

트레드밀 운동 및 환경강화가 알츠하이머 질환 동물 모델의 인지기능, 근 기능 및 밀착연접 단백질 수준에 미치는 영향

엄현섭^{1,*} · 정종환² · 김태경³ · 전유정⁴ · 조준용⁴ · 구정훈^{4,†}

¹건양대학교 스포츠의학과, 교수

²한국체육대학교 체육학과, 교수

³한국체육대학교 체육과학연구소, 교수

⁴한국체육대학교 운동건강관리학과, 교수

(2024년 1월 25일 접수: 2024년 2월 21일 수정: 2024년 2월 23일 채택)

The Effect of Treadmill Exercise and Environmental Enrichment on Cognitive Function, Muscle Function, and Levels of tight junction protein in an Alzheimer's Disease Animal Model

Hyun-Seob Um^{1,*} · Jong-Hwan Jung² · Tae-Kyung Kim³
Yoo-Joung Jeon⁴ · Joon-Yong Cho⁴ · Jung-Hoon Koo^{4,†}

¹Professor, Sport Medicine, Kon Yang University

²Professor, Physical Education, Korea National Sport University

³Professor, Sport Science Institute, Korea National Sport University

⁴Professor, Exercise Training for Health care and Management, Korea National Sport University

(Received January 25, 2024; Revised February 21, 2024; Accepted February 23, 2024)

요약 : 본 연구의 목적은 알츠하이머질환(Alzheimer's disease: AD) 동물 모델을 대상으로 트레드밀 운동(Treadmill exercise: TE)과 환경강화(environmental enrichment: EE) 처치가 인지기능, 근 기능, 및 밀착연접 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하는데 있다. AD 동물 모델을 제작하기 위해 aluminum chloride($AlCl_3$)를 90일간(40mg/kg/하루) 투여 하였으며 동시에 TE(10-12m/min, 40-60min/day) 혹은 EE에 노출시켰다. 그 결과 $AlCl_3$ 투여에 의한 인지기능 저하와 근 기능 감소가 TE와 EE에 의해 완화된 것으로 나타났다. 또한, TE와 EE는 AD 질환에서 나타나는 β -amyloid($A\beta$), alpha-synuclein 및 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 단백질의 발현 증가를 감소시킨 것으로 나타났다. 게다가 TE와 EE는 $AlCl_3$ 투여에 의해 감소된 밀착연접 단백질(Occludin, Claudin-5 및 ZO-1)의 발현을 통계적으로 유의하게 증

†Corresponding author

(E-mail: mt634@knsu.ac.kr)

* This work was supported by the Ministry of Education of the Republic of Korea and the National Research Foundation of Korea (NRF-2021S1A5A8065404)

* 이 논문은 2021년 대한민국 교육부와 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (NRF-2021S1A5A8065404)

가시킨 것으로 나타났다. 마지막으로 $A\beta$ 단백질과 밀착연접 단백질과의 상관분석을 실시한 결과 부적 상관관계(Occludin: $r=-0.853$, $p=0.001$; Claudin-5 : $r=-0.352$, $p=0.915$; ZO-1 : $r=-0.424$, $p=0.0390$)로 나타났다. 따라서 이를 종합해 보면 TE 혹은 EE 처치는 AD에 나타나는 병리학적 특징들을 일부 완화시켜 인지기능과 근 기능을 일부 개선 시킬 수 있는 효과적인 운동 방법이라고 생각된다.

주제어 : 알루미늄 클로라이드, 베타 아밀로이드, 신경퇴행성질환, 신체활동, 뇌혈관장벽

Abstract : The purpose of this study was to investigate the effects of treadmill exercise treadmill exercise (TE) and environmental enrichment (EE) interventions on cognitive function, muscle function, and the expression of tight junction proteins in an Alzheimer's disease (AD) animal model. To create the AD animal model, aluminum chloride ($AlCl_3$) was administered for 90 days (40mg/kg/day), while simultaneously exposing the animals to TE (10–12m/min, 40–60min/day) or EE. The results showed that cognitive impairment and muscle dysfunction induced by $AlCl_3$ administration were alleviated by TE and EE. Furthermore, TE and EE reduced the increased expression of β -amyloid($A\beta$), alpha-synuclein, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) proteins observed in AD pathology. Additionally, TE and EE significantly increased the expression of decreased adhesive adjacent proteins (Occludin, Claudin-5, and ZO-1) induced by $AlCl_3$ administration. Lastly, correlation analysis between $A\beta$ protein and tight junction proteins showed negative correlations (Occludin: $r=-0.853$, $p=0.001$; Claudin-5: $r=-0.352$, $p=0.915$; ZO-1: $r=-0.424$, $p=0.0390$). In conclusion, TE or EE interventions are considered effective exercise methods that partially alleviate pathological features of AD, improving cognitive and muscle function.

Keywords : aluminum chloride, beta-amyloid, neurodegenerative disease, physical activity, blood-brain barrier,

1. 서론

신경퇴행성질환에서 70% 이상을 차지하는 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease: AD)은 뇌 속에 축적된 베타 아밀로이드 단백질(β -amyloid protein: $A\beta$)과 세포 내 과도하게 인산화 된 타우(tau) 단백질이 축적되는 병리학적 특징을 보이며 이는 신경세포 사멸과 함께 인지기능을 감소시킨다[1, 2]. 특히 비정상적인 $A\beta$ 축적은 신경염증, 미토콘드리아 기능이상, 소포체 스트레스, 인슐린 저항성 및 에너지 대사의 장애를 유발하기 때문에 $A\beta$ 단백질의 축적을 감소시키는 것이 AD를 치료하기 위한 주된 목표라고 제시되었다. 최근 AD와 뇌혈관의 기능 이상이 보고되고 있는 가운데[3], $A\beta$ 단백질의 축적은 뇌혈관장벽(Blood-brain barrier: BBB) 기능에 중요한 밀착연접 단백질(tight junction proteins)인 Occludin, Claudin 및 Zonula occludens(ZO)의 수준을 감소시켜 BBB의 구조와 기능을 붕괴시키는 것으로

보고되었다[4, 5]. 또한, 이러한 뇌혈관 기능 장애는 뇌 안에 축적된 $A\beta$ 단백질의 제거에도 관여하기 때문에 결과적으로 상호 악순환의 고리를 형성하여 신경세포 사멸을 더욱 증가시킨다. 따라서 뇌 속에 비정상적으로 축적된 $A\beta$ 단백질을 제거하거나 혹은 뇌 혈관 기능을 향상시키는 것은 AD 질환을 완화시킬 수 있는 효과적인 방법이라고 기대할 수 있다.

신체활동은 뇌의 혈류량 및 글리코겐 증가, 호르몬 분비 조절, 신경재생, 및 세포내 스트레스와 같은 다양한 기전들을 조절하여 뇌 기능을 향상시키는 것으로 보고되고 있다[6, 7]. 특히 지구성 운동은 $A\beta$ 단백질의 축적을 감소시켜 신경세포의 활성화와 함께 인지기능을 일부 개선시킨다고 보고되었다[8, 9]. 이와 같이 AD 질환에서 운동의 중요성이 제시되고 있지만 진단을 받고 이미 장기간 병에 노출된 환자는 인지기능 감소와 행동적인 장애가 나타나기 때문에 신체활동 참여에 일부 제한적일 수 있다[10]. 또한, AD에서 뇌 뿐

만 아니라 근위축이 나타나 근력과 근 기능을 감소시킨다고 보고되었으며[11], 이는 신체활동에 필요한 움직임을 저하시킬 수 있다고 추측할 수 있다. 게다가 선행연구에서 진행된 일부 동물 연구에서는 AD 모델 생쥐들을 대상으로 실시된 트레드밀 혹은 저항성 운동 자체가 과도한 스트레스를 유발 시킬 수 있다고 제시하였다[12]. 따라서 실제 현장에서 적용되는 운동 방법과 일부 선행연구에서 보고된 운동의 부정적인 측면을 개선시킬 수 있는 안전하고 효율적인 형태의 운동이 요구되고 있다.

최근 환경강화(Enviromental enrichment: EE)는 운동에 대한 감각과 지각들을 강화시켜 신체활동을 증가시키고 신경재생 유도와 함께 인지기능 개선에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 제시되었다[13, 14]. 일부 선행연구에서 EE는 A β 단백질의 축적을 감소시켜 인지기능을 향상시키는 것으로 보고되었지만 아직까지 어떠한 기전으로 A β 단백질의 감소가 나타나는지 정확한 기전은 알려져 있지 않다[15-17]. 따라서 앞서 제시한 선행연구를 바탕으로 EE에 의한 A β 단백질의 감소가 밀착연접 단백질과의 관련성으로 추측할 수 있지만 아직까지 EE 관련 연구는 뇌손상에 의한 뇌혈관장벽의 기능만을 확인한 연구로 제한되어 있으며 A β 단백질 수준과의 관련성을 확인한 연구는 부족한 실정이다. 만일 EE에 의한 A β 단백질의 감소와 밀착연접 단백질들과의 관련성을 확인할 수 있다면 EE에 의한 AD의 개선 효과를 구체적으로 밝힐 수 있는 의미 있는 연구가 될 것으로 생각된다.

따라서 본 연구의 목적은 EE 혹은 트레드밀 운동이 A β 단백질과 뇌혈관장벽의 밀착연접 단백질 간의 상호 관련성을 검증하고, 이러한 운동 형태가 AD의 인지기능 개선에 미치는 메커니즘을 구체적으로 확인하는데 있다.

2. 연구 방법

2.1. 실험동물

7주령의 수컷 C57BL/6J 마우스(n=40)를 대상으로 알츠하이머 유도 약물인 Aluminum chloride(AlCl₃, Sigma, 06232-50G, 40mg/kg)를 생리식염수 용액에 희석하여 90일간 투여(Intraperitoneal injection: IP)하는 동시에 트레드밀 운동 혹은 EE를 수행하였다. 실험 집단은 대

조군(CON, n=10), AlCl₃ 투여 집단(AL, n=10), AlCl₃ 투여와 함께 트레드밀 운동 집단(AL-TE, n=10) 및 AlCl₃ 투여와 함께 EE 집단(AL-EE, n=10)으로 구분하였다. 모든 실험 절차와 방법은 K 대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 거쳐서 진행하였으며 온도(23±1°C), 습도(40~60%), 주야간 점등(08:00-20:00)과 소등(20:00-08:00)이 자동적으로 조절되는 시설을 갖춘 동물실험실에서 실시하였다.

2.2. 트레드밀 운동 프로토콜

트레드밀 운동은 Um 등[18]의 연구에서 실시한 운동방법을 수정 보완하여 실시하였다. 먼저 운동을 시작하기에 앞서 실험동물들을 트레드밀(8 Lanes, Daemyung Scientific Co, Ltd, Korea) 환경에 적응하기 위해 5일간 사전운동(경사도 0°, 10m/min, 10 min)을 실시하였다. 이후 본 운동으로는 10-12m/min, 40-60min/day(중 저항도 운동)로 총 90일간(5일 운동 후 2일 휴식) 실시하였다.

2.3. 환경강화 (Enviromental enrichment: EE)

EE는 정상적인 cage보다 더 넓게 아크릴로 제작하여 사용하였으며(860×760×300mm), Cage 내 다양한 환경적 요인들의 효과를 극대화시키기 위해 통나무, 사다리, 터널, 나무 블록, 동굴, 휠러닝, 밧줄 등과 먹이 및 물통을 설치하였다. 또한, 지속적으로 환경적 변화를 제공하기 위해 1주일에 한 번씩 도구들을 교체하였다.

2.3. Grip strength test

근력 측정을 위해 Madiha 등[19]의 연구에서 활용된 Kondziela's Inverted Screen Test를 수정·보완하여 측정하였다. 먼저 정사각형의 철망을 45cm 위치에서 거꾸로 뒤집어 실험동물을 위치시키고 이후 떨어지는 시간을 측정하였다. 폭신한 쿠션 소재의 깔짚을 바닥에 설치하여 낙상에 대한 충격을 최소한으로 감소시켰다. 측정은 총 2번 실시하고 그 중 최대값을 이용하여 분석하였다.

2.4. Rota-rod test

AD 동물모델의 운동협응 능력과 균형감각을 평가하기 위해 Rota-rod test(JD-A-07, Jeungdo, Korea) 이용하였다. 먼저 실험동물을 120초 동안 10rpm의 속도로 회전원통에 올려 놓고 사전 적응훈련을 실시하였다. 이후 본 검사에서는

회전속도를 5-40rpm까지 점진적으로 증가시켜 진행하였으며 300초의 최대 수행 제한시간 안에 회전원통에서 실험동물이 떨어지는 시간을 기록하여 분석하였다.

2.5. 수중미로 검사

AD 모델 쥐를 대상으로 인지기능을 측정하기 위해 수중미로검사(water maze test: WMT)를 실시하여 수영 거리(escape distance)와 수영시간(escape latency)을 컴퓨터 프로그램(SMART-LD)을 이용하여 분석하였다. WMT는 지름 1.5m 높이 40cm에 이르는 원형수조에 지름 12cm인 목표물(target)을 수면에서 2cm 정도 낮게 원형 수조 바닥에 설치하고 온수(22°C~25°C)에 우유를 용해시켜 표적을 보이지 않도록 하였다. 훈련은 5일 동안 각각 2회씩 정해진 출발지점에서 시작하여 목표물에 도달할 수 있도록 훈련시키고 2회 모두 표적을 찾지 못한 생쥐에게는 목표물로 유도하여 위치를 인지시켰다. 모든 검사는 5분 정도의 간격을 두었으며 마지막 6일째 표적을 없앤 후 본 실험에서는 출발지점에서 시작하여 표적에 도달한 결과를 분석하였고 이때, 실험 데이터로는 최초 목표치에 도달한 시간과 거리 및 60초 내 총 표적을 지나간 횟수를 활용하였다.

2.6. 뇌 조직 적출 및 Western blotting

모든 실험이 완료된 후 실험동물을 CO₂ 챔버에 넣어 약 2분간 호흡 마취시킨 후 개복하여 뇌해마 조직(n=6)을 추출하였다. 추출된 조직은 단백질 분석을 위해 액체질소에 급냉하여 분석 시까지 -80°C의 냉동기에 보관하였다. 단백질 분석은 Bradford(1976)법에 따라 총 단백질을 정량하고 단백질은 20~30 μ g으로 8-12% SDS-Polyacrylamide gel에서 전기영동 후 membrane으로 전이하고, 3-5% BSA가 첨가된 1x TBS-T 용액으로 90분 동안 실온에서 blocking 시켰다. 이후 각각의 1차 항체와 4°C에서 (8-12시간 이상) 반응시키고 다음날 TBS-T 완충액으로 10분간 5회 워싱하고 2차 항체를 실온에서 60-90분 동안 반응시킨 후 다시 TBS-T 완충액으로 10분간 5회 워싱하였다. 이미지 스캔은 WBLR solution(Western Blotting Luminol Reagent SC-2048, Santa-cruz Biotechnology, USA)에 membrane을 넣고 1분간 발색하고 얻어진 membrane을 이미지 분석 시스템(Molecular Imager ChemiDoc XRS System, Bio-Rad,

USA)을 이용하였으며 단백질량 분석은 Quantity One 1-D Analysis Software(Bio-Rad, USA)를 이용하였다.

2.7. 자료처리

수집된 자료는 SPSS Statistics 22.0 통계 프로그램을 이용하였으며 각 변인들에 대한 기술 통계치는 평균±표준오차(Mean±SEM)로 산출하고, 각 집단 및 기간에 따른 변인들의 차이를 확인하기 위해서 일원변량분석(One-way ANOVA)을 실시한 후, 그 차이를 구체적으로 확인하기 위해 LSD 방법을 이용하여 사후검증을 실시하였다. 모든 검증의 통계적인 유의수준은 $\alpha=.05$ 로 설정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 트레드밀 운동 혹은 EE가 AlCl₃ 처치에 따른 인지기능에 미치는 영향

AlCl₃ 노출은 신경 독성을 유발하고 인지기능을 감소시키기 때문에 AD의 병리학적 과정을 연구하는데 유용하게 사용된다[20, 21]. 본 연구에서도 AlCl₃ 투여 후 인지기능에 미치는 영향을 확인하기 위해 WMT를 실시한 결과(Fig 1), 타겟을 인지하여 도착하는데 소요된 시간, 거리 및 통과하는 횟수가 집단간 통계적으로 유의한 차이가 나타나 사후 검증을 실시하였다(escape latency: F=67.14, p=.001, escape distance: F=20.44, p=.001, number of crossing: F=18.97, p=.001). 먼저 CON 집단과 비교하여 AlCl₃를 투여한 AL 집단에서 시간(p<.001)과 거리(p<.001)가 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 나타났고 목표물을 통과한 횟수는 감소된 것으로 나타났(p<.001). 이는 앞서 제시한 것처럼 AlCl₃ 처치가 인지기능을 감소시킨다고 보고한 선행연구와 유사한 결과를 나타냈다. 한편 AlCl₃ 투여에 의한 인지기능 저하가 트레드밀 운동 혹은 EE 처치로 일부 완화 될 수 있는지 확인한 결과, 두 처치 방법 모두 시간과 거리가 AL 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 감소된 것으로 나타났고(Fig 1A, B), 목표물을 통과한 횟수는 트레드밀 운동을 실시한 AL-TE 그룹에서만 유의하게 증가된 것으로 나타났(Fig 1C). 이는 AlCl₃ 처치 혹은 형질전환 AD 마우스 모델을 이용하여 트레드밀 운동 혹은 EE 처치에 의한 인

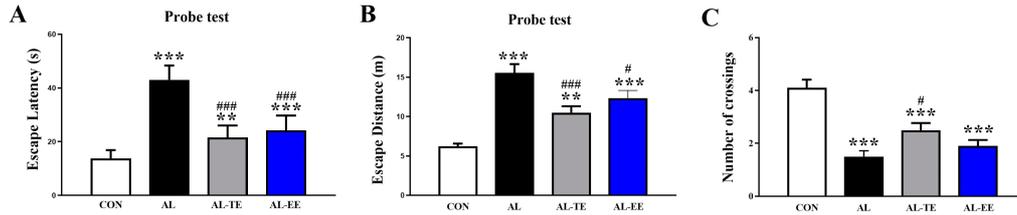


Fig. 1. Treadmill exercise and EE improves cognitive deficits induced by AlCl_3 treatment in AD mice model.

A) Escape latency of probe test. B) Escape distance of probe test. C) Number of crossing during probe test. All bars shown represent the means \pm SEM($n=10$ /group). A least significant difference(LSD) post-doc test: $**p<.01$, $***p<.001$, compared to the CON group; $\#p<.05$, $###p<.001$ compared to the AL group. CON: control group, AL: AlCl_3 treatment group, AL-TE: AlCl_3 treatment with treadmill exercise group. AL-EE: AlCl_3 treatment with environment enrichment group.

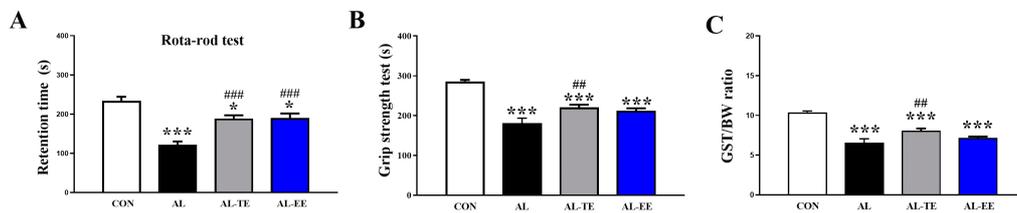


Fig. 2. Treadmill exercise and EE improves motor dysfunction induced by AlCl_3 treatment in AD mice model.

A) Retention time on the RRT(rota-rod test), B) Grip strength test, C) of crossing during probe test. All bars shown represent the means \pm SEM($n=10$ /group). A least significant difference(LSD) post-doc test: $*p<.05$, $***p<.001$, compared to the CON group; $\#p<.01$, $###p<.001$ compared to the AL group. CON: control group, AL: AlCl_3 treatment group, AL-TE: AlCl_3 treatment with treadmill exercise group. AL-EE: AlCl_3 treatment with environment enrichment group.

지기능 회복을 보고한 선행연구와 유사한 결과를 나타냈다[22, 23]. 따라서 이를 종합해 보면 트레드밀 운동과 EE 처치는 AlCl_3 투여에 의한 인지 기능 감소를 일부 회복시킬 수 있는 효과적인 방법이라고 생각된다. 하지만 이러한 인지기능 개선에 대한 기전 연구는 아직까지 부족한 실정이며 이를 확인하기 위한 다양한 연구 방법론적 접근이 필요하다고 생각된다.

3.2. 트레드밀 운동 혹은 EE가 AlCl_3 처치에 따른 근 기능에 미치는 영향

지금까지 AD와 관련된 연구들은 주로 뇌 기능

에 집중해 왔지만, 최근 일부 연구들은 AD 상황에서 근력의 감소와 근 위축을 보고함으로써, 이 질환에 대한 새로운 연구 방향성이 제시되고 있다[24, 25]. 또한, AD 동물 모델의 근육에서도 $\text{A}\beta$ 단백질 축적이 최대 근 수축력 감소시키고 이는 인지기능 저하와 관련이 있다고 보고되었다[26]. 이를 고려해 볼 때, AlCl_3 투여가 일반적인 AD 병리학적 특징 뿐만 아니라 근 기능 이상에도 영향을 미칠 것으로 추측되어 근 기능을 평가하기 위해 RRT와 GST를 실시하였다(Fig 2). RRT 운동 유지 시간과 근력은 집단 간에 통계적으로 유의한 차이가 나타나(RRT: $F=23.04$,

$p=.001$, GST: $F=29.73$, $p=.001$) 사후 검증을 실시한 결과, CON 집단과 비교하여 $AlCl_3$ 투여한 AL 집단에서 RRT 운동 유지 시간과($p<.001$) 근력($p<.001$)이 통계적으로 유의하게 감소된 것으로 나타났다(Fig 2A, B). 이는 앞서 예상한 바와 같이 $AlCl_3$ 처치에 의한 AD 동물 모델이 인지 기능 저하뿐만 아니라 근 기능이 감소될 수 있다는 새로운 연구 방향성을 제공할 수 있을 것으로 생각된다. 흥미롭게도, 트레드밀 운동과 EE 처치는 RRT 운동 유지 시간을 AL 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가시킨 것으로 나타나 두 방법 모두 운동의 협응 능력을 개선시킨 것으로 생각된다. 한편, 직접적인 사지 근력을 측정할 수 있는 GST에서는 트레드밀 운동을 실시한 AL-TE 집단에서만 AL 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가되어($p<.005$), $AlCl_3$ 투여에 의한 근력의 감소가 일부 회복된 것으로 나타났다. 이는 아마도 EE 처치 방법이 넓은 장소에서 동물들이 자유롭게 움직일 수 있는 장점이 있지만 운동 시간, 강도 및 빈도를 조절하기에는 한계가 있기 때문인 것으로 생각된다. 반면 트레드밀 운동은 일정한 부하와 강도 및 시간이 주어지는 규칙적인 운동으로 일부 근 손실을 예방하고 근력을 증

가시킬 수 있기 때문인 것으로 판단된다[27]. 이를 종합해 보면 트레드밀 운동과 EE 처치는 $AlCl_3$ 투여에 의한 근기능을 일부 개선시킬 수 있는 효과적인 방법이라고 생각된다. 하지만 $AlCl_3$ 투여에 의한 근 기능 감소 기전을 명확히 이해하기 위해서는 근 조직 내에서 일어나는 다양한 분자생물학적 연구가 필요하다고 생각된다.

3.3. 트레드밀 운동 혹은 EE가 $AlCl_3$ 처치에 따른 독성 단백질 발현에 미치는 영향

$AlCl_3$ 노출에 의한 인지 기능 감소는 다양한 산화적 스트레스와 독성 단백질 축적과 관련이 있다고 보고되었다[22, 28]. 또한, α -synuclein (α Syn) 단백질은 일반적으로 파킨슨질환 (Parkinson's disease, PD)에 나타나는 병리학적 독성 단백질로 알려져 있지만 AD 상황에서도 축적되어 신경세포 괴사와 함께 인지 기능을 감소시키는 것으로 보고되었다[29]. 이에 본 연구에서도 $AlCl_3$ 처치에 의한 $A\beta$, α Syn, 및 종양괴사인자- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 단백질 수준을 확인한 결과(Fig 3), 집단 간 통계적으로 유의한 차이가 나타나 사후검증을 실시하였다($A\beta$: $F=18.74$, $p=.001$, α Syn: $F=13.30$, $p=.001$,

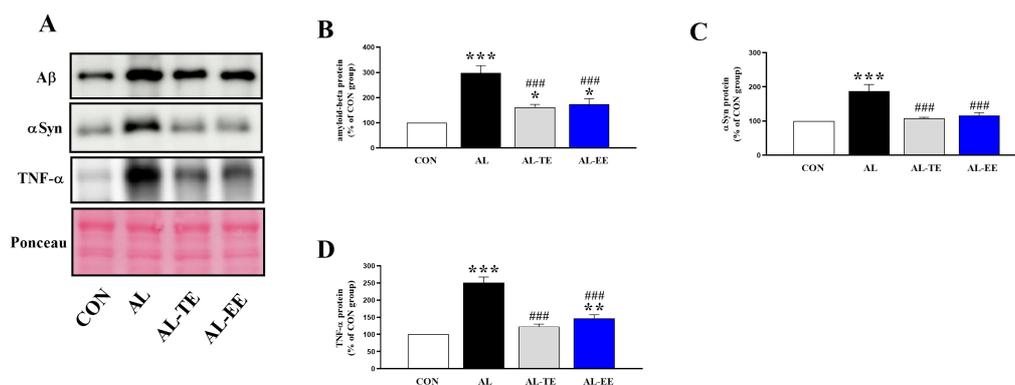


Fig. 3. Treadmill exercise and EE reduces accumulation of the $A\beta$ and α Syn protein induced by $AlCl_3$ treatment in AD mice model.

A) Representative blot of western bands for $A\beta$, α Syn, and TNF α protein in the hippocampus. B-D) Densitometry quantification of the $A\beta$, α Syn, and TNF α protein in the hippocampus. All bars shown represent the means \pm SEM ($n=6$ /group). A least significant difference (LSD) post-doc test: * $p<.05$, ** $p<.01$, *** $p<.001$, compared to the CON group; # $p<.05$, ## $p<.01$, ### $p<.001$ compared to the AL group. CON: control group, AL: $AlCl_3$ treatment group, AL-TE: $AlCl_3$ treatment with treadmill exercise group. AL-EE: $AlCl_3$ treatment with environment enrichment group.

TNF- α : $F=39.58$, $p=.001$). 먼저 CON 집단과 비교하여 $AlCl_3$ 투여한 AL 집단에서 $A\beta$, αSyn 및 TNF- α 수준이 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 나타났다($A\beta$: $p<.001$, αSyn : $p<.001$, TNF- α : $p<.001$, Fig 3B-D). 따라서 $AlCl_3$ 처치가 $A\beta$ 와 αSyn 단백질 발현을 증가시키고 염증반응과 그로 인한 세포 사멸이 활성화된 것으로 추측된다. 한편 트레드밀 운동 혹은 EE 처치는 증가된 $A\beta$, αSyn 및 TNF- α 수준을 통계적으로 유의하게 감소시킨 것으로 나타나 두 방법 모두 독성 단백질의 감소와 염증 반응에 의한 세포사멸을 일부 완화시킨 것으로 판단되며 이는 앞서 제시한 인지기능과 근 기능 감소가 트레드밀 운동과 EE 처치에 의해 회복되는 기전을 일부 뒷받침 할 수 있다. 하지만 아직까지 트레드밀 운동 혹은 EE 처치가 어떠한 기전으로 독성 단백질들의 발현 수준을 조절하는지 정확하게 밝혀져 있지 않다.

3.4. 트레드밀 운동 혹은 EE가 $AlCl_3$ 처치에 따른 밀착연접 단백질 발현에 미치는 영향

최근 AD에서 뇌혈관장벽(Blood-brain barrier: BBB) 구조와 기능에 중요한 밀착연접 단백질

(tight junction proteins) 수준이 감소되어 뇌혈관의 장애가 초래된다고 보고되었다[30, 31]. 특히 Zetterberg 등[32], Hourfar 등[33]은 뇌혈관 밀착연접 단백질의 구조적 손상이 $A\beta$ 단백질 축적과 관련이 있다고 제시하였다. 따라서, 앞서 확인된 것처럼 $AlCl_3$ 투여에 의한 $A\beta$ 단백질 축적이 아마도 밀착연접 단백질의 발현에 영향을 미칠 것으로 추측할 수 있다. 이에 $AlCl_3$ 처치에 의한 밀착연접 단백질인 Occludin, Claudin-5 및 ZO-1 수준을 확인한 결과(Fig 4), 집단 간 통계적으로 유의한 차이가 나타나 사후검증을 실시하였다(Occludin: $F=134.02$, $p=.001$, Claudin-5: $F=4.30$, $p=.017$, ZO-1: $F=14.94$, $p=.001$). 먼저 CON 집단과 비교하여 $AlCl_3$ 투여한 AL 집단에서 Occludin, Claudin-5 및 ZO-1 단백질 수준이 통계적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다(Occludin: $p<.001$, Claudin-5: $p<.01$, ZO-1: $p<.001$, Fig 4B-D). 이는 앞서 제시한 것처럼 $AlCl_3$ 투여에 의한 $A\beta$ 단백질 축적이 밀착연접 단백질의 발현을 감소시킨 것으로 생각된다. 이를 뒷받침하기 위해 $A\beta$ 단백질과 밀착연접 단백질들과의 상관분석을 확인한 결과(Fig 5), Occludin과 ZO-1 단백질 수준이 통계적으로 유

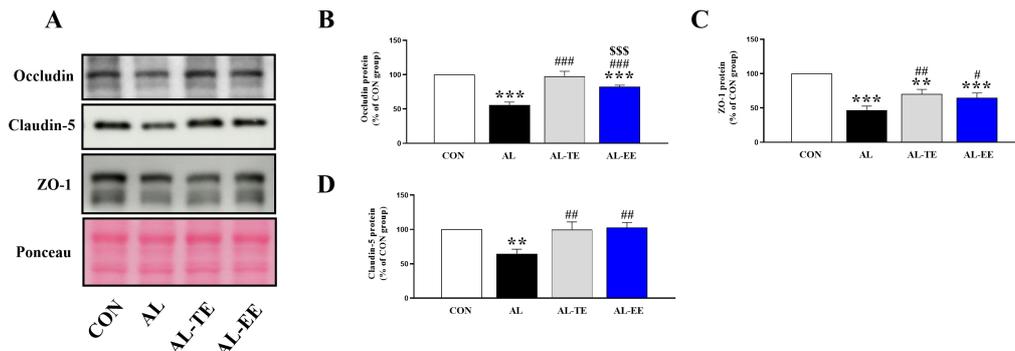


Fig. 4. Treadmill exercise and EE increases the level of Occludin, Claudin-5, and ZO-1 protein in the $AlCl_3$ -induced AD mice model.

A) Representative blot of western bands for Occludin, Claudin-5, and ZO-1 protein in the hippocampus. B) Densitometry quantification of the Occludin, Claudin-5, and ZO-1 protein in the hippocampus. All bars shown represent the means \pm SEM ($n=6$ /group). A least significant difference (LSD) post-doc test: * $p<.05$, ** $p<.01$, *** $p<.001$, compared to the CON group; $p<.05$, ## $p<.01$, ### $p<.001$ compared to the AL group; \$\$\$ $p<.001$ compared to the AL-TE group. CON: control group, AL: $AlCl_3$ treatment group, AL-TE: $AlCl_3$ treatment with treadmill exercise group, AL-EE: $AlCl_3$ treatment with environment enrichment group.

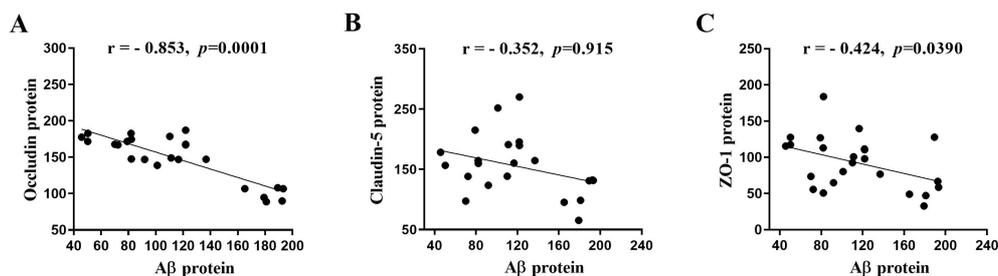


Fig. 5. Correlation analysis of A) Occludin and $A\beta$, B) Claudin-5 and $A\beta$, and C) ZO-1 and $A\beta$.

의하게 부적 상관도를 나타내어 이들 간의 간접적인 인과관계를 확인할 수 있었다(Occludin: $r = -0.853$; ZO-1: $r = -0.424$, $p = 0.0390$). 하지만 $AlCl_3$ 투여에 의한 독성 단백질의 증가와 밀착연접 단백질 수준 간의 직접적인 연관성을 구체적으로 확인하지 못한 채 추후 관련 연구가 필요하다고 생각된다. 흥미롭게도 트레드밀 운동 혹은 EE 처치는 $AlCl_3$ 투여에 의해 감소된 밀착연접 단백질의 수준을 통계적으로 유의하게 증가시킨 것으로 나타나 일부 뇌혈관장벽의 기능과 구조에 긍정적인 영향을 미친 것으로 생각된다. 특히, 트레드밀 운동 혹은 EE 처치에 의한 $A\beta$ 단백질 감소가 밀착연접 단백질 발현의 증가로 기인한 것인지 아니면 $A\beta$ 단백질 감소가 밀착연접 단백질의 수준을 증가시킨 것인지는 분명하지 않다. 하지만 $A\beta$ 단백질 감소와 밀착연접 단백질의 발현 증가는 트레드밀 운동 혹은 EE 처치로 기인한 것으로 생각되며 결과적으로 $AlCl_3$ 투여에 의한 인지 기능과 근 기능 감소를 완화시킨 것으로 해석된다. 특히 EE 처치는 트레드밀 운동과 유사한 결과를 나타내어 향후 AD 모델에서 적용할 수 있는 또 다른 운동의 형태로 제시될 수 있으며 추후 EE와 관련된 신경학적 연구를 통해 구체적으로 확인할 필요성이 있다고 판단된다.

4. 결론

본 연구는 AD 동물 모델을 대상으로 트레드밀 운동과 환경강화(EE) 처치가 인지기능, 근기능 및 뇌혈관 밀착연접 단백질 발현에 미치는 영향을 분석하는데 있으며, 그 결과는 다음과 같다.

90일간의 트레드밀 운동 혹은 환경강화 처치는 $AlCl_3$ 처리에 의한 인지기능과 근기능 저하를 일부 회복시킨 것으로 나타났다. 또한, $AlCl_3$ 처리에 의한 $A\beta$ 단백질, αSyn , 및 $TNF-\alpha$ 발현 증가는 트레드밀 운동 혹은 환경강화 노출에 의해 감소되는 것으로 나타났다. 마지막으로, 트레드밀 운동 혹은 환경강화 처치는 뇌혈관장벽의 구조와 기능에 중요한 밀착연접 단백질의 발현을 증가시키는 것으로 나타났다. 이를 종합해 보면 90일간의 트레드밀 운동 혹은 환경강화 처치는 $AlCl_3$ 투여에 의한 인지기능, 근기능 및 AD 병리학적 특징을 조절하여 결과적으로 AD 질환을 완화시킬 수 있는 운동 방법으로 판단된다. 특히 트레드밀 운동뿐만 아니라 환경강화 처치에 대한 긍정적인 변화 양상은 향후 AD 질병을 완화시킬 수 있는 새로운 운동 형태로 제시될 수 있을 것으로 기대된다.

References

1. Z. Jaunmuktane, S. Mead, M. Ellis, J. D. F. Wadsworth, A. J. Nicoll, J. Kenny, F. Launchbury, J. Linehan, A. Richard-Loendt, A. S. Walker, P. Rudge, J. Collinge, S. Brandner, "Evidence for human transmission of amyloid- β pathology and cerebral amyloid angiopathy", *Nature*, Vol.525, No.7568 pp. 247, 2015.
2. D. J. Selkoe, J. Hardy, "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years", *EMBO Molecular Medicine*, Vol.8,

- No.6 pp. 595–608, (2016).
3. K. Govindpani, L. G. McNamara, N. R. Smith, C. Vinnakota, H. J. Waldvogel, R. L. Faul, A. Kwakowsky, “Vascular Dysfunction in Alzheimer’s Disease: A Prelude to the Pathological Process or a Consequence of It?”, *Journal of clinical medicine*, Vol.8, No.5 pp. 651, (2019).
 4. M. Brkic, et al, S. Balusu, E. V. Wonterghem, N. Gorlé, I. Benilova, A. Kremer, I. V. Hove, L. Moons, B. D. Strooper, S. Kanazir, C. Libert, R. E. Vandenbroucke, “Amyloid β oligomers disrupt blood–CSF barrier integrity by activating matrix metalloproteinases”, *Journal of Neuroscience*, Vol.35, No.37 pp. 12766–12778, (2015).
 5. Y. Chan, W. Chen, W. Wan, Y. Chen, Y. Li, C. Zhang, “A β 1–42 oligomer induces alteration of tight junction scaffold proteins via RAGE-mediated autophagy in bEnd. 3 cells”, *Experimental cell research*, Vol.369, No.2 pp. 266–274, (2018).
 6. E. Frith, P. D. Loprinzi, “Physical activity is associated with higher cognitive function among adults at risk for Alzheimer’s disease. *Complementary therapies in medicine*”, Vol.36, pp. 46–49, (2018).
 7. S. H. Choi, E. Bylykbashi, Z. K. Chatila, S. W. Lee, B. Pulli, G. D. Clemenson, R. E. Tanzi, “Combined adult neurogenesis and BDNF mimic exercise effects on cognition in an Alzheimer’s mouse model”, *Science*, Vol.361, No.6406 eaan8821, (2018).
 8. M. Azimi, R. Gharakhanlou, N. Naghdi, D. Khodadadi, S. Heysiattalab, “Moderate treadmill exercise ameliorates amyloid- β -induced learning and memory impairment, possibly via increasing AMPK activity and up-regulation of the PGC-1 α /FNDC5/BDNF pathway”, *Peptides*, Vol.102, pp. 78–88, (2018).
 9. X. Zhang, Q. He, T. Huang, N. Zhao, F. Liang, B. Xu, X. Chen, T. Li, J. Bi, “Treadmill exercise decreases A β deposition and counteracts cognitive decline in APP/PS1 mice, possibly via hippocampal microglia modifications”, *Frontiers in aging neuroscience*, Vol.11, pp. 78, (2019).
 10. L. Serra, R. Perri, L. Fadda, A. Padovani, S. Lorusso, C. Pettenati, G. A. Carlesimo, “Relationship between cognitive impairment and behavioural disturbances in Alzheimer’s disease patients”, *Behavioural neurology*, Vol.23, No.3 pp. 123–130, (2010).
 11. M. S. Beerli, S. E. Leugrants, O. Delbono, D. A. Bennett, A. S. Buchman, “Sarcopenia is associated with incident Alzheimer’s dementia, mild cognitive impairment, and cognitive decline”, *Journal of the American Geriatrics Society*, Vol.69, No.7 pp. 1826–1835, (2021).
 12. C. M. Yuede, B. F. Timson, J. C. Hettinger, K. M. Yuede, H. M. Edwards, J. E. Lawson, S. D. Zimmerman, J. R. Cirrito, “Interactions between stress and physical activity on Alzheimer’s disease pathology”, *Neurobiology of stress*, Vol.8, pp. 158–171, (2018).
 13. G. P. Cortese, A. Olin, K. O’Riordan, R. Hullinger, C. Burger, “Environmental enrichment improves hippocampal function in aged rats by enhancing learning and memory, LTP, and mGluR5–Homer1c activity”, *Neurobiology of aging*, Vol.63, pp. 1–11, (2018).
 14. Clemenson, GD, Gage FH, Stark CE, *Environmental Enrichment and Neuronal Plasticity*, The Oxford Handbook of Developmental Neural Plasticity, (2018).
 15. Y. Selvi, H. S. Gergerlioglu, N. Akbaba, M. Oz, A. Kandeger, E. A. Demir, F. H. Yerlikaya, K. E. Nurullahoglu–Atalik, “Impact of enriched environment on production of tau, amyloid precursor protein and, amyloid- β peptide in high-fat and high-sucrose-fed rats”, *Acta neuropsychiatrica*, Vol.29, No.5 pp. 291–298, (2017).
 16. H. Xu, M. M. Rajsombath, P. Weikop, D.

- J. Selkoe, "Enriched environment enhances β -adrenergic signaling to prevent microglia inflammation by amyloid β ", *EMBO molecular medicine*, Vol.10, No.9 pp. e8931, (2018).
17. J. Balthazar, N. M. Schöwe, G. C. Cipolli, H. S. Buck, T. A. Viel, "Enriched Environment Significantly Reduced Senile Plaques in a Transgenic Mice Model of Alzheimer's Disease, Improving Memory", *Frontiers in aging neuroscience*, Vol.10, 288, (2018).
18. H. S. Um, E. B. Kang, J. H. Koo, H. T. Kim, E. J. Kim, C. H. Yang, J. Y. Cho, "Treadmill exercise represses neuronal cell death in an aged transgenic mouse model of Alzheimer's disease", *Neuroscience research*, Vol.69, No.2 pp. 161-173, (2011).
19. S. Madiha, Z. Batool, S. Tabassum, L. Liaquat, S. Sadir, T. Perveen, S. Haider, "Therapeutic effects of Curcuma longa against rotenone-induced gross motor skill deficits in rats", *Pakistan Journal of Zoology*, Vol.50, No.4 pp. 1245-1256, (2018).
20. M. Mold, C. Linhart, J. Gómez-Ramírez, A. Villegas-Lanau, C. Exley, "Aluminum and amyloid- β in familial Alzheimer's disease", *Journal of Alzheimer's Disease*, Vol.73, No.4 pp. 1627-1635, (2020).
21. A. M. Elfiky, A. A. Mahmoud, H. A. Elreedy, K. S. Ibrahim, M. A. Ghazy, "Quercetin stimulates the non-amyloidogenic pathway via activation of ADAM10 and ADAM17 gene expression in aluminum chloride-induced Alzheimer's disease rat model", *Life Sciences*, Vol.285, 119964, (2021).
22. J. H. Jeong, D. H. Choi, J. K. Lee, J. Y. Cho, J. H. Jeong, D. H. Choi, J. Y. Cho, "Effect of Endurance Exercise and MitoQ Intake on Tau Hyperphosphorylation, Oxidative Stress, Antioxidant Modulating Factors, Mitochondrial Function, and Cognitive Function in AlCl₃-Induced Alzheimer's Disease Animal Model", *Exercise Science*, Vol.30, No.3 pp. 396-406, (2021).
23. M. Nakano, K. Kubota, S. Hashizume, E. Kobayashi, T. S. Chikenji, Y. Saito, M. Fujimiya, "An enriched environment prevents cognitive impairment in an Alzheimer's disease model by enhancing the secretion of exosomal microRNA-146a from the choroid plexus", *Brain, Behavior, & Immunity-Health*, Vol.9, 100149, (2020).
24. D. Takagi, H. Hirano, Y. Watanabe, A. Edahiro, Y. Ohara, H. Yoshida, S. Hironaka, "Relationship between skeletal muscle mass and swallowing function in patients with Alzheimer's disease", *Geriatrics & Gerontology International*, Vol.17, No.3 pp. 402-409, (2017).
25. Y. Ogawa, Y. Kaneko, T. Sato, S. Shimizu, H. Kanetaka, H. Hanyu, "Sarcopenia and muscle functions at various stages of Alzheimer disease", *Frontiers in neurology*, Vol.9, 710, (2018).
26. C. H. Turkseven, B. Buyukakilli, E. Balli, D. Yetkin, M. E. Erdal, S. G. Yilmaz, L. Sahin, "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*, Vol.184, pp. 47-57, (2017).
27. Y. Zhao, F. Shen, M. Gong, L. Jin, X. Ren, K. Liu, J. Lu, "Lifelong treadmill training improves muscle function detected by a modified grip strength test during aging in BALB/c mice", *Life sciences*, Vol.251, 117603, (2020).
28. Y. Luo, F. Niu, Z. Sun, W. Cao, X. Zhang, D. Guan, Y. Xu, "Altered expression of A β metabolism-associated molecules from d-galactose/AlCl₃ induced mouse brain", *Mechanisms of ageing and development*, Vol.130, No.4 pp. 248-252, (2009).
29. J. B. oledo, P. Gopal, K. Raible, D. J. Irwin, J. Brettschneider, S. edor, J. Q rojanowski, "Pathological α -synuclein

- distribution in subjects with coincident Alzheimer's and Lewy body pathology", *Acta neuropathologica*, Vol.131, pp. 393-409, (2016).
30. M. D. Sweeney, A. P. Sagare, B. V. Zlokovic, "Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders", *Nature Reviews Neurology*, Vol.14, No.3 pp. 133, (2018).
31. Y. Yamazaki, M. Shinohara, M. Shinohara, A. Yamazaki, M. E. Murray, A. M. Liesinger, M. G. Heckman, E. R. Lesser, J. E. Parisi, R. C. Petersen, D. W. Dickson, T. Kanekiyo, G. Bu, "Selective loss of cortical endothelial tight junction proteins during Alzheimer's disease progression", *Brain*, Vol.142, No.4 pp. 1077-1092, (2019).
32. H. Zetterberg, J. M. Schott, "Biomarkers for Alzheimer's disease beyond amyloid and tau", *Nature medicine*, Vol.25, No.2 pp. 201, 2019.
33. H. Hourfar, F. Aliakbari, S. R. Aqdam, Z. Nayeri, H. Bardania, D. E. Otzen, D. Morshedi, "The impact of α -synuclein aggregates on blood-brain barrier integrity in the presence of neurovascular unit cells", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol.229, pp. 305-320, (2023).