

트레드밀 운동과 실데나필 섭취가 알츠하이머질환 동물 모델의 타우병증과 뇌혈관 장벽 기능에 미치는 영향

The effect of treadmill exercise and Sildenafil administration on tauopathy and blood-brain barrier function in Alzheimer's disease mice model

권기천(한국체육대학교 박사수료) · 장용철(한국체육대학교 교수) · 김태경(한국체육대학교 교수) · 구정훈*(한국체육대학교 교수)

Ki-Chun Kwon Korea National sport Univ·Yong-chul Jang Korea National sport Univ·Tae-Kyung Kim Korea National sport Univ·Jung-Hoon Koo Korea National sport Univ

요약

본 연구는 알츠하이머질환(Alzheimer's disease: AD) 동물 모델을 대상으로 지구성 트레드밀 운동과 실데나필 투여가 인지기능, 근 기능, 타우병증 및 뇌혈관 장벽 관련 기전에 미치는 영향을 확인하는데 있다. AD 동물 모델을 유도하기 위해 ALCL3(40 μ g/kg) 약물을 60일간 투여하고 난 후 4주간 트레드밀 운동(10~20m/min, 50min, 5days/week)과 실데나필 투여(7mg/kg/day, 5회/주)를 실시하였다. 트레드밀 운동과 실데나필 투여는 ALCL3 투여에 의한 인지기능과 근 기능 감소를 일부 완화시킨 것으로 나타났다. 특히 트레드밀 운동과 실데나필 투여는 AD 병리학적 특징인 타우병증 관련 단백질은 PHF-1 단백질 수준을 유의하게 감소시킨 것으로 나타났다. 또한, 아밀로이드 축적을 감소시켜 결과적으로 세포 내 축적되는 독성 단백질에 의한 세포사멸을 완화시킨 것으로 나타났다. 또한, ALCL3 투여에 의한 염증 반응 단백질인 TNF- α 도 트레드밀 운동 혹은 실데나필 처치에 의해 감소된 것으로 나타났다. 마지막으로 ALCL3에 의한 감소된 occludin과 claudin-5 단백질 수준은 트레드밀 운동, 실데나필 섭취 및 복합 처치를 통해 일부 증가된 것으로 나타났다. 따라서 이를 종합해 보면 트레드밀 운동 혹은 실데나필 섭취는 치매 질환에 나타나는 병리학적 특징을 일부 완화시켜 인지기능과 근기능을 일부 개선할 수 있는 효과적인 방법이라고 생각된다.

Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of treadmill exercise(TE) and/or Sildenafil(SIL) treatment on pathological hallmarks of Alzheimer's Disease(AD). All group, except CON group were intraperitoneally (I.P) injected ALCL3 drug (40 μ g/kg) for 60 days to induce AD mice model. After then, they were I.P injected SIL treatment (7mg/kg/day, 5 times a week), and was conducted treadmill exercise(10~20m/min, 50min, 5days/week). First, cognitive deficits and muscle dysfunction were significantly improved following TE and/or SIL treatment. In particular, increased PHF-1 and TNF- α induced by ALCL3 treatment were significantly rescued following TE and/or SIL treatment. Finally, BBB-related proteins such as occludin and claudin-5 were significantly reduced by ALCL3 administration. However, TE and/or SIL treatment can reverse these proteins level. Taken together, our results demonstrated that TE and/or SIL supplementation alleviates cognitive deficits and muscle dysfunction by reducing tauopathy and inflammation. In addition, these interventions can improve BBB impairments induced by ALCL3 treatment, which can play a role in a preventive strategy for Alzheimer's disease.

Key words : Paired helical filaments, Blood-brain barrier, aluminum chloride, cognitive function, physical exercise

*mt634@knsu.ac.kr

이 논문은 2018년 대한민국 교육부와 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (NRF-2018S1A5A2A03039317)

I. 서론

신경퇴행성 뇌질환(neurodegenerative diseases)은 노화에 따라 진행되는 불가피한 과정으로 특정 뇌 세포의 독성 단백질 축적, 뇌신경 신호전달 감소, 시냅스 전후 기능상의 문제 등으로 신경세포의 사멸이 나타나 인지기능이 감소된다(Heemels, 2016; Yu 등, 2020). 이중, 알츠하이머질환(Alzheimer's Disease, AD)은 가장 광범위하게 발병되는 대표적인 신경퇴행성 질환으로 알려져 있지만 아직까지 질환에 대한 기초적인 발병 원인과 치료책은 밝혀져 있지 않다(Selkoe, 2001). 하지만 많은 연구에서 세포외 베타 아밀로이드(β -amyloid: A β) 단백질의 축적이 세포 독성을 일으키는 것으로 보고되었으며 이를 제거하거나 축적을 억제하기 위한 다양한 방법들이 시도되고 있다(Selkoe, 2001; Selkoe and Hardy, 2016). 흥미롭게도 최근까지 A β 단백질 축적을 억제하거나 감소시키기 위한 많은 연구가 진행되고 있었지만 일부 연구에서 A β 단백질 감소와 그에 따른 인지기능 개선과의 관련성이 없다는 연구가 보고되면서 A β 단백질 이외에 다른 단백질들의 연관성이 필요하다고 제시되었다(Pimplikar, 2009).

타우병증(tauopathy)은 AD에서 나타나는 또 다른 대표적 독성 단백질로 세포내 타우 단백질의 과인산화로 인한 신경섬유원 농축(neurofibrillary tangle, NFT)이 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다(Lebouvier 등, 2017). 특히 과인산화 된 타우 단백질이 AD 초기 상태에 과도하게 축적될 수 있고 이는 미토콘드리아 기능이상, 신경세포 사멸과 같은 다양한 증상을 초래하여 결과적으로 인지기능 저하에 중요 역할을 한다고 보고되었다(van der Kant, 등 2020). 따라서 과인산화 된 타우 단백질을 감소시키거나 생성을 억제시키는 것은 AD를 관리하는 또 하나의 새로운 패러다임으로 제시될 수 있다. 하지만 아직까지 타우병증에 관련된 분자적 기전 혹은 감소 기전을 확인하는 연구는 부족한 실정이며 이와 관련된 다양한 추후 연구들이 요구된다.

최근, 뇌혈관 기능이상(cerebrovascular dysfunction)은 AD 초기에 나타나는 공통적인 병리학적 특징이라고 보고되어 초기 질환을 진단하는데 좋은 지표라고 제시되었다(Love and Miners, 2016; Rius-Pérez 등, 2018; Joo 등, 2017). 흥미롭게도 과 인산화된 타우 단백질 축적은 뇌-혈관 장벽(Blood-brain barrier : BBB)의 기능 이상을 초래하거나 혹은 영향을 받는 상호작용을 통해 결과적으로 AD 혈관기능 이상을 유발한다고 보고되었다(Liu 등, 2020; Li 등, 2020). 따라서 타우병증을 일부 완화시키는 것은 AD 뇌혈관 기능 장애를 완화시키는 동시에 인지기능을 개선할 수 있는 효과적인 방법이라고 생각할 수 있다.

신체활동은 신경재생(neurogenesis), 뇌 유래 신경영양인자(Brain-derived neurotrophic factor : BDNF), 신경세포 생존(neuronal cell survival) 등을 활성화시켜 뇌신경 퇴행성질환에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(White and Castellano, 2008; Fahimi 등, 2017). 특히 트레드밀 지구성 운동은 AD에 나타나는 병리학적 특징인 과인산화 된 tau 단백질을 일부 감소시켜 신경세포의 사멸을

억제하고 인지기능 혹은 행동적 장애를 개선하는 것으로 보고되었다(Jeong 등, 2018; Liu 등, 2020). 이러한 운동에 의한 과인산화 된 타우 단백질 감소는 AD에서 나타나는 혈관 기능이상도 일부 완화시킬 수 있을 것으로 기대할수 있지만 아직까지 운동에 의한 타우 병증과 혈관 기능을 확인한 연구는 매우 부족한 실정이다.

최근 실테나필(Sildenafil, SIL)은 성 기능 뿐만 아니라 신경퇴행성질환에서 뇌 기능향상에 효과적인 약물로 알려진 간운데 간성뇌증 쥐를 대상으로 실테나필을 섭취한 결과 신경염증이 완화되고 운동 협응 능력이 증가됨이 보고되었다(Agusti 등, 2017). 또한, 소음에 노출시켜 스트레스를 유발시킨 동물을 대상으로 SIL 섭취는 산화적 스트레스를 감소시키고 인지기능을 개선시켰다고 보고되었다(Sikandner 등, 2017). AD와 실테나필 섭취와 관련된 연구를 살펴보면 Sheng 등(2017)은 알츠하이머 질환자들을 대상으로 실테나필을 섭취한 결과 뇌의 혈류역학 관련 기능을 증가시키고 뇌의 산소 섭취율을 증가시켜 인지기능을 향상시킨다고 보고하였다. 따라서 이를 종합해보면 운동과 실테나필의 복합처치는 AD에서 공통적으로 나타나는 타우병증과 뇌 혈관 기능 이상을 일부 억제할 수 있다는 가능성을 제시할 수 있으며 결과적으로 인지기능 개선에 효과적인 방법이라는 과학적인 정보를 제공할 수 있을 것으로 생각된다. 하지만 아직까지 운동과 실테나필의 복합처치에 의한 타우병증 혹은 이와 상호하는 혈관기능을 확인한 연구는 부족한 실정이다.

따라서 본 연구의 목적은 AD 질환 동물 모델을 대상으로 트레드밀 운동과 실테나필 섭취가 근 기능, 타우병증, BBB 관련 단백질 발현 및 인지기능에 미치는 영향을 확인하는데 있다. 이러한 결과는 AD를 완화시키거나 혹은 치료하는 관점에서도 중요한 자료로 활용될 수 있을 것으로 기대되며 추후 연구 방향에 대해서도 새로운 방향을 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

II. 연구방법

1. 실험동물 및 처치방법

C57BL/6 마우스(n=40, 8 weeks, female)를 대상으로 1964년 헬싱키 선언에 근거하여 Guiding Principles for the care and Use of Animal 가이드라인에 따라 온도($22 \pm 1^\circ\text{C}$), 습도($50 \pm 5\%$), 주야간 침 등 및 소동(light-dark cycle, 12시간)이 자동적으로 조절되는 동물 실험실에서 실시하였으며 모든 실험과정 및 절차는 기관내 동물실험윤리위원회의 승인을 거쳐서 진행하였다. 먼저, AD를 유도하기 위해서 Aluminum Chloride(AlCl₃)을 60일간(40 $\mu\text{g/kg}$, Intraperitoneal injection, i.p.) 투여하고 집단을 (1) Sham-control (CON : 8마리); (2) ALCL₃-control (ALCL₃ : 8마리); (3) ALCL₃-Treadmill exercise (ALCL₃-TE : 8마리); (4) ALCL₃-Sildenafil (ALCL₃-SIL : 8마리); (5) ALCL₃-Treadmill exercise with SIL (Combiend : 8마리)으로 구분하였다. 실테나필(Sigma) 투여는 Orejana 등(2014)이 제시한 방법을 적용하여 실테나필(7mg/kg/day)을 4주간(5회/주) 복강내 투여하였다.

2. 트레드밀 운동 프로토콜

트레드밀 운동은 동물실험용 트레드밀 기기(8-Lanes treadmill, Daemyung scientific Co, Ltd, Korea)을 5일간 사전적응 운동(10min, 10m/min)을 실시하였다. 이후 본 운동으로 점진적으로 운동강도를 증가시켜 4주 동안(10~20m/min, 50min, 5days/week) 실시하였다. 운동을 실시하지 않는 대조집단의 환경변화에 따른 요인들을 조절하기 위해 운동 집단과 동일한 시간동안 트레드밀 기기 위에 머무르도록 진행하였다.

3. 신물질탐색 검사

신물질 탐색 검사(Novel object recognition memory)는 새로운 물체를 탐색하는 동물들의 특성을 이용하여 인지기능과 기억능력을 평가하는 방법이다. 먼저 실험동물을 훈련단계로 규격화된 공간 내에 2개의 동일한 물체(물체 A)를 5분간 탐색하도록 하였다. 이후 약 24시간이 지난 뒤 실험동물을 같은 공간 내에서 친숙해진 물체A 하나를 다른 물체에 교체시켜(물체 B) 1분간 실험동물이 새로운 물체를 탐색하는데 소비하는 시간을 기록하였다.

4. 근 기능 검사

AD 동물의 사지근력을 측정하기 위해서 Madiha 등(2018)의 연구에서 사용된 Kondziela's Inverted Screen Test를 본 연구에 맞게 수정·보완하여 측정하였다. 측정 방법은 45cm 위치에서 정사각형의 철망을 거꾸로 뒤집어 실험동물을 위치해놓고 떨어진 시간을 측정하였다. 낙상에 대한 충격을 완화시키기 위해서 바닥에 폭신한 쿠션 소재의 깔짚을 설치하였으며 모든 측정은 동일한 측정자가 총 2번의 측정을 실시한 후에 그 중 최대값을 분석하는데 사용하였다.

5. 조직적출

모든 처치가 완료된 후 pentobarbital sodium (50 mg/kg)을 복강 내 주입하여 마취하고 빠르게 뇌 조직을 적출하여 분석시까지 액화질소에 동결시켜 -80°C 초저온냉동기(Deep Freezer, SANYO, Janpen)에 냉동 보관하였다.

6. Western blotting

집단별로 분리된 조직을 Bradford(1976)법에 따라 정량하고 난후 단백질량을 20~30μg으로 10~12% SDS-Polyacrylamide gel에서 전기영동 한후 PVDF membrane으로 전이시켰다. 이후 3~5% BSA가 첨가된 TBS-T 용액으로 60~90분 동안 실온에서 blocking 시킨 후, 1차 항체를 4°C 혹은 상온에서 (4~12시간 이상) 반응시켰다. 이후 TBS-T 완충용액으로 8분간 5회 세척 후 2차 항체를 상온에서 60분동안 반응시켰다. 이후 다시 TBS-T 완충용액으로 8분간 5회 세척 후, ECL solution(Santacruz Biotechnology, USA)에 membrane을 1분간 발색하고 membrane을 이미지 분석 시스템(Molecular Imager ChemiDoc XRS System, Bio-Rad, USA)을 이용하여 스캔한 후 Quantity One 1-D Analysis Software(Bio-Rad, USA)를 이용하여 총 단백질 수준을 산출하였다.

7. 자료처리

수집된 자료는 SPSS Statistics 24.0 통계 프로그램을 이용하여 각 변인들에 대한 기술 통계치로 평균±표준편차(Mean±SE)로 산출하였다. 각 집단과 시기 간에 따른 변인들의 차이는 일원변량분석(One-way ANOVA)을 실시하였으며 그 차이를 구체적으로 분석하기 위해 LSD (least significant difference)를 이용하여 사후 검증을 실시하였다. 이때 모든 검증의 통계적 유의수준은 $\alpha=0.05$ 로 설정하였다.

III. 연구결과

1. 트레드밀 운동과 SIL섭취에 따른 인지기능의 변화

4주간의 트레드밀 운동과 실테나필 섭취에 따른 인지기능을 확인하기 위해 신물질탐색 검사를 실시하였으며 집단 간 통계적으로 유의한 차이가 나타나 사후 검증을 실시하였다(그림 1A-C). 먼저 CON 집단과 비교하여 ALCL₃ 약물을 투여한 집단은 새로운 물체에 보내는 시간이 통계적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. 하지만 트레드밀 운동을 실시한 ALCL-TE 집단은 새로운 물체를

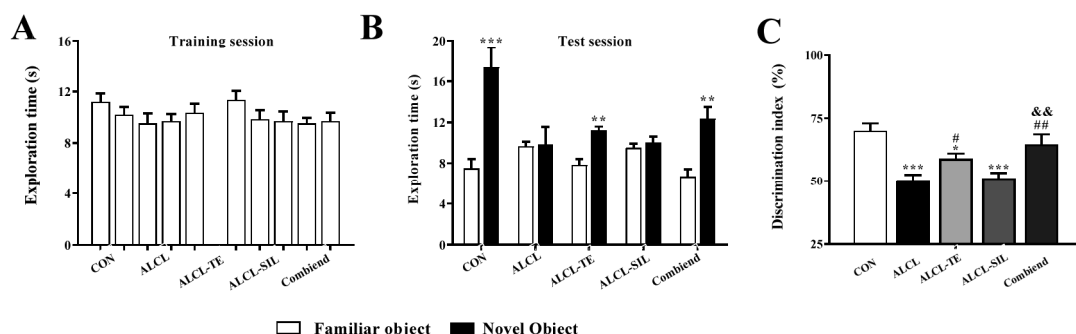


그림. 1. Treadmill exercise and/or Sildenafil administration alleviate cognitive function in ALCL₃-induced AD mice model. (A) Exploration time of the Novel object recognition memory during training session (B) Exploration time of the Novel object recognition memory during test session, (C) Discrimination index (%). All bars shown represented the means ± SEM. A LSD post-doc test: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ versus CON group; # $p<0.05$, ## $p<0.01$ versus ALCL group; && $p<0.01$ versus ALCL-SIL group.

탐색하는 시간이 일부 증가된 것으로 나타나 운동에 의한 인지 기능이 개선된 것으로 나타났다. 하지만 실테나필을 섭취한 ALCL-SIL 집단에서는 처치에 의한 새로운 물질 탐색 시간이 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다. 반면 트레드밀 운동과 실테나필을 복합 처치한 Combined 그룹에서는 단일 처치한 그룹과 비교하여 새로운 물체에서 보낸 시간이 통계적으로 증가한 것으로 나타났다(그림 1).

2. 트레드밀 운동과 SIL섭취에 따른 근 기능의 변화

4주간의 트레드밀 운동과 실테나필 섭취에 따른 근 기능을 확인하기 위해 Grip test를 실시하였으며 집단 간 통계적으로 유의한 차이가 나타나 사후 검증을 실시하였다(그림 2). ALCL₃ 약물을 투여한 집단은 CON 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 근 기능이 감소된 것으로 나타났다. 처치에 의한 근 기능 회복을 확인한 결과 트레드밀 운동은 ALCL₃ 투여에 의해 감소된 근 기능 일부를 회복시킨 것으로 나타났지만 실테나필 섭취는 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다. 마지막으로 트레드밀 운동과 실테나필 복합처치는 ALCL₃ 투여에 의한 근기능 감소를 회복시킨 것으로 나타났지만 복합처치에 대한 시너지 효과는 나타나지 않았다(그림 2).

3. 트레드밀 운동과 SIL섭취에 따른 타우병증의 변화

4주간의 트레드밀 운동과 실테나필 섭취에 따른 타우병증과 염증 기전을 확인하기 위해 PHF-1과 TNF- α 단백질 발현을 확인하였으며 집단 간 통계적으로 유의한 차이가 나타나 사후 검증을 실시하였다(그림 3). 먼저 PHF-1 단백질 수준은 ALCL 집단이 CON 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 나타났다(그림 3B). 이는 아마도 ALCL₃ 투여에 의해서 타우 단백질이 과 인산화 된 것으로 해석할 수 있다. 각각의 처치에 대한 효과를 확인한 결과 예상과 달리 트레드밀 운동 혹은 실테나필 섭취에 따른 PHF-1 발현 수준은 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다. 하지만 트레드밀 운동과 실테나필

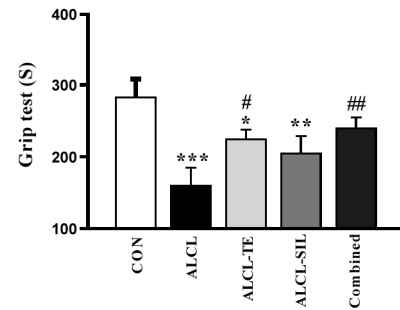


그림 2. Treadmill exercise and/or Sildenafil administration restore muscle function in ALCL₃-induced AD mice model. All bars shown represented the means \pm SEM. A LSD post-doc test: * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 versus CON group; # p <0.05, ## p <0.01 versus ALCL group.

섭취를 병행한 Combined 집단은 ALCL 집단과 비교하여 PHF-1 단백질 수준을 일부 감소시킨 것으로 나타났다. 다음으로 TNF- α 단백질 수준은 CON 집단과 비교하여 ALCL 집단이 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 나타나 염증 반응이 나타난 것으로 해석된다. 하지만 트레드밀 운동과 실테나필 섭취 혹은 복합처치는 증가된 TNF- α 단백질 발현을 통계적으로 유의하게 감소시킨 것으로 나타났다.

4. 트레드밀 운동과 SIL섭취에 따른 BBB의 변화

4주간의 트레드밀 운동과 실테나필 섭취 후 BBB 관련 단백질 발현 수준을 분석한 결과 집단 간 통계적으로 유의한 차이가 나타나 사후 검증을 실시하였다(그림 4). 먼저 ALCL 처치는 Occludin 단백질 발현 수준을 CON 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 감소시킨 것으로 나타났다(그림 4B). 하지만 감소된 Occludin은 트레드밀 운동, 실테나필 섭취 및 복합처치에 의해 유의하게 증가하는 것으로 나타났다. 또한, Claudin-5 단백질 발현은 ALCL 집단이 CON 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 감소된 것으로 나타났다(그림 4). 하지만 트레드밀 운동, 실테나필 섭취 및 복합처치에 의해 감소된 Claudin-5 단백질 발현이 유의하게 증가된 것으로 나타났다.

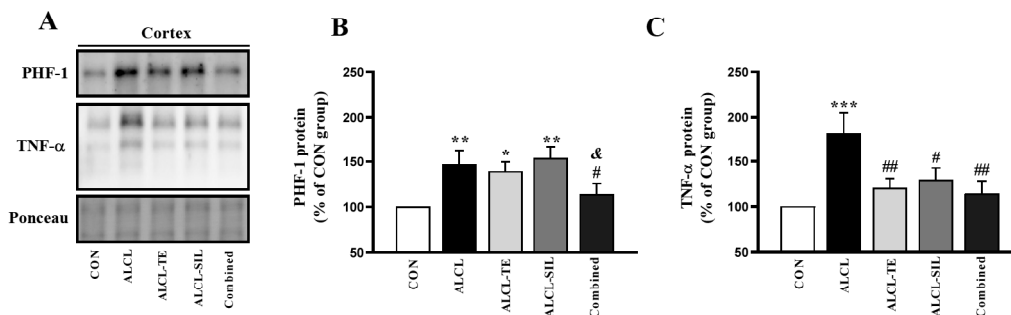


그림 3. Treadmill exercise and/or Sildenafil administration reduce PHF-1 and TNF- α expression in ALCL₃-induced AD mice model. (A-C) Representative blot of western bands and quantification for PHF-1 and TNF- α in the cortex. All bars shown represented the means \pm SEM. A LSD post-doc test: * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 versus CON group; # p <0.05, ## p <0.01 versus ALCL group; & p <0.05 versus ALCL-SIL group.

IV. 논의

ALCL₃ 약물은 신경독성물질로 장기간 투여하면 뇌를 포함한 신체 전반에 β -amyloid 단백질과 과인산화 된 타우 단백질이 축적되어 인지기능을 저하시키기 때문에 AD 관련 연구에서 사용된다(Kawahara 등, 1994). 본 연구에서도 선행연구 결과와 유사하게 ALCL₃ 투여는 인지기능을 통계적으로 유의하게 감소시킨 것으로 나타났다(그림 4). 신물질 탐색 검사는 마우스의 특성 중 새로운 물체를 탐색하는데 더 흥미를 가진다는 것을 근거로 수행되었다. 특히 CON 집단과 비교하여 ALCL 집단은 새로운 물체에 대한 흥미 혹은 탐색 시간이 감소된 것으로 나타났다. 이는 ALCL₃ 투여에 의한 인지기능 혹은 기억능력이 감소된 것으로 해석될 수 있으며 ALCL₃ 투여에 의해 인지능력이 감소되었다고 보고한 선행연구와 유사한 결과를 나타냈다(Chirima 등, 2019). 하지만 4주간의 트레드밀 운동은 감소된 인지기능과 기억 능력을 일부 회복시킨 것으로 나타났나 운동에 의한 인지기능 개선을 보고한 다수의 선행연구와 유사한 결과를 나타냈다(Choi 등, 2021). 한편, 실테나필 섭취는 일부 인지기능을 개선시킬 수 있다고 보고되었지만(Liu 등, 2019; Venkat 등, 2019), 본 연구에서는 섭취에 의한 인지기능 개선 효과는 나타나지 않았다. 이는 아마도 실테나필 투여 양과 기간에 따라 상이하게 다르게 나타날 수 있는 것으로 생각된다. 하지만 트레드밀 운동과 함께 실테나필 섭취를 복합 처치한 Combined 그룹은 트레드밀 운동을 실시한 단일 처치보다 인지기능이 증가하는 경향을 나타냈다. 따라서 추후 실테나필에 대한 구체적인 투여량과 시기를 조절하여 인지기능 관련 기능들을 확인하는 것이 필요하다.

AD는 대표적으로 인지기능 감소가 주 병변으로 제시되기 때문에 대부분 뇌의 기능 활성화에 초점을 맞추고 있다. 하지만 일부 연구에서 AD는 뇌 뿐만 아니라 근 기능 저하 현상이 나타나기 때문에 이를 개선시키는 것이 AD를 관리하는 또 다른 방법이라고 보고하였다(Turkseven 등, 2017; Moon 등, 2018). 이에 본 연구에서는 4주간의 트레드밀 혹은 실테나필 섭취에 의한 근 기능 개선 효과를 확인하기 위해 Grip test를 실시하였다. 흥미롭게도 ALCL₃ 투여는 근 기능을 유의하게 감소시킨 것으로 나타났다. 이는 ALCL₃ 투

여가 인지기능 저하뿐만 아니라 근 기능도 감소시키는 약물이라고 생각된다. 하지만 아직까지 ALCL₃ 투여에 의한 근 기능을 확인한 연구는 매우 부족하기 때문에 추후 관련 기전을 확인할 필요성이 요구된다. ALCL₃ 투여에 의해 감소된 근 기능은 4주간의 트레드밀 운동을 통해 일부 증가된 것으로 나타나 운동에 의한 근 기능 향상을 보고한 선행연구와 유사한 결과를 나타냈다. 한편 일부 선행연구에서 실테나필 섭취는 근육 단백질 합성 증가, 근 피로와 호흡근 저하를 일부 감소시킬 수 있다고 보고되었다(Moore 등, 2016; Percival 등, 2012). 이에 본 연구에서도 ALCL₃ 투여에 의한 근 기능 감소가 실테나필 섭취로 완화된 수 있는지 확인한 결과 예상과 달리 실테나필 섭취에 의한 근 기능 개선은 나타나지 않았다. 하지만 트레드밀 운동만을 실시한 그룹과 비교하여 Combined 그룹에서 근 기능 개선이 증가하는 경향으로 나타났기 때문에 복합처치에 대한 시너지 효과를 추측해 볼 수 있다. 하지만 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았고 앞서 언급한 것처럼 실테나필 투여 양과 기간에 따라 결과가 상이할 수 있기 때문에 추후 연구를 통해 관련 기전을 확인할 필요가 있다.

타우(tau) 단백질은 미세소관 관련 단백질로 다양한 단백질들과 상호작용하여 microtubule dynamic과 네트워크를 조절하여 신경전달물질 분비 혹은 신경가소성에 관여한다. 하지만 AD에서는 어떠한 이유로 타우가 과인산화 되어 세포내 스트레스와 함께 염증(inflammation), 미토콘드리아 기능이상(mitochondria dysfunction), 및 신경세포의 사멸을 유도한다(Koo 등, 2017). 특히 PHFs(paired helical filaments)는 과 인산화된 tau 단백질이 축적된 형태로 결과적으로 신경섬유원 농축(neurofibrillary tangle, NFT)을 형성한다. 본 연구에서도 ALCL₃ 투여는 PHF-1 단백질 발현 수준을 유의하게 증가시켜 앞서 제시한 것처럼 타우 단백질의 과 인산화가 증가된 것으로 해석될 수 있다. 또한, 이러한 과 인산화는 세포내 염증반응을 증가시켜 세포사멸을 유도하는데 본 연구에서도 PHF-1 단백질 수준이 증가한 ALCL 그룹에서 TNF- α 단백질 수준이 유의하게 증가된 것으로 나타났다. 한편 트레드밀 운동은 PHF-1 수준은 일부 감소시키는 것으로 보고되었으며(Jeong 등, 2018), 이는 염증반응을 일부 완화시킬 수 있을 것으로 생각할 수 있다. 하지만 본

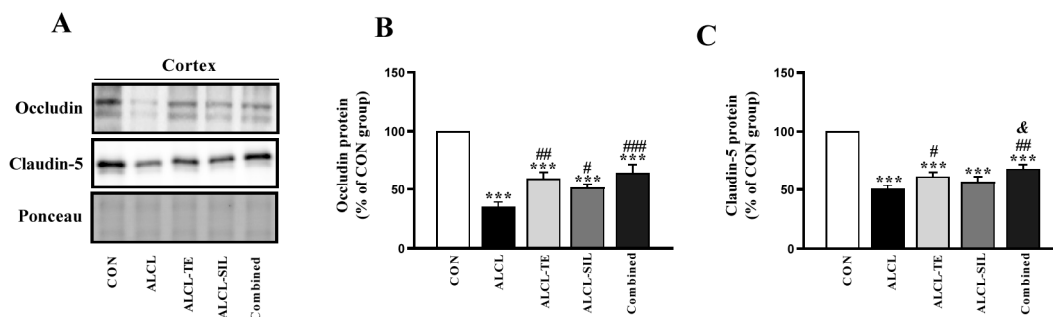


그림 4. Treadmill exercise and/or Sildenafil administration increase occludin and claudin-5 expression in ALCL₃-induced AD mice model. (A-C) Representative blot of western bands and quantification for occludin and claudin-5 in the cortex. All bars shown represented the means \pm SEM. A LSD post-doc test: *** p <0.001 versus CON group; # p <0.05, ## p <0.01, ### p <0.01 versus ALCL group; & p <0.05 versus ALCL-SIL group.

연구에서 트레드밀 운동 혹은 실데나필 섭취로 인한 PHF-1 수준을 확인한 결과 유의한 차이가 나타나지 않았다. 하지만 트레드밀 운동과 실데나필을 복합 처치한 그룹에서 유의하게 감소하는 것으로 나타나 운동 혹은 실데나필 섭취에 의한 효과를 확인할 수 있었다. 또한, TNF- α 단백질 수준은 트레드밀 운동 혹은 실데나필 섭취에 의해 통계적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 트레드밀 운동 및 실데나필 섭취는 타우 단백질의 과인산화를 억제하거나 혹은 감소시키고 염증 수준을 완화시키는 효과적 방법이라고 생각된다.

일반적으로 뇌혈관은 뇌 속에 에너지와 산소를 공급할 뿐만 아니라 대사과정에서 생성된 독성 물질들을 제거하기 때문에 뇌혈관을 조절하는 것은 뇌의 건강과 생존에 중요한 요인으로 알려져 있다(Zlokovic, 2011). 하지만 뇌혈관 기능 저하에 의한 뇌 혈류량(cerebral blood flow) 감소는 뇌의 에너지대사의 불균형과 함께 뇌 속에 축적된 독성 단백질을 효과적으로 제거하지 못하고 결국 신경세포의 사멸을 일으키는 것으로 보고되었다(Zlokovic, 2008). 흥미롭게도 AD 뇌혈관 기능과 관련된 기전 중 BBB는 과인산화된 타우 단백질과 매우 밀접하게 관련된 것으로 보고되었다(Zetterberg 등, 2019). 특히 BBB 기능에 중요한 밀착연접 단백질(tight junction proteins)들의 수준이 감소되어 뇌혈관의 장벽이 초래된다고 보고되었다(Sweeney 등, 2018; Yamazaki 등, 2019). 본 연구에서도 ALCL₃ 투여는 밀착연접 단백질인 occludin과 claudin-5 수준을 유의하게 감소시킨 것으로 나타났다. 이는 앞서 설명한 것처럼 타우의 과 인산화로 인한 PHF-1 수준 증가와 관련이 있으며 결과적으로 밀착연접의 구조를 붕괴시킨 것으로 해석될 수 있다. 하지만 트레드밀 운동은 감소된 occludin과 claudin-5 단백질을 증가시켜 BBB 기능을 일부 개선시킨 것으로 판단된다. 한편 실데나필 섭취에 의한 이 두 단백질 발현은 occludin은 증가한 반면 claudin-5은 유의한 차이가 나타나지 않았다. 하지만 트레드밀 운동과 함께 실데나필을 섭취한 Combined 집단에서 두 단백질 모두 유의하게 증가하는 경향이 나타났기 때문에 복합처치에 의한 시너지 효과를 예상해 볼 수 있다. 하지만 4주간의 트레드밀 운동 혹은 실데나필 투여에 의한 구체적인 효과를 검증하기 위해서는 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

본 연구를 종합해보면 4주간의 트레드밀 운동 혹은 실데나필 섭취는 ALCL₃ 투여에 의한 AD 병리학적 특징인 인지기능과 근기능 저하를 일부 완화시킨 것으로 나타났다. 또한 증가된 타우병증과 BBB 기능 저하가 각각의 처치에 의해 일부 회복된 것으로 나타났다. 따라서 이를 종합해보면 트레드밀 운동 혹은 실데나필 섭취는 알츠하이머 질환에 나타나는 병리학적 특징들을 완화시키거나 감소시킬 수 있는 효과적인 방법이라고 생각된다.

V. 결론 및 제언

본 연구는 AD 질환 동물 모델을 대상으로 트레드밀 운동과 실데나필 섭취가 인지기능, 근 기능, 타우병증 및 BBB 관련 단백질

발현을 확인하는데 있으며 그 결과는 다음과 같다. 트레드밀 운동과 실데나필 섭취는 ALCL₃ 약물 투여에 의한 인지기능과 근 기능을 일부 완화시킨 것으로 나타났다. 또한, 트레드밀 운동과 실데나필 섭취는 타우병증과 염증을 감소 시켰다. 마지막으로 ALCL₃ 투여에 의한 BBB 관련 밀착연접 구조 붕괴는 트레드밀 운동과 실데나필 섭취로 일부 개선된 것으로 나타났다. 따라서 트레드밀 운동 혹은 실데나필 섭취(단일 혹은 복합처치)는 AD에 나타나는 병리학적 특징들을 완화시켜 결과적으로 인지기능과 근 기능을 회복시킬 수 있는 효과적인 방법이라고 생각된다.

참고문헌

- Agusti, A., Hernández-Rabaza, V., Balzano, T., Taoro-Gonzalez, L., Ibañez-Grau, A., Cabrera-Pastor, A., et al. (2017). Sildenafil reduces neuroinflammation in cerebellum, restores GABAergic tone, and improves motor in-coordination in rats with hepatic encephalopathy. *CNS neuroscience & therapeutics*, 23(5), 386-394.
- Choi, D. H., Kwon, K. C., Hwang, D. J., Koo, J. H., Um, H. S., Song, H. S., et al. (2021). Treadmill Exercise Alleviates Brain Iron Dyshomeostasis Accelerating Neuronal Amyloid- β Production, Neuronal Cell Death, and Cognitive Impairment in Transgenic Mice Model of Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, 58(7), 3208-3223.
- Chiroma, S. M., Baharuldin, M. T. H., Mat Taib, C. N., Amom, Z., Jagadeesan, S., Ilham Adenan, M., et al. (2019). Centella asiatica protects d-galactose/AlCl₃ mediated Alzheimer's disease-like rats via PP2A/GSK-3 β signaling pathway in their Hippocampus. *International journal of molecular sciences*, 20(8), 1871.
- Del Prete, D., Checler, F., Chami, M. (2014). Ryanodine receptors: physiological function and deregulation in Alzheimer disease. *Molecular neurodegeneration*, 9(1), 1-15.
- Fusco, G., Chen, S. W., Williamson, P. T., Cascella, R., Perni, M., Jarvis, J. A., et al. (2017). Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by α -synuclein oligomers. *Science*, 358(6369), 1440-1443.
- Heemels, M. T. (2016). Neurodegenerative diseases. *Nature*, 539(7628), 179-180.
- Jeong, J. H., Koo, J. H., Cho, J. Y., Kang, E. B. (2018). Neuroprotective effect of treadmill exercise against blunted brain insulin signaling, NADPH oxidase, and Tau hyperphosphorylation in rats fed a high-fat diet. *Brain Research Bulletin*, 142, 374-383.

- Joo, I. L., Lai, A. Y., Bazzigaluppi, P., Koletar, M. M., Dorr, A., Brown, M. E., et al. (2017). Early neurovascular dysfunction in a transgenic rat model of Alzheimer's disease. *Scientific reports*, 7(1), 1-14.
- Kawahara, M., Muramoto, K., Kobayashi, K., Mori, H., Kuroda, Y. (1994). Aluminum promotes the aggregation of Alzheimer's Amyloid β -Protein in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 198(2), 531-535.
- Koo, J. H., Kang, E. B., Oh, Y. S., Yang, D. S., Cho, J. Y. (2017). Treadmill exercise decreases amyloid- β burden possibly via activation of SIRT-1 signaling in a mouse model of Alzheimer's disease. *Experimental neurology*, 288, 142-152.
- Lebouvier, T., Pasquier, F., Buée, L. (2017). Update on tauopathies. *Current opinion in neurology*, 30(6), 589-598.
- Li, X., Yang, Y., Zhao, H., Zhu, T., Yang, Z., Xu, H., et al. (2020). Enhanced in vivo blood-brain barrier penetration by circular Tau-transferrin receptor bifunctional aptamer for tauopathy therapy. *Journal of the American Chemical Society*, 142(8), 3862-3872.
- Liu, Y., Chu, J. M. T., Yan, T., Zhang, Y., Chen, Y., Chang, R. C. C., et al. (2020). Short-term resistance exercise inhibits neuroinflammation and attenuates neuropathological changes in 3xTg Alzheimer's disease mice. *Journal of neuroinflammation*, 17(1), 1-16.
- Liu, L., Xu, H., Ding, S., Wang, D., Song, G., Huang, X. (2019). Phosphodiesterase 5 inhibitors as novel agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Brain research bulletin*, 153, 223-231.
- Liu, Y., Zhang, S., Li, X., Liu, E., Wang, X., Zhou, Q., et al. (2020). Peripheral inflammation promotes brain tau transmission via disrupting blood-brain barrier. *Bioscience reports*, 40(2).
- Love, S., & Miners, J. S. (2016). Cerebrovascular disease in ageing and Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*, 131(5), 645-658.
- Moon, Y., Choi, Y. J., Kim, J. O., Han, S. H. (2018). Muscle profile and cognition in patients with Alzheimer's disease dementia. *Neurological Sciences*, 39(11), 1861-1866.
- Moore, K. M., Girens, R. E., Larson, S. K., Jones, M. R., Restivo, J. L., Holtzman, D. M., et al. (2016). A spectrum of exercise training reduces soluble A β in a dose-dependent manner in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of disease*, 85, 218-224.
- Percival, J. M., Whitehead, N. P., Adams, M. E., Adamo, C. M., Beavo, J. A., Froehner, S. C. (2012). Sildenafil reduces respiratory muscle weakness and fibrosis in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *The Journal of pathology*, 228(1), 77-87.
- Pienaar, I. S., Lee, C. H., Elson, J. L., McGuinness, L., Gentleman, S. M., Kalaria, R. N., et al. (2015). Deep-brain stimulation associates with improved microvascular integrity in the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 74, 392-405.
- Pimplikar, S. W. (2009). Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41(6), 1261-1268.
- Rius-Pérez, S., Tormos, A. M., Pérez, S., Taléns-Visconti, R. (2018). Vascular pathology: cause or effect in Alzheimer disease?. *Neurología (English Edition)*, 33(2), 112-120.
- Sheng, M., Lu, H., Liu, P., Li, Y., Ravi, H., Peng, S. L., et al. (2017). Sildenafil improves vascular and metabolic function in patients with Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 60(4), 1351-1364.
- Sikander, H. E., Park, S. Y., Kim, M. J., Park, S. N., Yang, D. W. (2017). Neuroprotective effects of sildenafil against oxidative stress and memory dysfunction in mice exposed to noise stress. *Behavioural Brain Research*, 319, 37-47.
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological reviews*.
- Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO molecular medicine*, 8(6), 595-608.
- Sweeney, M. D., Sagare, A. P., Zlokovic, B. V. (2018). Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neurology*, 14(3), 133-150.
- Turkseven, C. H., Buyukakilli, B., Balli, E., Yetkin, D., Erdal, M. E., Yilmaz, S. G., et al. (2017). Effects of Huperzin-A on the Beta-amyloid accumulation in the brain and skeletal muscle cells of a rat model for Alzheimer's disease. *Life sciences*, 184, 47-57.
- van der Kant, R., Goldstein, L. S., Ossenkoppele, R. (2020). Amyloid- β -independent regulators of tau pathology in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 21(1), 21-35.
- Venkat, P., Chopp, M., Zacharek, A., Cui, C., Landschoot-Ward, J., Qian, Y., et al. (2019). Sildenafil treatment of vascular dementia in aged rats. *Neurochemistry international*, 127, 103-112.
- White, L. J., & Castellano, V. (2008). Exercise and brain health—implications for multiple sclerosis. *Sports medicine*, 38(2),

91-100.

Yamazaki, Y., Shinohara, M., Shinohara, M., Yamazaki, A., Murray, M. E., Liesinger, A. M., et al. (2019). Selective loss of cortical endothelial tight junction proteins during Alzheimer's disease progression. *Brain*, 142(4), 1077-1092.

Zetterberg, H., & Schott, J. M. (2019). Biomarkers for Alzheimer's disease beyond amyloid and tau. *Nature medicine*, 25(2),

201-203.

Zlokovic, B. V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57(2), 178-201.

Zlokovic, B. V. (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(12), 723-738.