

지구성 운동이 NSE/APPsw 알츠하이머 질환 생쥐의 인지능력, A β -42, BDNF, GLUT-1과 HSP-70 단백질 발현에 미치는 영향

엄현섭 · 강은범 · 임예현 · 이종록 · 조인호 · 김영수¹ · 채갑룡² · 황대연⁵ · 박이섭³ · 오유성⁴ · 조준용*

한국체육대학교 체육과학관 운동생화학실, ¹체육과학연구원, ²식약청 독성연구소 실험동물자원실
³동의대학교 체육학과, ⁴서울시립대학교 생활체육학과, ⁵부산대학교 생명응용과학부 바이오소재 전공

Received March 22, 2008 / Accepted May 20, 2008

The Effect of Exercise Training on A β -42, BDNF, GLUT-1 and HSP-70 Proteins in a NSE/ APPsw-transgenic Model for Alzheimer's Disease. Hyun-Sub Eum, Eun-Bum Kang, Yea-Hyun Lim, Jong-Rok Lee, In-Ho Cho, Young-Soo Kim¹, Kab-Ryoung Chae², Dae-Yean Hwang⁵, Yi-Sub Kwak³, Yoo-Sung Oh⁴ and Joon-Yong Cho*. *Exercise Biochemistry Laboratory, Korea National Sport University, ¹Koera Institute of Sport Science, ²Division of Laboratory Animal Resources, and National Institute of Toxicological Research, Korea FDA), ³Department of Physical Education, Dong-Eui University, ⁴Department of Physical Education, Seoul City University, ⁵College of National Resources & Life Science, Pusan National University - Mutations in the APP gene lead to enhanced cleavage by β - and γ -secretase, and increased A β formation, which are closely associated with Alzheimer's disease (AD)-like neuropathological changes. Recent studies have shown that exercise training can ameliorate pathogenic phenotypes (A β -42, BDNF, GLUT-1 and HSP70) in experimental models of Alzheimer's disease. Here, we have used NSE/APPsw transgenic mice to investigate directly whether exercise training ameliorates pathogenic phenotypes within Alzheimer's brains. Sixteen weeks of exercise training resulted in a reduction of A β -42 peptides and also facilitated improvement of cognitive function. Furthermore, GLUT -1 and BDNF proteins produced by exercise training may protect brain neurons by inducing the concomitant expression of genes that encode proteins (HSP-70) which suppress stress induced neuron cell damages from APPsw transgenic mice. Thus, the improved cognitive function by exercise training may be mechanistically linked to a reduction of A β -42 peptides, possibly via activation of BDNF, GLUT-1, and HSP-70 proteins. On the basis of the evidences presented in this study, exercise training may represent a practical therapeutic management strategy for human subjects suffering from Alzheimer's disease.*

Key words : Alzheimer's disease (AD), amyloid β -42 (A β -42), heat shock protein-70 (HSP-70), glucose transporter-1 (GLUT-1), brain derived neurotropic factor (BDNF), endurance exercise training

서 론

알츠하이머 질환은 노년층에서 흔히 발생하는 신경퇴행성 질환으로 한국의 경우, 노인 인구 증가에 따라 2020년 까지 65세 이상 노인 인구의 약 8.3%인 62만 명이 알츠하이머 환자가 될 것으로 추정하고 있다[1]. 알츠하이머 질환은 노령 인구에서 뿐만 아니라 30~60세 사이에서도 상염색체성우성형 (autosomal dominant form)으로 발생하여 사회문제로 대두되고 있으며 발병기전도 명확하게 규명되지 않은 상태이다.

알츠하이머 질환은 점진적인 기억상실로 인한 치매를 유도하여 결국 사망에 이르도록 하는 신경퇴행성질환으로 2가지 병리적인 병변이 환자 뇌의 변연기관인 대뇌피질과 해마에서 나타나는데 하나는 과인산화된 세포골격 단백질인 tau 단백질이 세포내에 형성되는 신경섬유원 농축(neurofibrillary tan-

gle)이고 다른 하나는 세포외에 침적되어 노인성 반점(senile plaque)을 형성하는 39~43개의 아미노산 잔기로 구성된 β -amyloid이다[20].

알츠하이머 질환은 유전적 결함 혹은 다양한 유전적 위험요인들에 의해서 발생하는데 조기 유발 상염색체성우성형 알츠하이머 질환을 유도하는 3가지 유전자 중 APP (amyloid precursor protein) 유전자는 염색체 21번에 위치해 아밀로이드 전구 단백질을 암호화하는 유전자로 조직, 근육 및 상피세포와 같은 말초조직에서도 발현되며 이 유전자의 돌연변이와 과발현은 세포 독성물질인 A β (amyloid- β) 생성을 증가시키는데 특히, A β -42가 상대적으로 증가되어 조기유발 상염색체성우성형 알츠하이머 질환(early-onset, autosomal dominant familial alzheimer)을 일으킨다[28]. 이외에 염색체 14번에 위치한 PS-1 (presenilin-1)과 염색체 1번에 위치한 PS-2 (presenilin-2) 유전자의 돌연변이는 조기유발 상염색체성우성형 알츠하이머 질환 발생 사례의 약 50% 이상을 차지하며 20~65세 이전의 청·장년층에서 발병하는 기질로 밝혀졌다[24].

이와 같이, APP, PS-1과 PS-2 유전자의 돌연변이에 의해

*Corresponding author

Tel : +82-2-410-6867, Fax : +82-2-410-6700

E-mail : chojy86@knsu.ac.kr

뇌에 침적된 Aβ-42에 의해 인지적 능력 감소[21], 뇌 신경세포 사[7]와 당대사에 문제[14]가 발생하며 신경세포의 생존에 있어 필수 요소인 뇌신경증식인자(brain derived neurotrophic factor, BDNF)와 혈액 내 장벽(blood brain barrier)을 통해 글루코스 수송을 담당하는 포도당 수송체-1(glucose transporter-1, GLUT-1)의 발현량이 해마와 대뇌피질에서 현저하게 감소되는 것으로 보고되고 있다[6,11,13-15]. 특히 알츠하이머 질환은 열충격 단백질(heat shock protein, HSP-70)과 글루코스 조절 단백질(glucose regulated protein, GRP-78)의 비정상적인 기능과 함께 단백질 입체구조의 변화에 의해 대뇌피질에 Aβ-42가 침적되어 신경세포사를 유발한다[32]. 이러한 선행연구들의 결과를 근거로 분자생물학자와 병리·신경생리학자들은 알츠하이머 질환의 발병을 감소시키기 위해 약물(tacrine, donepezil, rivastigmine, galantamine)을 사용하여 뇌에서 Aβ-42의 형성을 예방하거나 지연시키려고 노력해 왔는데 그 효과는 일시적이거나 부정적인 것으로 보고되고 있다.

최근에는 뇌 손상과 신경퇴행성 질환들(파킨슨씨 질환, 우울증, 알츠하이머 질환)에 대해 운동이 신경보호효과를 가지고 있다는 결과들이 여러 연구들[2,9]에서 증명되면서 관심이 높아지고 있다. 지구성 운동은 뇌세포에 혈액순환을 통한 원활한 산소와 영양 물질 공급과 노폐물 및 탄산가스 제거율을 높여 우울증, 불안 및 신경 긴장성을 감소시키고 인지 능력을 향상시킨다고 보고되고 있다[8]. 특히, Cho 등[5]과 Adlard 등[2]은 알츠하이머 질환 모델생쥐(PS-2, TgCRND8)를 활용하여 지구성 운동을 수행시킨 결과 뇌와 골격근에서 Aβ-42 단백질이 현저하게 감소하고 인지 능력이 개선되었다고 보고하였으며 Wolf 등[29]은 알츠하이머 질환 모델생쥐 (APP23)를 대상으로 운동시킨 결과 뇌의 Aβ-42 단백질 감소와 함께 인지능력이 향상되었다고 보고하였다. Nichol 등[23]도 Tg2576 알츠하이머 질환 모델생쥐를 대상으로 운동시킨 결과 인지능력이 향상되었다고 보고하였다. 이러한 선행 연구들은 신체활동 혹은 운동이 알츠하이머 질환의 주병변인 Aβ-42의 형성을 예방하거나 지연시키고 인지 능력을 개선시키는데 효과가 있음을 제시하고 있다.

그러나 알츠하이머 질환의 증후인 뇌(해마, 대뇌피질)의 Aβ-42 단백질의 침적이 신경퇴행성 질환의 병리적 분자표현형 단백질들인 BDNF, GLUT-1과 HSP-70의 기능 감소와 관련성이 있는지는 명확하게 규명되지 않은 상태이며 특히 이 연구에서 활용한 APPsw 알츠하이머 질환 모델생쥐에게서 발생하는지와 함께 지구성 운동이 알츠하이머 질환 관련 이들 병리적 분자표현형 단백질들에 미치는 영향에 관한 연구는 부족한 상태이다. 따라서 이 연구는 APPsw 돌연변이(mutants)를 neuron-specific enolase (NSE) 유전자의 프로모터 조절 하에 연결시킨 융합 유전자(pNSE/hAPPsw fusion gene)를 가진 알츠하이머 질환 모델생쥐를 대상으로 16주간 지구성 운동이 인지능력 개선 및 알츠하이머 질환의 주병변

인 Aβ-42 단백질을 포함해 병리적 관련 분자 표현형 단백질인 BDNF, GLUT-1과 HSP-70 발현에 미치는 영향을 분석하는데 목적이 있다.

재료 및 방법

실험 동물

이 연구에서 활용한 알츠하이머 질환 모델동물은 식약청 국립독성 연구소 실험 동물 자원실에서 생산된 12개월 된 수컷 pNSE/hAPPsw 알츠하이머 질환 모델생쥐(Tg: n=10)와 동일한 어미의 같은 배에서 출생한 수컷 비 형질전환 생쥐(non-Tg: n=10)를 제공받아 활용하였으며 집단은 non-Tg 비교집단(n=5, 23.44±1.20 g), non-Tg 운동집단(n=5, 23.82±1.16 g), 알츠하이머 질환 모델생쥐(Tg) 비교집단(n=5, 24.72±1.40 g)과 알츠하이머 질환 모델생쥐(Tg) 운동집단(n=5, 23.38±0.28 g), 4집단으로 구분하였다.

운동 프로그램의 구성

알츠하이머 질환 모델생쥐(Tg)와 비형질전환생쥐(non-Tg)를 대상으로 rodent 트레드밀(8Lanes, Dae-myung Scientific Co, Ltd, Korea)을 이용하여 지구성 운동을 시키기 위해 1주일 정도 사전적응 훈련(20분 동안 15 cm/sec, 주 7일)을 실시하였으며 본 실험에서는 알츠하이머 질환 모델생쥐의 운동 수행능력을 고려하여 Cho 등[5]의 운동 프로그램을 근거로 수정하여 실온(22~24°C)에서 주 5일 16주간 실시하였다. 운동 프로토콜은 Table 1과 같다.

수중 미로 검사(Water maze test)

12개월 된 hAPPsw 알츠하이머 질환 모델생쥐와 동일 연령의 non-Tg 생쥐를 대상으로 인지 능력의 변화를 알아보기 위해 수중 미로 검사를 실시하였다. 수중 미로 검사는 창문과 공기가 잘 통하고 실험 테이블이 준비된 실험실에서 실시하였다. 장비로는 원형수조(지름 150 cm×높이 12 cm)안에 표적(target)이 보이지 않도록 하기 위해 수조 안에 물(22~25°C)을 받아 전지분유를 풀어 넣어 용해시킨 후 물표면 바로 1 cm 정도 떨어진 수조바닥에 표적(지름 12 cm)을 놓는다. 이들 실험모델동물들의 수영거리(escape distance), 수영속도(escape velocity), 수영시간(escape latency)과 수영유형(swimming

Table 1. Exercise protocol

	Velocity (cm/sec)	Time (min)
0~3 wk	20	30
4~6 wk	22	35
7~9 wk	22	45
10~13 wk	24	50
14~16 wk	22	45

pattern)을 수조 바로 위 천정에 설치 연결된 컴퓨터 프로그램인 SMART-CS 프로그램(Panlab, Barcelona, Spain)을 활용하여 실험처치 전과 16주 실험처치 후 2회 측정·분석하였다. 수중 미로 검사는 각 회씩 주 5일 동안 실시하였으며 매일 같은 위치에서 출발하여 3회씩 동물이 동일한 위치에 놓인 표적에 도달하도록 연습시킨 후 마지막 6일째 표적을 없앤 후 동일한 출발 위치에서 수영을 시작하여 3회 표적에 도달한 결과를 실험결과 값으로 활용하는데 이때, 실험결과 값으로 60초 이내에 생쥐가 숨겨진 표적을 찾을 경우에만 활용하였다. 각 검사 실시간에 최소한 5분간의 간격을 두었다.

뇌 적출

실험모델동물은 16주간 실험처치 24시간 후 pentobarbital (0.4 mg/g)을 이용하여 희생시켜 뇌 조직을 적출하여 무게를 측정하고 PBS로 충분히 세척한 후 액화질소에 냉동시켜 분석 시까지 -70°C 의 초 냉동기에 보관하였다. 뇌 조직은 Western blot 분석을 위해 저울(balance Ly-200, Ymato, Japan)로 측정하여 자른 다음 lysis buffer [0.1 M K phosphate/0.5 M EDTA (pH 7.2), 냉장보관] 1 ml을 넣어 얼음 속에서 조직을 균질화(homogenizer, PYREX 7725~16, Corning, USA)하였다. 균질화 된 조직은 미리 얼음에 채워 둔 1.5 ml microtube에 넣고 4°C 원심분리기(microcentrifuge VS-15000CF, Vision Scientific Co. Bio-Rad, USA)를 이용하여 15,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 상층액을 취하여 단백질을 얻었다.

SDS-PAGE

10%와 16.5% separating gel (30% acrylamide: bisacrylamide, 1.5 M tris pH 8.8, 10% SDS, TEMED, 10% ammonium persulfate)과 5% stacking gel (30% acrylamide: bisacrylamide, 1 M tris pH 6.8, 10% SDS, TEMED, 10% ammonium persulfate)을 만들어 사용하였다. 원심분리(15,000 rpm, 20분)한 상층액과 SDS loading buffer (60 mM tris pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercapto ethanol, 0.1% Bromophenol Blue를 잘 혼합한 후 100°C 에서 10분간 끓여 단백질을 변성시킨 후 식혀서 다시 15,000 rpm으로 20분간, 4°C 에서 원심분리하였다. Standard marker (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Bio-Rad)와 함께 각 샘플을 Mini-Protein II dual-slab apparatus (Bio-Rad, USA)에 준비된 stacking gel well과 동일한 총 단백질량(50 μg)이 되도록 분주한 후 80 volt에서 2시간 정도 샘플이 바닥에 닿을 때까지 전기 영동하였다.

Western blot analysis

Transfer buffer (190 mM glycine, 50 mM Tris-base, 0.05% SDS, 20% methanol)에 적신 PVDF membrane (Immuno Blot

PVDF membrane, Bio-Rad, CA, USA), Whatman 3M paper, 전기영동한 젤, PVDF membrane을 차례로 겹쳐 Mini trans-blot cell (Bio-Rad, CA, USA)에 장치한 후 40 volt로 2시간 전사시켰다. Membrane으로 증착이 끝나면 shaker platform 위에서 1시간 동안 membrane을 5% skim milk 용액(in TNT: 10 mM Tris-base pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20)으로 blocking시켰다. 1차 항체인 anti-BDNF (Santa Cruz Biotechnology, sc-546, CA, USA), anti-GLUT-1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-7903, CA, USA), anti-HSP70 (Santa Cruz Biotechnology, sc-24, CA, USA)와 anti-A β -42 (Chemicon, MAB1561, MS, USA)는 1:1,000으로 blocking (5% skim milk) 용액으로 각각 희석시켜 1시간 반 동안 흔들어 주고 난 다음 TNT 용액으로 10분씩 3차례 세척한 후 2차 항체(horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit ZYMED, 65-6120, CA, USA; horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse, Santa Cruz Biotechnology, sc-2005, CA, USA)를 Blocking 용액으로 1:3,000으로 희석시켜 1시간 동안 흔들어 주고 난 다음 TNT 용액으로 10분씩 3차례 세척하였다. 마지막 단계로 ECL substrate 용액(Santa Cruz, Biotechnology, USA)에 membrane을 넣고 5분간 발색시키고 얻어진 membrane을 Bio-Rad ChemiDoc XRS 시스템을 활용하여 A β -42, BDNF, GLUT-1과 HSP-70 단백질량을 산출하였으며 총 단백질량은 BSA (bovine serum albumin, 570 nm)를 이용하여 정량하였다.

자료 처리 방법

이 연구에서 얻어진 모든 자료는 윈도우용 11.0 SPSS 통계 프로그램을 이용하여 기술 통계치(mean \pm SD)를 산출하였다. 실험처치 전 APPsw 알츠하이머 질환 모델생쥐와 non-Tg의 인지능력[유영거리(escape distance), 유영속도(escape velocity), 유영시간(escape latency)]의 차이를 검증하기 위하여 독립 t-검증(independent t-test)을 실시하였으며 16주간 실험처치 후 인지능력의 개선 효과가있는지를 검증하기 위해 일원 변량분석을 실시하였으며 분석결과 유의한 차이가 있을 경우 LSD (least significant difference)검증을 실시하였다. 나머지 분자표현형 단백질의 경우 운동집단(non-Tg와 Tg)간 및 조건(운동수행여부)간에 따른 차이가 있는지를 검증하기 위해 이원변량분석(집단 \times 운동수행여부)을 실시하였으며 상호작용 효과가 있을 경우 그 차이를 구체적으로 확인하기 위하여 독립 t-검증을 실시하였다. 이때, 가설 수락기준은 $\alpha=0.05$ 로 설정하였다.

결 과

인지 능력의 변화

12개월 된 APPsw 알츠하이머 질환 모델생쥐(Tg)의 인지

능력을 확인하기 위해 수중 미로 검사를 실시한 결과 Fig. 1. (A, B)에서 보는 바와 같이 APP^{sw} 알츠하이머 질환 모델생쥐 집단(33.92±1.03 sec)이 non-Tg 집단(17.92±2.02 sec)에 비해 유영시간이 훨씬 더 긴 것으로 나타났으며($t=7.031$, $p<0.001$) 유영거리도 Tg 집단(645.58±27.33 cm)이 non-Tg 집단(44.35±48.91 cm)보다 더 긴 것으로 나타나 집단 간에 유의한 차이($t=3.591$, $p<0.001$)가 있는 것으로 나타났다. 반면 유영속도에서는 집단 간에 차이가 없는 것으로 나타났다. 결과

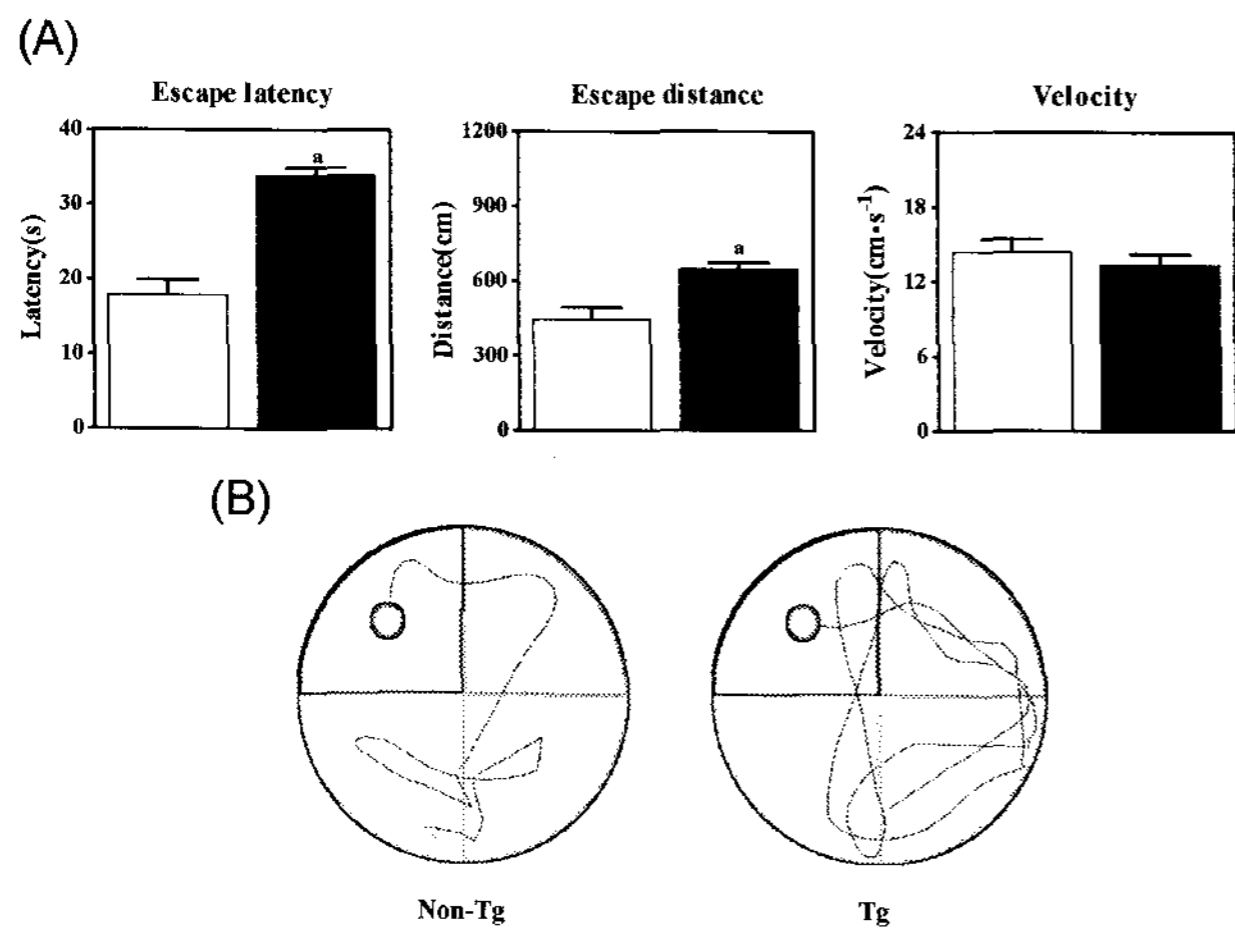


Fig. 1. Water maze test. (A) Patterns of the escape latency, escape distance, and swimming velocity to cross to the former platform location in the water maze. (B) Patterns of swimming. Values are means±SD. ^a $p<0.05$; ^b $p<0.01$; ^c $p<0.001$ vs. non-Tg sedentary control group.

적으로 Tg의 경우 알츠하이머 질환 특성인 인지 능력의 보이는 것으로 나타났다.

Fig. 1. (A, B)에서 확인된 바와 같이 인지 능력의 결함을 보이는 Tg 생쥐와 non-Tg 생쥐를 대상으로 16주간 지구성 운동의 효과를 분석하기 위해 변량분석을 실시한 결과, Fig. 2. (A, B)에서 보는 바와 같이 집단 간에 유영시간($F=17.821$, $p<0.001$), 유영거리($F=5.891$, $p<0.001$)와 유영속도($F=10.046$, $p<0.001$)에서 각각 차이가 있는 것으로 나타나 사후 검증을 실시한 결과, 유영거리(escape distance)의 경우 non-Tg 비교 집단과 non-Tg 운동집단 간에는 차이가 없는 반면 Tg 비교 집단은 non-Tg 비교집단과 non-Tg 운동집단과 각각 $p<0.001$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났다. Tg 운동집단은 Tg 비교집단과 $p<0.001$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났다. 유영속도(escape velocity)의 경우 non-Tg 운동집단은 non-Tg 비교집단과 Tg 비교집단과 각각 $p<0.01$ 과 $p<0.001$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났으며 Tg 비교집단은 non-Tg 운동집단과 Tg 운동집단과 각각 $p<0.05$ 와 $p<0.001$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났다. 마지막으로 유영시간(escape latency)의 경우 non-Tg 비교집단과 non-Tg 운동 집단 간에는 차이가 없는 반면 Tg 비교집단은 non-Tg 비교 집단, non-Tg 운동집단 및 Tg 운동집단과 각각 $p<0.001$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났다.

Aβ-42, BDNF, GLUT-1, HSP-70 단백질 발현 변화

Tg 집단과 non-Tg 집단을 대상으로 16주간 지구성 운동이 알츠하이머 질환의 주 병변인 뇌의 Aβ-42와 병리적 분자

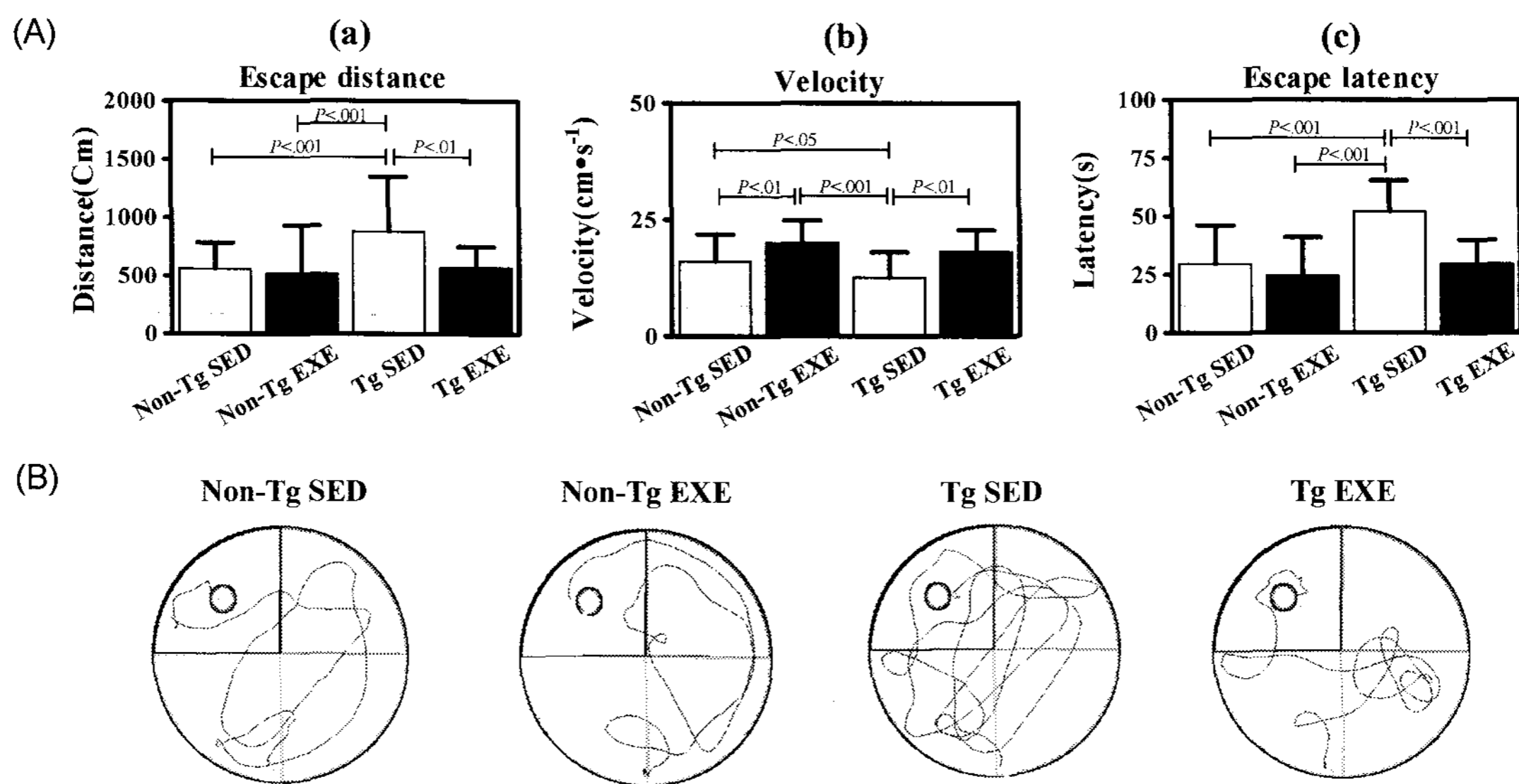


Fig. 2. Water maze tests. Patterns of escape latency, escape distance and swimming velocity to cross to the former platform location in the water maze (A, B). APP^{sw} transgenic mice showed a significantly different trends toward distance (a), velocity (b) and escape latency (c) upon exercise training. Swimming patterns show a significant difference between exercise-trained and sedentary control mice on the crossing of former platform location. Mean±SD of three trials in water maze for five mice in each of the transgenic and non-transgenic subgroups are shown.

표현형 단백질인 BDNF, GLUT-1과 HSP-70 단백질 발현량에 미치는 영향을 변량 분석한 결과 Fig. 3. (A)에서 보는 바와 같이 A β -42 단백질 발현량의 경우 상호 작용 효과 ($F=0.121, p<0.01$)가 있는 것으로 나타나 사후 검증한 결과, non-Tg 비교집단은 Tg 비교집단과 $p<0.01$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났으며 non-Tg 운동집단과 Tg 비교집단 간에도 $p<0.001$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났다. 또한 Tg 비교집단과 Tg 운동집단 간에도 $p<0.01$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났다. Fig. 3. (B)에서 보는 바와 같이 BDNF 단백질 발현량의 경우 상호 작용 효과 ($F=56.294, p<0.001$)가 있는 것으로 나타나 사후 검증한 결과 non-Tg 비교집단과 non-Tg 운동집단 간에 $p<0.001$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났으며 non-Tg 비교집단은 Tg 운동집단과 $p<0.001$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났다. 또한 non-Tg 운동집단은 Tg 비교집단과 $p<0.05$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났으며 Tg 비교집단과 Tg 운동집단 간에는 $p<0.001$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났다.

Fig. 3. (C)에서 보는 바와 같이 GLUT-1 단백질 발현량의 경우 상호 작용 효과 ($F=0.751, p<0.001$)가 있는 것으로 나타나 사후 검증한 결과 non-Tg 비교집단은 non-Tg 운동집단, Tg

비교집단 간에 각각 $p<0.01, p<0.05$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났으며 non-Tg 운동집단과 Tg 비교집단은 $p<0.001$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났다. Tg 운동집단과 Tg 비교집단은 $p<0.001$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났다. Fig. 3. (D)에서 보는 바와 같이 HSP-70 단백질 발현량도 집단 간에 차이 ($F=11.910, p<0.001$)가 있는 것으로 나타나 사후 검증한 결과 non-Tg 비교집단은 non-Tg 운동집단, Tg 비교집단과 각각 $p<0.001$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났으며 non-Tg 운동집단은 Tg 비교집단과 $p<0.001$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났다. Tg 운동집단은 Tg 비교집단과 $p<0.001$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났다.

혈청 글루코스와 인슐린 수준의 변화

16주간 지구성 운동이 혈청 글루코스와 인슐린 수준에 미치는 영향을 변량 분석한 결과, Fig. 4. (A)에서 보는 바와 같이 혈청 글루코스 수준의 경우 상호 작용 효과가 없는 것으로 나타나 주 효과를 검증한 결과 집단 간에 차이 ($F=30.569, p<0.01$)가 있는 것으로 나타났으며 운동수행 여부 간에도 차이 ($F=21.958, p<0.01$)가 있는 것으로 나타났다. Fig. 4(B)에서 보는 바와 같이 인슐린 수준의 경우 상호 작용 효과 ($F=14.092, p<0.01$)가 있는 것으로 나타나 사후 검증한 결과, non-Tg 비교집단은 Tg 비교집단과 $p<0.01$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났으며 non-Tg 운동집단은 Tg 비교집단과 $p<0.01$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났다. 마지막으로 Tg 비교집단은 Tg 운동집단은 $p<0.01$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났다.

고찰

알츠하이머 질환을 예방하거나 치료하기 위한 방법들이 의학 및 생명과학 분야에서 연구되어 왔지만 그 효과는 일시

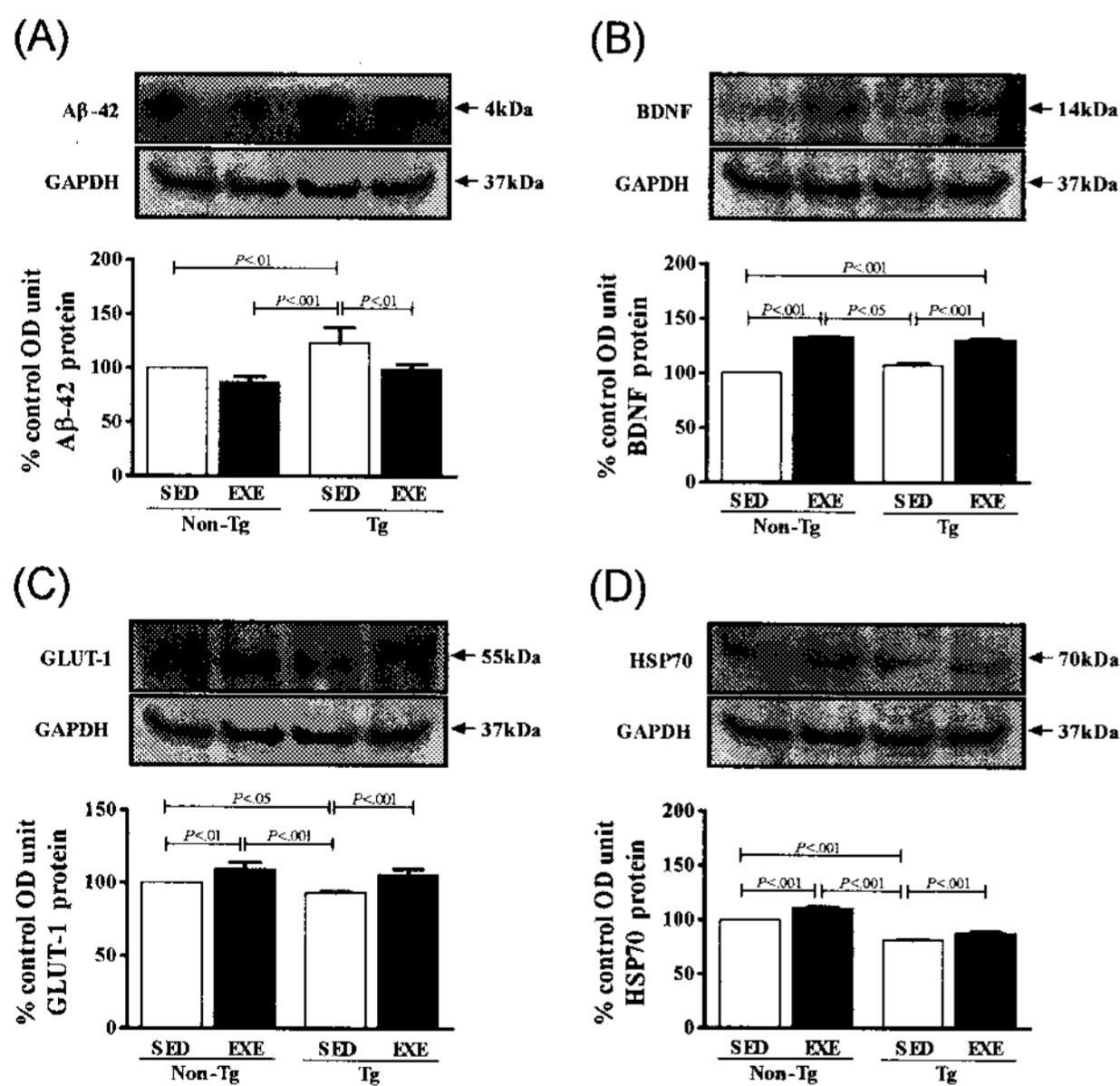


Fig. 3. The effect of exercise training on A β -42, BDNF, GLUT-1 and HSP-70 proteins in the brain of APPsw transgenic mice. Levels of A β -42, BDNF, GLUT-1 and HSP-70 proteins in the brain were analyzed by Western blot. Exercise-trained non-Tg and Tg mice show a significant decreases in levels of A β -42 (A). Exercise-trained non-Tg and Tg mice show a significant increase in levels of BDNF, GLUT-1 and HSP-70 proteins (B, C, D). Five mice per non-Tg and Tg from each groups were assayed in triplicate on Western blot analysis. Values are mean \pm SD.

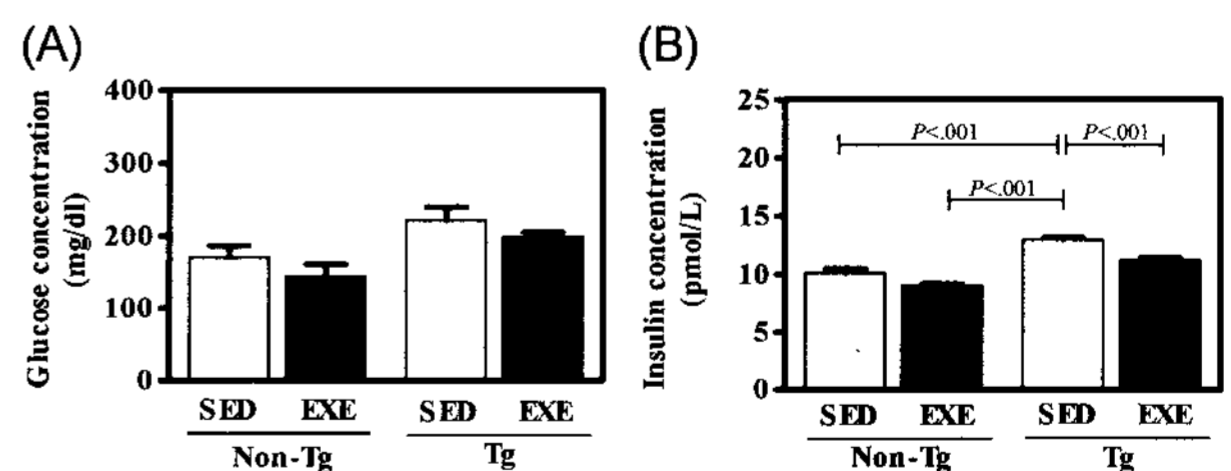


Fig. 4. Effects of serum biochemical profile as it relates to glucose metabolism in the EXE and SED groups. Blood was collected from the abdominal vein of the mice, and the serum level of glucose (A) was then analyzed using a serum biochemical analyzer. In addition, the insulin concentrations (B) were measured using the ultra-sensitive assay procedure and reagents in the Insulin ELISA kit. Five mice were assayed in triplicate. Values shown represent the mean \pm SD.

적이거나 부정적인 것으로 보고되고 있다. 특히 약물이 아닌 신체활동을 통한 알츠하이머 질환의 뇌 신경세포 보호 작용은 규명되지 않은 상태이다. 따라서 이 연구는 알츠하이머 질환 특성을 보이는 APPsw 알츠하이머 질환 모델 생쥐(Tg)를 활용하여 16주간 지구성 운동이 인지능력과 알츠하이머 질환 관련 뇌의 분자 표현형 단백질들에 미치는 영향을 분석하였다. 먼저 이 연구에서는 APPsw를 neuron-specific enolase (NSE) 유전자의 프로모터 조절 하에 연결시켜 생산된 알츠하이머 질환 모델 생쥐를 대상으로 수중 미로 검사를 실시한 결과 인지 능력에 결함이 있다는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 볼 때 이 질환모델 생쥐의 뇌 조직에서 APPsw 유전자의 발현은 알츠하이머 질환의 특성인 인지 능력의 결함과 관련성이 높다는 것을 알 수 있다.

이러한 인지 능력의 결함을 보이는 Tg를 대상으로 16주간 지구성 운동을 수행시킨 결과 인지능력이 향상된 것으로 나타났다. 이러한 결과는 알츠하이머 질환 모델생쥐(PS-2, TgCRND8, APP-23)를 대상으로 지구성 운동을 수행시킨 결과 인지능력이 향상되었다고 보고한[2,5,29] 결과와 일치하는 것으로 나타났다.

이와 같이 지구성 운동을 통한 Tg의 인지 능력의 개선은 지구성 운동수행에 의해 뇌세포에 혈액을 통한 산소와 영양물질의 공급이 잘 이루어진 반면 노폐물 및 탄산가스 제거율이 높아진 현상과 새로운 뇌신경 세포의 생성 증가에 따른 기억력의 향상 및 뇌의 신경 전달 물질의 증가에 기인한 것으로 볼 수 있으며 특히, A β -42 단백질 발현량 감소와 직접적인 관련이 있는 것으로 볼 수 있다[3,22,26,28]. 즉 지구성 운동에 의해 아밀로이드전구단백질(amyloid precursor protein) 분해 과정이 조절되거나 혹은 A β 분해율과 제거율이 증가되어 해마와 대뇌피질에 A β 단백질 침적이 감소되어 나타난 결과로 볼 수 있다[2,3,20]. 또한 알츠하이머 질환에서 공통적으로 나타나는 대표적인 증후는 뇌신경 세포 외에 A β -42 단백질 침적에 의한 플라크 형성 및 신경 섬유원 농축이 형성되어 세포사멸을 유도하는 것으로 이러한 뇌에 A β -42 침적은 인지능력의 감소와 관련성이 높은 것으로 나타났다. 이 연구에서도 Tg 생쥐의 경우 non-Tg 생쥐에 비해 A β -42 단백질 발현량이 상당히 높은 것으로 나타나 아밀로이드 전구 단백질(amyloid precursor protein; APP) 유전자를 돌연변이시켜 생산한 알츠하이머질환 모델 생쥐에게서 A β -42의 침적이 약 15배정도 높았으며 아울러 인지능력의 결함을 보였다는 Hsiao 등[16]의 결과와 일치하는 것으로 나타났다.

반면 16주간 지구성 운동을 수행시킨 결과 non-Tg 집단과 Tg 집단 모두 현저하게 A β -42 단백질 발현량이 감소한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Adlard 등[2]과 Cho 등[5]의 결과와 일치하는 것으로 이러한 운동수행에 따른 A β -42 단백질 발현량의 감소는 앞서 설명했듯이 지구성 운동수행에 의해 뇌 세포에 혈액을 통한 산소와 영양물질의 공급이 잘 이

루어지거나 아니면 노폐물 및 탄산가스 제거율이 높아져 나타난 현상[3]으로 볼 수 있으며 특히 지구성 운동에 의해 아밀로이드 전구 단백질의 생성과정 혹은 A β 분해와 제거율이 조절되거나 증가되어 해마나 대뇌피질에서 A β 플라크 침적이 감소[2,19]되어 나타난 것으로 볼 수 있다.

이와 같이, APP 유전자의 돌연변이에 의한 뇌 A β -42 단백질 발현량 증가는 인지적 능력 감소[17], 뇌 신경세포사[7]와 당대사에 문제[14]를 유발하며 신경세포의 생존에 있어 필수요소인 뇌신경증식인자(brain derived neurotrophic factor; BDNF)와 혈액 내 장벽(blood brain barrier)를 통해 글루코스 수송을 담당하는 포도당 수송체-1(glucose transporter-1, GLUT-1)의 발현량이 해마와 대뇌피질에서 현저하게 감소되는 것으로 보고되고 있다[6,7,11,13-15]. 이 연구에서는 Tg 집단과 non-Tg 집단 간에 뇌신경증식인자(brain derived neurotrophic factor; BDNF) 단백질 발현량에는 차이가 없는 것으로 나타나 Wolf 등[29]의 결과와 일치하는 것으로 나타났다.

이와 같이 Tg 비교집단이 non-Tg 비교집단에 비해 BDNF 단백질 발현량이 현저하게 낮은 수준을 보일 것이라 생각되었으나 차이가 없는 것으로 나타났다. 이러한 원인에 대해서는 명확하게 설명할 수 없어 후속 연구를 통해 이 연구에서 활용한 APPsw 형질전환 생쥐의 BDNF 단백질 표현형을 다시 분석·연구할 필요가 있다. 그러나 non-Tg와 Tg 집단 모두 16주간 지구성 운동수행에 의해서는 현저하게 증가한 것으로 나타났다. 이러한 BDNF 단백질 발현량의 증가는 지구성 운동 자체가 신경전달시스템, 신경내분비 시스템, 인슐린 유사 성장인자-1(insulin like growth factor-1), 혈관내피성장인자(endothelial derived growth factor)를 활성화시켜 나타난 현상으로 볼 수 있는데 Cotman과 Berchtold [8], Russo-Neustadt 등[25]과 Ding 등[10]의 결과가 뒷받침해 주고 있다.

알츠하이머 환자의 뇌세포는 에너지 대사 관련 효소들(사이토크롬 c 산화효소, 피르브산 탈수소효소)의 활성도의 감소와 비정상적인 APP 대사에 의해 생성된 A β -42 단백질 침적에 의해 인슐린의 인슐린 수용체에 대한 결합력이 감소하여 비정상적인 인슐린 신호전달이 유발되어 대뇌의 글루코스 활용능력이 급격하게 감소한다[4,12,30]. 특히 해마 부위에 A β -42 단백질 침적 뿐만 아니라 GLUT-1 단백질 발현량이 현저하게 감소되어 있다[14].

이 연구에서도 Tg 비교집단이 non-Tg 비교집단에 비해 GLUT-1 단백질의 발현량이 감소된 것으로 나타났으며 이러한 감소에 대한 기전은 명확하게 알려져 있지 않지만 Hooijmans 등[14]와 Xie 등[30]이 제시한 것처럼 뇌의 A β -42 단백질 침적, 뇌 모세혈관 밀도 감소 및 비정상적인 인슐린 신호전달 시스템에 의해 발생한 것으로 볼 수 있다. 이러한 GLUT-1 단백질 감소는 인지 능력 감소에도 영향을 미친다. 반면 지구성 운동 수행에 의해 non-Tg와 Tg 집단 모두 GLUT-1 단백질 발현량이 증가하였는데 특히 Tg 운동집단의

경우 Tg 비교집단에 비해 증가한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 뇌의 A β -42 단백질 발현량 감소와 함께 인슐린의 민감도가 개선되어 효율적인 인슐린 신호전달이 유발되어 대뇌의 글루코스 활용 능력이 개선되어 나타난 현상으로 볼 수 있는데 이 연구에 제시된 혈청 인슐린과 글루코스 수준의 감소가 그 결과를 뒷받침해 주고 있다.

알츠하이머 질환의 주병변인 A β -42 단백질의 침적을 억제하는데 있어 중요한 역할을 하는 샤페론들 중 하나인 HSP-70은 A β -42의 침적을 프로티아좀(proteasome)의 의존적 방법에 의해 분해시키는 것으로 알려져 있어 이 단백질의 발현 감소는 알츠하이머 질환과 관련이 있는 신경세포사멸을 초래한다[18,31]. 반면 장기간 지구성 운동에 의해서는 운동에 대한 적응 결과로 HSP-70의 발현량이 증가되어 열이나 혹은 다른 조직의 손상으로부터 세포를 보호한다고 보고되고 있다[21].

이 연구에서 HSP-70 단백질의 발현량은 non-Tg 비교집단에 비해 Tg 비교집단이 낮은 것으로 나타나 알츠하이머 질환일 경우 HSP-70 단백질군의 발현량이 감소되어 있다는 Yoo 등[32]의 결과와 일치하는 것으로 나타났다. 이와 같이 Tg 비교집단이 non-Tg 비교집단에 비해 HSP-70 단백질 발현량이 낮은 이유는 A β -42의 침적으로 인해 분자 샤페론들(HSP-70, HSC 71, GRP-75, 78)의 비정상적인 단백질 입체구조의 변화가 발생하여 나타난 현상으로 분자 샤페론으로서 세포 보호 작용이 감소됨을 의미한다. 반면 non-Tg와 Tg 운동집단의 경우 16주간 운동 후 뇌에서 HSP-70의 발현량이 현저하게 증가하였는데 이러한 결과는 반복적인 운동 수행의 적응 결과로 나타난 현상으로 Tg의 경우 알츠하이머 질환으로 인한 세포사멸로부터 뇌세포를 보호한다는 것으로 의미한다. 즉 규칙적인 지구성이 단백질들의 잘못 접힘(misfolding)과 응집 현상을 억제함으로써 신경세포의 보호 효과가 있음을 추론할 수 있다. 그러나 이러한 결과를 보다 확실하게 규명하기 위해서는 세포사멸과 항산화효소 관련 단백질들과 비교 분석하는 후속 연구가 필요하다.

결론적으로 지구성 운동은 APPsw 알츠하이머 질환 모델 생쥐의 인지 능력을 개선시키는데 긍정적인 영향을 미친 것으로 나타났으며 이러한 인지능력의 개선은 알츠하이머 질환의 주 병변인 뇌의 A β -42 감소뿐만 아니라 BDNF, GLUT-1과 HSP-70 단백질의 발현 증가와 관련이 있음을 확인하였다. 따라서 지구성 운동은 약물 처치 이외에 알츠하이머 질환을 예방하거나 지연시킬 수 있는 전략적인 방법으로 활용할 수 있음을 알 수 있다.

요 약

알츠하이머 질환은 신경퇴행성질환으로 노령인구에서 뿐만 아니라 30~60세 사이에서도 상염색체성우성형으로 발생

하여 사회문제로 대두되고 있으며 발병기전도 명확하게 규명되지 않은 상태이다. 따라서 이 연구에서는 hAPP695sw 돌연변이를 neuron-specific enolase (NSE) 유전자의 프로모터 조절 하에 연결시킨 융합 유전자(pNSE/APP695sw fusion gene)를 과 발현시킨 알츠하이머 질환 모델생쥐를 대상으로 16주간 지구성 운동에 따른 알츠하이머 질환 모델생쥐의 인지능력의 변화와 주병변인 A β -42 단백질과 함께 GLUT-1, BDNF, HSP-70 단백질의 발현량을 분석하였다. 그 결과 지구성 운동은 APPsw 알츠하이머 질환 모델생쥐의 인지능력을 개선시키는데 긍정적인 영향을 미친 것으로 나타났으며 이러한 인지능력의 개선은 알츠하이머 질환의 주 병변인 뇌의 A β -42 감소뿐만 아니라 BDNF, GLUT-1과 HSP-70 단백질의 발현 증가와 관련이 있음을 확인하였다. 따라서 지구성 운동은 약물 처치 이외에 알츠하이머 질환을 예방하거나 지연시킬 수 있는 전략적인 방법으로 활용할 수 있음을 알 수 있다.

감사의 글

이 논문은 2007년도 국민체육진흥공단 체육과학연구원의 체육학술진흥사업비(KISS-07-A06006)에 의하여 연구되었습니다. 이에 깊이 감사드립니다.

References

1. Korea Institute and Social Affairs, 2007.
2. Adlard, P. A., V. M. Perreau, V. Pop and C. W. Cotman. 2005. Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **25**, 4217-4221.
3. Black, J. E., K. R. Isaacs and W. T. Greenough. 1991. Usual vs. successful aging: some notes on experiential factors. *Neurobiol. Aging* **12**, 325-328.
4. Blass, J. P. 2001. Brain metabolism and brain disease: is metabolic deficiency the proximate cause of Alzheimer dementia? *J. Neurosci. Res.* **66**, 851-856.
5. Cho, J. Y., D. Y. Hwang, T. S. Kang, D. H. Shin, J. H. Hwang, C. H. Lim, S. H. Lee, H. J. Lim, S. H. Min, S. J. Seo, Y. S. Song, K. T. Nam, K. S. Lee, J. S. Cho and Y. K. Kim. 2003. Use of NSE/PS2m-transgenic mice in the study of the protective effect of exercise on Alzheimer's disease. *J. Sports Sci.* **21**, 943-951.
6. Choeiri, C., W. Staines and C. Messier. 2002. Immunohistochemical localization and quantification of glucose transporters in the mouse brain. *Neuroscience* **111**, 19-34.
7. Chong, Z. Z., F. Li and K. Maiese. 2005. Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Prog. Neurobiol.* **75**, 207-246.
8. Cotman, C. W. and N. C. Berchtold. 2002. Exercise: a be-

- havioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* **25**, 295-301.
9. Cotman, C. W., N. C. Berchtold and L. A. Christie. 2007. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci.* **30**, 464-472.
 10. Ding, Y. H., J. Li, Y. Zhou, J. A. Rafols, J. C. Clark and Y. Ding. 2006. Cerebral angiogenesis and expression of angiogenic factors in aging rats after exercise. *Curr. Neurovasc. Res.* **3**, 15-23.
 11. Farkas, E. and P. G. Luiten. 2001. Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* **64**, 575-611.
 12. Hager, K., A. Marahrens, M. Kenklies, P. Riederer and G. Munch. 2001. Alpha-lipoic acid as a new treatment option for Alzheimer type dementia. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **32**, 275-282.
 13. Hock, C., K. Heese, C. Hulette, C. Rosenberg and U. Otten. 2000. Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas. *Arch. Neurol.* **57**, 846-851.
 14. Hooijmans, C. R., C. Graven, P. J. Dederen, H. Tanila, T. van Groen and A. J. Kiliaan. 2007. Amyloid beta deposition is related to decreased glucose transporter-1 levels and hippocampal atrophy in brains of aged APP/PS1 mice. *Brain Res.* **1181**, 93-103.
 15. Horwood, N. and D. C. Davies. 1994. Immunolabelling of hippocampal microvessel glucose transporter protein is reduced in Alzheimer's disease. *Virchows Arch.* **425**, 69-72.
 16. Hsiao, K., P. Chapman, S. Nilsen, C. Eckman, Y. Harigaya, S. Younkin, F. Yang and G. Cole. 1996. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* **274**, 99-102.
 17. Hwang, D. Y., J. S. Cho, S. H. Lee, K. R. Chae, H. J. Lim, S. H. Min, S. J. Seo, Y. S. Song, C. W. Song, S. G. Paik, Y. Y. Sheen and Y. K. Kim. 2004. Aberrant expressions of pathogenic phenotype in Alzheimer's diseased transgenic mice carrying NSE-controlled APPsw. *Exp. Neurol.* **186**, 20-32.
 18. Kumar, P., R. K. Ambasta, V. Veereshwarayya, K. M. Rosen, K. S. Kosik, H. Band, R. Mestrlil, C. Patterson and H. W. Querfurth. 2007. CHIP and HSPs interact with beta-APP in a proteasome-dependent manner and influence Abeta metabolism. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 848-864.
 19. Lazarov, O., J. Robinson, Y. P. Tang, I. S. Hairston, Z. Korade-Mirnic, V. M. Lee, L. B. Hersh, R. M. Sapolsky, K. Mirnic and S. S. Sisodia. 2005. Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell* **120**, 701-713.
 20. Lee, V. M. and J. Q. Trojanowski. 1992. The disordered neuronal cytoskeleton in Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2**, 653-656.
 21. Melling, C. W., D. B. Thorp, K. J. Milne, M. P. Krause and E. G. Noble. 2007. Exercise-mediated regulation of Hsp70 expression following aerobic exercise training. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H3692-3698.
 22. Neeper, S. A., F. Gomez-Pinilla, J. Choi and C. W. Cotman. 1996. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res.* **726**, 49-56.
 23. Nichol, K. E., A. I. Parachikova and C. W. Cotman. 2007. Three weeks of running wheel exposure improves cognitive performance in the aged Tg2576 mouse. *Behav. Brain Res.* **184**, 124-132.
 24. Rogaev, E. I., R. Sherrington, E. A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, Y. Liang, H. Chi, C. Lin, K. Holman, T. Tsuda. 1995. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* **376**, 775-778.
 25. Russo-Neustadt, A. A., H. Alejandre, C. Garcia, A. S. Ivy and M. J. Chen. 2004. Hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression following treatment with reboxetine, citalopram, and physical exercise. *Neuropsychopharmacology* **29**, 2189-2199.
 26. Spirduso, W. W. 1983. Exercise and the Aging Brain. (The 1982 CH McCloy Research Lecture), pp. 208-218.
 27. Tanzi, R. E., D. M. Kovacs, T. W. Kim, R. D. Moir, S. Y. Guenette and W. Wasco, 1996. The gene defects responsible for familial Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* **3**, 159-168.
 28. van Praag, H., G. Kempermann and F. H. Gage. 1999. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* **2**, 266-270.
 29. Wolf, S. A., G. Kronenberg, K. Lehmann, A. Blankenship, R. Overall, M. Staufenbiel and G. Kempermann. 2006. Cognitive and physical activity differently modulate disease progression in the amyloid precursor protein (APP)-23 model of Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry.* **60**, 1314-1323.
 30. Xie, L., E. Helmerhorst, K. Taddei, B. Plewright, W. van Bronswijk and R. Martins. 2002. Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *J. Neurosci.* **22**, RC221.
 31. Yenari, M. A., J. Liu, Z. Zheng, Z. S. Vexler, J. E. Lee and R. G. Giffard. 2005. Antiapoptotic and anti-inflammatory mechanisms of heat-shock protein protection. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1053**, 74-83.
 32. Yoo, B. C., S. H. Kim, N. Cairns, M. Fountoulakis and G. Lubec. 2001. Deranged expression of molecular chaperones in brains of patients with Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 249-258.