

## PDEs 억제제와 트레드밀 지구성 운동이 파킨슨질환 동물 모델의 운동 기능과 뇌혈관 기능에 미치는 영향

### The effect of PDEs inhibitor and treadmill endurance exercise on motor function and cerebrovascular function in Parkinson's disease mice model

황동주(한국체육대학교 박사후연구원) · 이웅배(신한대학교 교수) · 구정훈\*(한국체육대학교 교수)

Dong-Joo Hwang Korea National sport Univ · Woong-Bae Lee Shin-Han Univ · Jung-Hoon Koo Korea National sport Univ

#### 요약

본 연구는 파킨슨 질환(Parkinson's disease, PD) 동물모델을 대상으로 트레드밀 지구성 운동과 PDEs 억제제(Sildenafil) 섭취가 운동기능과 뇌혈관 기능 관련 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하는데 있다. 파킨슨질환 동물 모델은 MPTP(25mg/kg) 약물과 흡수 보강제인 Probenecid(250mg/kg)을 5주간(2회/주, 총 10회) 투여하였다. 이후 4주간 트레드밀 지구성 운동(10-15m/min, 60min, 5day/week)과 실데나필(7mg/kg/day, 5회/주)을 단일 혹은 복합 처치하였다. 그 결과, 4주간의 트레드밀 지구성 운동은 MPTP 처리에 의해 저하된 근 기능을 일부 회복시킨 것으로 나타났다. 또한, MPTP 투여에 의해 증가된 alpha-synuclein(aSyn) 단백질 발현은 트레드밀 지구성 운동 혹은 실데나필 섭취로 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 운동기능의 긍정적인 변화에 대한 기전을 확인하고자 aSyn 단백질 발현과 근 기능의 상관분석을 실시한 결과 부적 상관관계( $r=-0.494$ ,  $p=0.0025$ )가 나타났다. 마지막으로 Con 집단과 비교하여 MPTP 처리한 모든 집단에서 밀착연접 단백질(Occludin, Claudin-5)의 발현수준이 통계적으로 유의하게 감소된 것으로 나타났다. 반면, 트레드밀 지구성 운동, 실데나필 섭취 및 복합 처치는 감소된 Occludin 단백질을 증가시키는 것으로 나타났고, aSyn 단백질과의 상관분석을 실시한 결과에서도 부적 상관관계( $r=-0.527$ ,  $p=0.0011$ )로 나타났다. 종합해보면, 트레드밀 지구성 운동 혹은 실데나필 섭취는 PD에서 나타나는 운동기능 이상, aSyn 단백질 발현 증가, 뇌혈관 기능 저하를 완화시킬 수 있는 방법이라고 판단된다.

#### Abstract

In our study, we investigated the effect of treadmill endurance exercise(TEE) and PDEs inhibitor(Sildenafil, SIL) on motor function and cerebrovascular function in the mouse model of Parkinson's disease(PD). To establish PD model, we injected 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP, 25mg/kg) and Probenecid(250mg/kg). After that, they are assigned to TEE(10-20m/min, 50min, 5days/week) with SIL administration(7mg/kg/day, 5 times a week, I.P). First, 4 weeks of TEE improve MPTP-induced muscular dysfunction. In addition, the increased level of alpha-synuclein(aSyn) protein induced by MPTP treatment was significantly reduced following TEE and/or SIL administration. In order to validate these results, we examined correlations between muscular function and aSyn protein and found that muscular function was negatively correlated with aSyn protein( $r=-0.494$ ,  $p=0.0025$ ). Moreover, the tight junction-related proteins such as Occludin and Claudin-5 were significantly decreased by MPTP treatment. However, TEE and/or SIL administration reversed the expression level of occludin protein. Also we examined the correlations between Occludin and aSyn protein( $r=-0.527$ ,  $p=0.0011$ ). Taken together, our results demonstrated that TEE and SIL treatment might alleviate the motor deficits, aSyn metabolism, cerebrovascular dysfunction known as one of the pathogenesis of PD.

Key words : Sildenafil, treadmill exercise, alpha-synuclein, muscular dysfunction, tight junction

\* mt634@knsu.ac.kr

\* 이 논문 또는 저서는 2018년 대한민국 교육부와 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (NRF-2018S1A5A8030514)

## I. 서론

파킨슨질환(Parkinson's Disease, PD)은 두 번째로 발병률이 높은 신경퇴행성질환으로 도파민성 퇴행성 변화에 의해서 보행 장애, 근육 위축 및 손발 떨림 등과 같은 운동기능 실조가 나타난다. 불행하게도 현재까지 많은 연구들이 진행되고 있지만 파킨슨질환에 대한 발병 원인과 치료책은 아직 알려져 있지 않은 가운데 뇌의 흑질(Substance nigra, SN)과 선조체(Striatum, STR)에서 특이적으로 알파-시뉴클린( $\alpha$ -synuclein:  $\alpha$ Syn) 단백질의 축적이 발견되는 것으로 보고되었다(Braak et al., 2003; Macedo et al., 2015). 일반적으로 세포내 축적된  $\alpha$ Syn 단백질은 응집된 구조에 따라 다양하게 축적되며 그 중 올리고머 형태의  $\alpha$ Syn 단백질이 다른 구조의  $\alpha$ Syn 단백질보다 더 강한 독성을 나타내는 것으로 보고되었다(Fusco et al., 2017; Bengoa-Vergniory et al., 2017; Castillo-Carranza et al., 2018). 특히 뇌 세포내 축적된  $\alpha$ Syn 단백질은 염증(Inflammation), 미토콘드리아 기능이상(Mitochondrial dysfunction), 오토파지 기능이상(Impaired autophagy), 소포체 스트레스(ER-stress)와 같은 기능 이상을 유발하여 도파민성 신경세포의 사멸을 일으키고 결과적으로 운동기능을 감소시키는 것으로 보고되었다(Pacheco et al., 2012; Dias et al., 2013). 따라서 세포내 축적되어 응집된  $\alpha$ Syn 단백질을 감소시키는 것은 파킨슨 질환의 도파민성 신경세포와 운동기능의 소실을 일부 완화시킬 수 있는 방법으로 많은 연구에 의해 제기되고 있다.

파킨슨질환과 혈관기능 이상의 관련성을 보고한 연구는 일부 제시되고 있지만 아직까지 구체적인 기전은 잘 알려져 있지 않다(Malek et al., 2016). Guan et al. (2013)은 파킨슨질환 환자들의 혈관 내피세포의 변성은 모세혈관의 정보교환과 기능을 감소시켜 혈관 기능을 저하시키는 것으로 보고하였다. 또한, Yang et al. (2017)의 파킨슨 환자를 대상으로 하는 연구에서도 혈관세포의 증식과 혈관 성장인자들(VEGF, PDGF)의 감소가 나타나며 이는 혈관을 재형성(vascular remodeling)하는 기전이 억제된 것이라고 보고하였다. 흥미롭게도, 최근 파킨슨 질환자에서  $\alpha$ Syn 단백질의 축적과 함께 혈관 내피세포 기능 감소가 보고하면서 혈관 내피세포의 변성이  $\alpha$ Syn 단백질의 축적과 관련이 있을 거라는 가능성을 제시되었다(Yang et al., 2017b). 특히 위의 가설을 뒷받침하는 실험동물 연구에서도 인위적으로 일정시간 중대뇌동맥을 차단시킨 결과 올리고머 형태의  $\alpha$ Syn 단백질 증가가 나타남을 보고하여 혈관기능 장애가 파킨슨질환을 일으키는 중요한 요인이라고 제시하였다(Unal-Cevik et al., 2011). 따라서, 혈관 기능장애와 파킨슨 질환의 높은 관련성을 근거로 저하된 혈관 기능을 개선시키는 것은 일부  $\alpha$ Syn 단백질을 감소시켜 결과적으로 도파민 신경세포의 생존과 운동기능을 개선시킬 수 있는 효과적인 방법이라고 사료된다.

신체활동은 파킨슨질환에 나타나는  $\alpha$ Syn의 단백질 축적을 감소시켜 도파민성 신경세포의 사멸을 억제하거나 지연시키고 결과적으로 행동적 장애를 개선하는 것으로 보고되었다(Zhou et al., 2017; Minakaki et al., 2019). 하지만 아직까지 운동의 신경보호효과에 대한 구체적인 분자생물학적 기전은 정확하게 밝혀져 있지

않다. 신체활동은 신경세포의 생성과 성장에 필요한 요인들을 증가시킬 뿐만 아니라 선택적으로 뇌의 혈류량을 증가시킴과 동시에 신생혈관의 생성에 긍정적인 영향을 미친다고 보고되었다(Pereira et al., 2007; Huang et al., 2014). 특히, 운동은 BBB의 밀착 결합부위를 강화시키고 신경세포에 산소와 영양대사 물질의 상호 교환이 잘 일어날 수 있도록 해주어 인지기능과 신경세포의 생존을 증가시키는 것으로 보고되었다(Chupel et al., 2018; Buttler et al., 2017). 이는 신체활동을 통한 뇌혈관 기능 개선이  $\alpha$ Syn 단백질 축적을 감소시키는 대안이 될 수 있음을 시사한다. 하지만 아직까지 운동에 의한 뇌혈관 기능 개선을 통한 파킨슨 질환의  $\alpha$ Syn 단백질 축적 및 감소를 검증한 연구는 부족한 실정이다. 또한, 일부 연구에서 BBB의 기능개선에 기여하는 운동의 효과에 대한 상반된 견해가 제시되고 있기 때문에 관련연구가 필요하다고 생각된다(He et al., 2017).

일반적으로 PDEs(Phosphodiesterases) 억제제는 성 기능을 개선시키는 약물로 알려져 있지만 최근 신경퇴행성질환에서 뇌 기능 향상에도 효과적인 약물로 언급되고 있다. 이는 파킨슨 질환의 병리학적 특징의 개선과 연관되어 생각할 수 있지만 파킨슨 질환과 PDEs 억제제와의 관련성을 보고한 선행연구는 부족한 실정이다. 따라서 PDEs 억제제와 파킨슨질환의 혈관기능 개선에 관련된 보다 구체적인 연구가 필요하다고 생각된다.

따라서, 본 연구는 파킨슨질환 동물 모델을 대상으로 트레드밀 지구성 운동, PDEs 억제제인 실데나필 약물처리 및 복합처리에 의한 뇌혈관기능 관련 단백질들의 발현변화를 토대로  $\alpha$ Syn 단백질 발현과의 상관도를 분석하여 파킨슨 질환에서 나타나는 운동기능 저하를 개선시키는 구체적인 기전을 확인하고자 한다.

## II. 연구방법

### 1. 실험동물

본 연구는 C57BL/6 마우스(n=42, 7 weeks, male, n=7/group)를 대상으로 온도( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), 습도(50~60%), 주야간 점등(08:00-20:00)과 소등(20:00-08:00)이 조절되는 동물실험실에서 실시하였으며 모든 실험 과정과 방법은 대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받고 실험을 진행하였다. 실험집단은 총 5그룹(n=7 per group)으로 (1) Control (CON : 7마리); (2) MPTP-control (MPTP); (3) MPTP-Treadmill exercise (MPTP-EXE); (4) MPTP-Sildenafil (MPTP-SIL); (5) MPTP-Treadmill exercise with Sildenafil (MPTP-Combined) 구분하였으며 모든 실험기간 동안 동물용 사료와 식수는 자유롭게 제공하였다.

### 2. 파킨슨질환 동물모델 유도

파킨슨질환 동물 모델을 제작하기 위해 1-methyl-4-phenyl 1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) 약물을(25mg/kg) MPTP 흡수 보강제인 Probenecid(250mg/kg)을 각각 총 5주간(2회/주, 총 10회) 복강(intraperitoneal)에 투여하였다. MPTP를 투여하지 않는 CON 집단은 동일한 양의 식염수를 처리하였다.

### 3. 운동방법

운동은 트레드밀(8Lanes, Daemyung Scientific Co, Ltd, Korea) 기구를 이용하여 1주간 지구성 사전 적응 운동(10min, 10m/min, 5day/week)을 실시하였다. 이후 본 운동에서는 동일한 파킨슨 질환 동물 모델 이용하여 운동을 수행했던 선행연구 프로그램을 근거로 점진적으로 운동 강도를 증가시켜(1주간 10m/min, 2~3주간 12m/min, 4주간 15m/min) 트레드밀 지구성 운동을(10~15m/min, 60min, 5day/week) 실시하였다(Koo et al, 2017; Jang et al., 2017).

### 4. PDEs 억제제 처리

PDEs 억제제인 실테나필(Sigma) 투여는 선행연구에서 제시한 방법을 적용하여 4주간(7mg/kg/day, 5회/주) 복강(intraperitoneal)에 투여하였다(Orejana et al., 2014).

### 5. grip strength test

PD 동물의 근 기능을 측정하기 위해서 grip strength test를 실시하였다. 먼저 측정은 바닥으로부터 45cm 위치에서 정사각형의 철망을 놓고 실험동물을 거꾸로 뒤집어 위치해놓고 5분 동안 최초로 떨어지는 시간을 측정하였다. 실험과정 동안 낙상에 대한 충격을 감소시키기 위해 바닥에 쿠션 소재의 솜을 설치하였다. 측정에 대한 오차를 줄이기 위해 동일한 총 2번의 측정 중 최대값을 결과치로 사용하였다.

### 6. 뇌 조직 적출

4주간의 트레드밀 운동 후 pentobarbital sodium(50mg/kg)을 이용하여 마취시키고 후질을 분리한 후 액체질소에 냉각시켜 분석시까지 -80°C의 냉동기에 보관하였다.

### 7. Western blotting

집단별로 분리된 샘플을 Bradford(1976)법에 따라 정량하여 단백질 양을 15~30μg으로 10~15% SDS-Polyacrylamide gel에 전기영동하였다. Membrane에 전사된 단백질을 transfer하고, 5% BSA or skim milk가 첨가된 TBS-T 용액으로 1시간 상온에서 blocking 시킨 후, 1차 항체와 4°C에서 (8~10시간 이상) 반응시켰다. 이후, 상온에서 1시간 동안 2차 항체에 Membrane을 반응시킨 후 WB LR solution(Santa Cruz Biotechnology, USA)에 1분간 발색하여 이미지 분석 시스템(Molecular Imager ChemiDoc XRS System, Bio-Rad, USA)으로 촬영하였다. 최종적으로 Quantity One 1-D Analysis Software(Bio-Rad, USA)를 이용하여 최종 단백질 발현량을 분석하였다.

### 8. 자료처리

수집된 자료는 SPSS Statistics 23.0 통계 프로그램을 이용하여

각각의 변인들에 대한 수치는 평균±표준편차(Mean±SEM)로 산출하였으며 집단과 시기 간의 차이를 확인하기 위해서 일원변량분석(One-way ANOVA)을 실시 한후 그 차이를 확인하기 위해 LSD (least significant difference)를 이용하여 사후 검증을 실시하였다. 이때 모든 검증 수준의 통계적 유의수준은  $\alpha=0.05$ 로 설정하였다.

## III. 연구결과

### 1. 트레드밀 운동과 PDEs 억제제에 따른 motor function의 변화

트레드밀 지구성 운동과 PDEs 억제제인 실테나필 섭취 후 motor function을 확인하기 위해 grip strength test(GST)를 실시한 결과 집단 간에 통계적으로 유의한 차이가 나타나 사후검증을 실시하였다[F(4, 30)=16.46,  $p<0.001$ ]. 먼저 MPTP 약물을 처리한 모든 집단(MPTP, MPTP-EXE, MPTP-SIL, Combined)의 근 기능은 CON 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 감소된 것으로 나타났다(그림 1,  $p<0.001$ ,  $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.01$ , respectively). 반면, 트레드밀 지구성 운동을 실시한 MPTP-EXE 집단과 Combined 집단은 MPTP 집단과 비교하여 GST가 유의하게 증가된 것으로 나타났다( $p<0.001$ , respectively). 실테나필을 단독 처리한 MPTP-SIL 집단은 MPTP 집단과 비교하여 GST가 증가하는 경향이 나타났지만 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다.

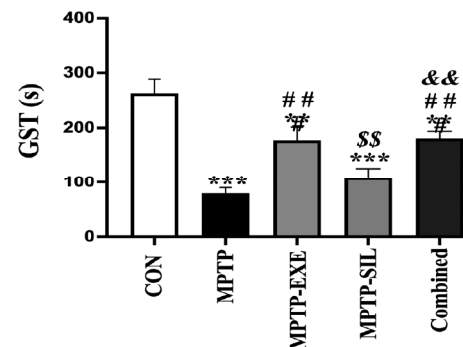


그림 1. Grip strength test. All bars shown represented the means  $\pm$  SEM. A least significant difference(LSD) post-doc test: \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  versus CON group; ### $p<0.001$  versus MPTP group; \$\$ $p<0.01$  versus MPTP-EXE group; && $p<0.01$  versus MPTP-SIL group.

### 2. 트레드밀 운동과 PDEs 억제제에 따른 $\alpha$ Syn 단백질의 변화

트레드밀 지구성 운동과 PDEs 억제제인 실테나필 섭취 후  $\alpha$ Syn 단백질 발현 수준을 분석한 결과, 집단 간 통계적으로 유의한 차이가 나타나 사후검증을 실시하였다[F(4, 30)=10.68,  $p<0.001$ ]. 먼저 MPTP 집단은 모든 집단(MPTP, MPTP-EXE, MPTP-SIL, Combined)과 비교하여  $\alpha$ Syn 단백질 발현수준이 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 나타났다(그림 2A,B,  $p<0.001$ ,  $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.05$ , respectively). 반면, MPTP 처리에 의한  $\alpha$ Syn 단백질의 증가는 트레드밀 운동을 실시한 MPTP-EXE 집단과 Combined 집단

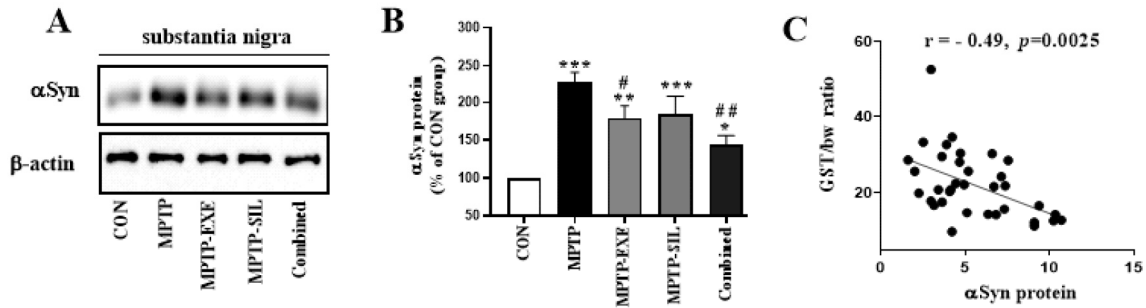


그림 2. Treadmill endurance exercise and/or Sildenafil treatment decrease the level of αSyn protein in MPTP-induced PD mice model. (A, B), Representative blot of western bands and quantification for αSyn protein in the substantia nigra, (C) Correlation analysis of GST/BW ratio and αSyn protein. All bars shown represented the means  $\pm$  SEM. A least significant difference(LSD) post-doc test: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  versus CON group; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  versus MPTP group.

에서 통계적으로 유의하게 감소된 것으로 나타났다(그림 2A,B,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , respectively). 실데나필을 단독 처치한 MPTP-SIL 집단의 경우 αSyn 단백질 발현 수준이 감소시키는 경향을 나타냈지만 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. αSyn 단백질 발현 수준과 GST/BW ratio와의 상관분석을 실시한 결과 예상한 바와 같이 부적 상관관계가 확인되었다(그림 2C,  $r = -0.494$ ,  $p = 0.0025$ ).

### 3. 트레드밀 운동과 PDEs 억제제에 따른 BBB 관련 단백질 수준의 변화

트레드밀 운동과 실데나필 섭취 후 BBB 관련 단백질인 Occludin, Claudin-5 단백질 수준을 분석한 결과(그림 3A) 집단 간에 통계적으로 유의한 차이가 나타나 사후 검증을 실시하였다(Occludin:  $F(4, 30) = 90.50$ ,  $p < 0.001$ ; Claudin-5:  $[F(4, 30) = 4.72$ ,  $p < 0.05]$ . 먼저, Occludin 단백질을 살펴보면 MPTP 처치한 모든 집단(MPTP, MPTP-EXE, MPTP-SIL, Combined) 이 CON 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 감소한 것으로 나타났다(그림 3B,  $p < 0.001$ , respectively). 하지만 감소된 Occludin 단백질은 트레드밀 지구성 운동, 실데나필 섭취 및 복합처치에 의해 통계적으로 유의하게 증

가한 것으로 나타났다(그림 3B,  $p < 0.001$ , respectively). Claudin-5 단백질 수준은 Occludin 단백질 수준과 유사하게 MPTP 약물을 처치한 모든 집단(MPTP, MPTP-EXE, MPTP-SIL, Combined)에서 CON 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 감소한 것으로 나타났다(그림 3C,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ , respectively). 하지만 이러한 감소는 트레드밀 지구성 운동, 실데나필 섭취 및 복합처치에 의해 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 마지막으로, αSyn 단백질 발현 수준과 Occludin 단백질 발현 수준을 상관분석 한 결과 부적 상관관계가 나타났다(그림 4,  $r = -0.572$ ,  $p = 0.0011$ ).

## IV. 논의

MPTP 약물은 뇌혈관장벽을 통과하여 선택적으로 도파민 세포를 파괴하는 약물로 PD 유도동물모델 연구에서 주로 사용된다. 특히 MPTP는 monoamine oxidase B(MAO-B)에 의해 MPP<sup>+</sup>(1-methyl-4-phenylpyridinium)로 전환되어 미토콘드리아 내막 전자전달계 복합체 I (complex I)의 활성을 차단하고 산화적 스트레스를 증가시켜 α-Syn 단백질의 축적과 도파민성 신경세포 사멸을 일으킨다

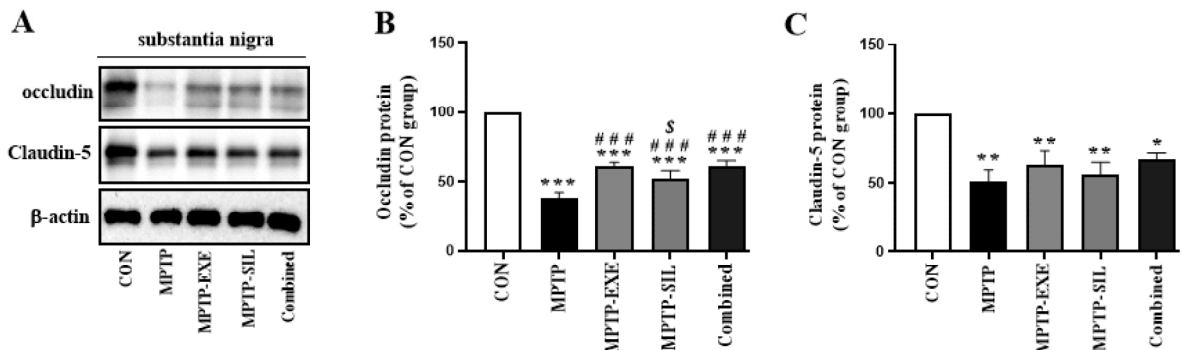


그림 3. Treadmill endurance exercise and/or Sildenafil administration alleviate BBB function in the MPTP-induced PD mice model. (A-C) Representative blot of western bands and quantification for Occludin and Claudin-5 in the substantia nigra. All bars shown represented the means  $\pm$  SEM. A least significant difference(LSD) post-doc test: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  versus CON group; ### $p < 0.01$  versus MPTP group; \$ $p < 0.05$  versus MPTP-EXE group.

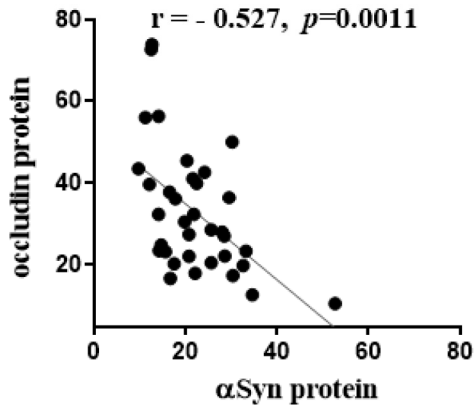


그림 4. Correlation analysis of Occludin and  $\alpha$ Syn protein.

(Kowall et al., 2000; Maries et al., 2003). MPTP 처치는 투여횟수에 따라 일회성(acute), 단기적(sub-acute) 및 장기적인(chronic) 처치가 알려져 있으며 이중 장기간(5주간, 2회/주, 총 10회) MPTP를 투여하는 것이 PD 병리학적 특징(도파민 신경세포 소실, 운동기능 이상)을 유발하는 이상적인 방법이라고 보고되었다(Jackson-Lewis et al., 2007; Ma et al., 2022). 이를 근거로 장기간 MPTP를 투여한 선행연구에서 운동기능 이상, 도파민성 신경세포 손실(70%) 및  $\alpha$ -Syn 단백질의 축적이 보고되었다(Koo et al., 2017; Hwang et al., 2018; Zhang et al., 2022). 이에 본 연구에서도 장기간 MPTP를 투여하는 방법을 적용하였으며 예상한 것과 같이 MPTP를 투여한 집단이 CON 집단과 비교하여 근 기능이 유의하게 감소된 것으로 나타났다(그림 1). 또한, 상대적 운동 기능을 평가하기 위해 체중 대비 근 기능을 분석한 결과에서도 동일하게 MPTP를 처치한 모든 그룹에서 운동기능의 감소가 나타났다. 반면, 트레드밀 지구성 운동을 실시한 집단 혹은 복합집단에서 감소된 근 기능이 일부 회복되는 것으로 나타났다. 실테나필 섭취는 일부 근력을 개선시킬 수 있다고 보고되었지만 본 연구에서는 MPTP 집단과 비교하여 일부 근 기능이 향상되는 경향 이외에 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 이는 실테나필의 투여량과 투여기간에 의존적으로 변하는 효과의 차이일 수 있다고 생각된다. 또한, 아직까지 PD를 대상으로 하는 실테나필의 작용기전 연구는 매우 부족하기 때문이 이를 입증하거나 확인할 수 있는 심도있는 후속연구가 필요하다고 생각된다.

MPTP 투여는 체중을 일부 감소시키는 경향을 나타냈지만 통계적으로는 유의한 차이가 나타나지 않았다(data not shown). 이는 MPTP 처치에 의한 운동기능 감소가 뇌 기능이상 뿐만 아니라 골격근 기능 저하에도 관련이 있다고 생각할 수 있다. 흥미롭게도 최근 PD 환자의 근력과 근 기능 감소가 보고되고 있기 때문에 (Baillie et al., 2018) 향후 MPTP 처치에 의한 골격근 기능저하 기전을 확인하는 것이 필요하다. 종합해보면, MPTP에 의한 근 기능 감소는 트레드밀 지구성 운동을 통해 일부 완화되는 것으로 나타났지만 실테나필 섭취는 아무런 영향을 미치지 못한 것으로 판단된다.

$\alpha$ Syn 단백질이 비정상적으로 응집된 형태인 루이소체(Lewy bodies, LBs)는 신경세포 파괴와 함께 산화적 스트레스를 유발하여 미토콘드리아 기능이상, mtDNA 손상, 오토파지 기능저하, 염증을 일으키는 것으로 보고되었다(Nakamura, 2013; Winslow et al., 2011; Rocha et al., 2018). 특히 응집된 구조에 따라 oligomer 형태의  $\alpha$ Syn 단백질이 제일 독성이 강하다고 알려져 있지만 monomer 형태의  $\alpha$ Syn 단백질 축적도 도파민성 신경세포 사멸과 산화적 스트레스 유발에 기여하는 것으로 보고되었다(Wang et al., 2012; Di Maio et al., 2016). 이에 본 연구에서도 monomer 형태의  $\alpha$ Syn 단백질 수준을 확인한 결과, MPTP를 처치한 모든 집단은 CON 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가하는 것으로 나타났으며, 이는 MPTP 투여에 의한  $\alpha$ Syn 단백질 발현증가를 보고한 선행연구와 일치하였다(Koo et al., 2017; Zhou et al., 2017). 결국  $\alpha$ Syn 단백질의 증가는 산화적 스트레스에서 기인하는 신경세포사멸을 증가시켜 PD의 운동기능 이상을 유발하는 것으로 생각할 수 있다. 본 연구에서는 위와 관련된 세부요인들을 분석하지 않았지만 grip strength test와 상관도 분석을 통해 확인된 부정상관 관계를 통해 간접적인 인과관계를 확인할 수 있었다. 한편 MPTP 투여에 의한  $\alpha$ Syn 단백질 수준 증가는 트레드밀 지구성 운동을 통해 일부 감소된 것으로 나타났지만 실테나필 단독 처치에서는 유의한 차이가 나타나지 않았다. 하지만 흥미롭게도 트레드밀 지구성 운동과 실테나필을 복합 처치한 집단에서 트레드밀 지구성 운동만을 실시한 집단보다 더 유의미하게  $\alpha$ Syn 단백질이 감소하는 시너지 효과가 나타났다. 이는 운동과 더불어 실테나필 섭취가 보다 긍정적인 영향을 미칠 수 있는 근거로 제시할 수 있다. 따라서 MPTP에 의한 운동기능 저하는 트레드밀 지구성 운동 혹은 실테나필 섭취에 의한  $\alpha$ Syn 단백질 수준 감소로 일부 나타날 수 있다고 생각된다. 하지만 PD의 병리학적 특징 중 도파민 대사, 근 감소증과 같은 요인들이 운동기능 저하에 기여할 수 있기 때문에 향후 트레드밀 운동과 실테나필 섭취간의 구체적인 작용기전을 분석하는 후속연구가 필요하다고 생각된다.

최근 PD에서 뇌혈관 기능 장애가 보고되고 있는 가운데 BBB의 기능 저하는 신경세포에서 요구되는 산소와 영양물질 대사작용을 교란시켜 결과적으로 운동기능 및 인지기능을 감소시키는 것으로 보고하였다(Sweeney et al., 2019). 따라서 BBB 기능을 회복시키는 것이 PD에서 나타나는 신경세포사멸을 억제하고 저하된 운동기능을 개선시키기 위해 무엇보다 중요하다. 이에 본 연구에서는 BBB의 기능을 유지하는 밀착연접 단백질(tight junction protein) 중 Occludin과 Claudin-5 단백질 수준을 확인하였다. 먼저 MPTP 처치한 모든 집단은 CON 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타나 MPTP 처치에 의한 단백질 발현의 감소를 보고한 선행연구와 일치하는 결과를 확인하였다(Chao et al., 2009; Sarkar et al., 2014). 이러한 현상은 이미 BBB의 구조 및 기능이상에 기여했을 것으로 추측되며 결과적으로 앞서 제시한 것처럼  $\alpha$ Syn 단백질 축적과 운동 기능 저하와 관련이 있을 것으로 생각된다. 흥미롭게도, 트레드밀 지구성 운동, 실테나필 섭취 및 복합

처치는 감소된 Occludin 단백질 수치를 유의하게 증가시킨 것으로 나타났다. 하지만 모든 처치에도 불구하고 Claudin-5 단백질 수준 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다. 한편 Occludin 단백질은 밀착연접 단백질 중추적인 역할을 담당하기 때문에 일부 Occludin 단백질 수준 변화는 밀착연접 강화를 유도하여 BBB를 개선시키며 결과적으로  $\alpha$ Syn 단백질 축적을 감소시키는데 기여할 수 있을 것으로 생각된다. 이에 본 연구에서 occludin 단백질과  $\alpha$ Syn 단백질 축적과의 상관정도를 확인한 결과 예상한 것처럼 부적 상관 관계가 나타났다. 따라서 MPTP에 의한  $\alpha$ Syn 단백질 축적이 운동 혹은 실테나필 섭취로 인해 감소될 수 있다는 가능성으로 생각해 볼 수 있다.

종합해보면, 트레드밀 지구성 운동 혹은 실테나필 섭취는 밀착연접 단백질의 발현을 일부 증가시켜  $\alpha$ Syn 단백질 축적을 감소시키고 결과적으로 PD에 나타나는 운동기능 저하를 일부 완화시킬 수 있는 효과적인 방법이라고 생각된다.

## V. 결론 및 제언

본 연구는 PD 질환에서 나타나는 운동기능 저하와 뇌혈관 기능을 개선하기 위한 대안으로서 트레드밀 지구성 운동과 PDEs 억제제인 실테나필 섭취에 따른 근 기능,  $\alpha$ Syn 단백질 발현 수준, 및 밀착연접 구조 단백질 수준을 분석하여 다음과 같은 결론을 도출하였다. 먼저 트레드밀 지구성 운동은 근 기능을 일부 개선시킨 것으로 나타났다. 또한, MPTP 투여에 의한  $\alpha$ Syn 단백질 축적은 트레드밀 지구성 운동, 실테나필 및 복합처치에 의해 일부 감소하는 것으로 나타났다. 마지막으로 트레드밀 지구성 운동 혹은 실테나필 섭취는 MPTP 처치에 의해 감소한 Occludin 단백질을 일부 증가시킨 것으로 나타났다. 이상의 결과를 종합해보면 트레드밀 지구성 운동 혹은 실테나필 섭취는 PD에 나타나는 병리학적 특징(운동 기능 이상,  $\alpha$ Syn 단백질 축적, 뇌혈관 기능 감소)을 개선시킬 수 있는 효과적인 방법이라고 생각된다.

## 참고문헌

Baille, G., Perez, T., Devos, D., Deken, V., Defebvre, L., & Moreau, C. (2018). Early occurrence of inspiratory muscle weakness in Parkinson's disease. *PLoS one*, 13(1), e0190400.

Bengoa-Vergniory, N., Roberts, R. F., Wade-Martins, R., & Alegre-Abarrategui, J. (2017). Alpha-synuclein oligomers: a new hope. *Acta neuropathologica*, 134(6), 819-838.

Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R. A., Jansen Steur, E. N., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*, 24(2), 197-211.

Buttler, L., Jordão, M. T., Fragas, M. G., Ruggeri, A., Ceroni, A., & Michelini, L. C. (2017). Maintenance of Blood-Brain Barrier Integrity in Hypertension: A Novel Benefit of Exercise Training for Autonomic Control. *Frontiers in physiology*, 8, 1048.

Castillo-Carranza, D. L., Guerrero-Muñoz, M. J., Sengupta, U., Gerson, J. E., & Kayed, R. (2018).  $\alpha$ -Synuclein Oligomers Induce a Unique Toxic Tau Strain. *Biological psychiatry*, 84(7), 499-508.

Chao, Y. X., He, B. P., & Tay, S. S. (2009). Mesenchymal stem cell transplantation attenuates blood brain barrier damage and neuroinflammation and protects dopaminergic neurons against MPTP toxicity in the substantia nigra in a model of Parkinson's disease. *Journal of neuroimmunology*, 216(1-2), 39-50.

Chupel, M. U., Minuzzi, L. G., Furtado, G., Santos, M. L., Hogervorst, E., Filaire, E., & Teixeira, A. M. (2018). Exercise and taurine in inflammation, cognition, and peripheral markers of blood-brain barrier integrity in older women. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*, 43(7), 733-741.

Dias, V., Junn, E., & Mouradian, M. M. (2013). The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's disease*, 3(4), 461-491.

Di Maio, R., Barrett, P. J., Hoffman, E. K., Barrett, C. W., Zharikov, A., Borah, A., Hu, X., McCoy, J., Chu, C. T., Burton, E. A., Hastings, T. G., & Greenamyre, J. T. (2016).  $\alpha$ -Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. *Science translational medicine*, 8(342), 342ra78.

Fusco, G., Chen, S. W., Williamson, P., Cascella, R., Perni, M., Jarvis, J. A., Cecchi, C., Vendruscolo, M., Chiti, F., Cremades, N., Ying, L., Dobson, C. M., & De Simone, A. (2017). Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by  $\alpha$ -synuclein oligomers. *Science (New York, N.Y.)*, 358(6369), 1440-1443.

Guan, J., Pavlovic, D., Dalkie, N., Waldvogel, H. J., O'Carroll, S. J., Green, C. R., & Nicholson, L. F. (2013). Vascular degeneration in Parkinson's disease. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 23(2), 154-164.

He, X. F., Liu, D. X., Zhang, Q., Liang, F. Y., Dai, G. Y., Zeng, J. S., Pei, Z., Xu, G. Q., & Lan, Y. (2017). Voluntary Exercise Promotes Glymphatic Clearance of Amyloid Beta and Reduces the Activation of Astrocytes and Microglia in Aged Mice. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 144.

- 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), 1-10.
- Hwang, D. J., Koo, J. H., Kwon, K. C., Choi, D. H., Shin, S. D., Jeong, J. H., Um, H. S., & Cho, J. Y. (2018). Neuroprotective effect of treadmill exercise possibly via regulation of lysosomal degradation molecules in mice with pharmacologically induced Parkinson's disease. *The journal of physiological sciences : JPS*, 68(5), 707-716.
- Jackson-Lewis, V., & Przedborski, S. (2007). Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Nature protocols*, 2(1), 141-151.
- Jang, Y., Koo, J. H., Kwon, I., Kang, E. B., Um, H. S., Soya, H., Lee, Y., & Cho, J. Y. (2017). Neuroprotective effects of endurance exercise against neuroinflammation in MPTP-induced Parkinson's disease mice. *Brain research*, 1655, 186-193.
- Koo, J. H., Jang, Y. C., Hwang, D. J., Um, H. S., Lee, N. H., Jung, J. H., Cho, J. Y. (2017). Treadmill exercise produces neuroprotective effects in a murine model of Parkinson's disease by regulating the TLR2/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Neuroscience*. 356:102-113.
- Koo, J. H., & Cho, J. Y. (2017). Treadmill Exercise Attenuates  $\alpha$ -Synuclein Levels by Promoting Mitochondrial Function and Autophagy Possibly via SIRT1 in the Chronic MPTP/P-Induced Mouse Model of Parkinson's Disease. *Neurotoxicity research*, 32(3), 473-486.
- Ma, Y., & Rong, Q. (2022). Effect of Different MPTP Administration Intervals on Mouse Models of Parkinson's Disease. *Contrast media & molecular imaging*, 2022, 2112146.
- Macedo, D., Tavares, L., McDougall, G. J., Vicente Miranda, H., Stewart, D., Ferreira, R. B., Tenreiro, S., Outeiro, T. F., & Santos, C. N. (2015). (Poly)phenols protect from  $\alpha$ -synuclein toxicity by reducing oxidative stress and promoting autophagy. *Human molecular genetics*, 24(6), 1717-1732.
- Malek, N., Lawton, M. A., Swallow, D. M., Grosset, K. A., Marrinan, S. L., Bajaj, N., Barker, R. A., Burn, D. J., Hardy, J., Morris, H. R., Williams, N. M., Wood, N., Ben-Shlomo, Y., Grosset, D. G., & PRoBaND Clinical Consortium (2016). Vascular disease and vascular risk factors in relation to motor features and cognition in early Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 31(10), 1518-1526.
- Minakaki, G., Canneva, F., Chevesier, F., Bode, F., Menges, S., Timotius, I. K., Kalinichenko, L. S., Meixner, H., Müller, C. P., Eskofier, B. M., Casadei, N., Riess, O., Schröder, R., Winkler, J., Xiang, W., von Hörsten, S., & Klucken, J. (2019). Treadmill exercise intervention improves gait and postural control in alpha-synuclein mouse models without inducing cerebral autophagy. *Behavioural brain research*, 363, 199-215.
- Nakamura K. (2013).  $\alpha$ -Synuclein and mitochondria: partners in crime?. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 10(3), 391-399.
- Pacheco, C., Aguayo, L. G., & Opazo, C. (2012). An extracellular mechanism that can explain the neurotoxic effects of  $\alpha$ -synuclein aggregates in the brain. *Frontiers in physiology*, 3, 297.
- Pereira, A. C., Huddleston, D. E., Brickman, A. M., Sosunov, A. A., Hen, R., McKhann, G. M., Sloan, R., Gage, F. H., Brown, T. R., & Small, S. A. (2007). An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(13), 5638-5643.
- Rocha, E. M., De Miranda, B., & Sanders, L. H. (2018). Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, 109(Pt B), 249-257.
- Sarkar, S., Chigurupati, S., Raymick, J., Mann, D., Bowyer, J. F., Schmitt, T., Beger, R. D., Hanig, J. P., Schmued, L. C., & Paule, M. G. (2014). Neuroprotective effect of the chemical chaperone, trehalose in a chronic MPTP-induced Parkinson's disease mouse model. *Neurotoxicology*, 44, 250-262.
- Sweeney, M. D., Zhao, Z., Montagne, A., Nelson, A. R., & Zlokovic, B. V. (2019). Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiological reviews*, 99(1), 21-78.
- Unal-Cevik, I., Gursay-Ozdemir, Y., Yemisci, M., Lule, S., Gurer, G., Can, A., Müller, V., Kahle, P. J., & Dalkara, T. (2011). Alpha-synuclein aggregation induced by brief ischemia negatively impacts neuronal survival in vivo: a study in [A30P]alpha-synuclein transgenic mouse. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 31(3), 913-923.

- 
- Wang, S., Xu, B., Liou, L. C., Ren, Q., Huang, S., Luo, Y., Zhang, Z., & Witt, S. N. (2012).  $\alpha$ -Synuclein disrupts stress signaling by inhibiting polo-like kinase Cdc5/Plk2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(40), 16119-16124.
- Winslow, A. R., & Rubinsztein, D. C. (2011). The Parkinson disease protein  $\alpha$ -synuclein inhibits autophagy. *Autophagy*, 7(4), 429-431.
- Yang, P., Waldvogel, H., Turner, C., Faull, R., & Dragunow, M. (2017). Vascular Remodelling is Impaired in Parkinson Disease. *J Alzheimers Dis Parkinsonism* 7:313.
- Zhang, J., Sun, B., Yang, J., Chen, Z., Li, Z., Zhang, N., Li, H., & Shen, L. (2022). Comparison of the effect of rotenone and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on inducing chronic Parkinson's disease in mouse models. *Molecular medicine reports*, 25(3), 91.
- Zhou, W., Barkow, J. C., & Freed, C. R. (2017). Running wheel exercise reduces  $\alpha$ -synuclein aggregation and improves motor and cognitive function in a transgenic mouse model of Parkinson's disease. *PloS one*, 12(12), e0190160.