., & Badary, O. A. (2018). Protective effects of thymoquinone on D-galactose and aluminum chloride induced neurotoxicity in rats: biochemical, histological and behavioral changes. *Neurological research*, 40(4), 324-333.
- Albarracin, S. L., Stab, B., Casas, Z., Sutachan, J. J., Samudio, I., Gonzalez, J., Gonzalo, L., Capani, F., Morales, L., & Barreto, G. E. (2012). Effects of natural antioxidants in neurodegenerative disease. *Nutritional neuroscience*, 15(1), 1-9.
- Bouزيد, M. A., Filaire, E., McCall, A., & Fabre, C. (2015). Radical Oxygen Species, Exercise and Aging: An Update. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 45(9), 1245-1261.
- Cai, H., Li, G., Hua, S., Liu, Y., & Chen, L. (2017). Effect of exercise on cognitive function in chronic disease patients: a meta-analysis and systematic review of randomized controlled trials. *Clinical interventions in aging*, 12, 773-783.
- Castorina, A., Tiralongo, A., Giunta, S., Carnazza, M. L., Scapagnini, G., & D'Agata, V. (2010). Early effects of aluminum chloride on beta-secretase mRNA expression in a neuronal model of beta-amyloid toxicity. *Cell biology and toxicology*, 26(4), 367-377.

- Daulatzai M. A. (2010). Early stages of pathogenesis in memory impairment during normal senescence and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 20(2), 355-367.
- Day B. J. (2014). Antioxidant therapeutics: Pandora's box. *Free radical biology & medicine*, 66, 58-64.
- Demetrius, L. A., & Driver, J. (2013). Alzheimer's as a metabolic disease. *Biogerontology*, 14(6), 641-649.
- Harrington C. R. (2012). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuroimaging clinics of North America*, 22(1), 11-vii.
- Igbokwe, I. O., Igwenagu, E., & Igbokwe, N. A. (2019). Aluminium toxicosis: a review of toxic actions and effects. *Interdisciplinary toxicology*, 12(2), 45-70.
- Jeong, J. H., Koo, J. H., Yook, J. S., Cho, J. Y., & Kang, E. B. (2021). Neuroprotective Benefits of Exercise and MitoQ on Memory Function, Mitochondrial Dynamics, Oxidative Stress, and Neuroinflammation in D-Galactose-Induced Aging Rats. *Brain sciences*, 11(2), 164.
- Kahl, R., Kampkötter, A., Wätjen, W., & Chovolou, Y. (2004). Antioxidant enzymes and apoptosis. *Drug metabolism reviews*, 36(3-4), 747-762.
- Kandimalla, R. J., S. P., Bk, B., Wani, W. Y., Sharma, D. R., Grover, V. K., Bhardwaj, N., Jain, K., & Gill, K. D. (2011). Cerebrospinal fluid profile of amyloid β 42 (A β 42), hTau and ubiquitin in North Indian Alzheimer's disease patients. *Neuroscience letters*, 487(2), 134-138.
- Kandimalla, R., Vallamkondu, J., Corgiat, E. B., & Gill, K. D. (2016). Understanding Aspects of Aluminum Exposure in Alzheimer's Disease Development. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 26(2), 139-154.
- Kudryavtseva, A. V., Krasnov, G. S., Dmitriev, A. A., Alekseev, B. Y., Kardymon, O. L., Sadritdinova, A. F., Fedorova, M. S., Pokrovsky, A. V., Melnikova, N. V., Kaprin, A. D., Moskalev, A. A., & Snezhkina, A. V. (2016). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget*, 7(29), 44879-44905.
- 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. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 47(2), 291-317.
- Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., & Cummings, J. L. (2015). Alzheimer's disease. *Nature reviews. Disease primers*, 1, 15056.
- Murphy, D. D., Rueter, S. M., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2000). Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(9), 3214-3220.
- Mold, M., Linhart, C., Gómez-Ramírez, J., Villegas-Lanau, A., & Exley, C. (2020). Aluminum and Amyloid- β in Familial Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 73(4), 1627-1635.
- Mold, M. J., O'Farrell, A., Morris, B., & Exley, C. (2021). Aluminum and Tau in Neurofibrillary Tangles in Familial Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease reports*, 5(1), 283-294.
- Moore, G., Durstine, J. L., Painter, P. (2016). ACSM's Exercise Management for Persons With Chronic Diseases and Disabilities, 4E. *Human Kinetics*.
- Tauskela J. S. (2007). MitoQ--a mitochondria-targeted antioxidant. *IDrugs : the investigational drugs journal*, 10(6), 399-412.
- Tiwari, S. K., & Chaturvedi, R. K. (2014). Peptide therapeutics in neurodegenerative disorders. *Current medicinal chemistry*, 21(23), 2610-2631.
- Tomljenovic L. (2011). Aluminum and Alzheimer's disease: after a century of controversy, is there a plausible link?. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 23(4), 567-598.
- Yoo, S. M., & Jung, Y. K. (2018). A Molecular Approach to Mitophagy and Mitochondrial Dynamics. *Molecules and cells*, 41(1), 18-26.
- Underwood E. (2017). *The polluted brain*. Science (New York, N.Y.), 355(6323), 342-345.