

# The Effect of Exercise Intensity on Changes in Neuronal Nitric Oxide Synthase Expression in the Hippocampus and Cerebral Cortex of Obese Mice

Kyung-Wan Baek\*

Division of Sport Science, Pusan National University, Busandaehak-ro 63, Guemjeong-gu, Busan 46241, Korea

Received September 19, 2018 / Revised November 13, 2018 / Accepted November 26, 2018

Recent studies reported that obesity upregulated the expression of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and regulated particular behavior patterns in animal models. They also reported that ameliorated the increase in nNOS expression and decreased depression and anxiolytic effects. Thus, exercise seems to be an effective strategy for improving brain function by downregulating nNOS. However, the immune response differs greatly, depending on the exercise intensity. The aim of the present study was to investigate differences in brain nNOS expression in obese C57BL/6 mice that performed exercise of different intensities. Obesity was induced in 6-wks-old mice ( $n=35$ ) by feeding a 60%-fat diet for 6-wks. A control (CON) group ( $n=14$ ) was fed a normal diet. At the end of the induction 6-wks period of obesity, seven animals in the CON group and obesity-induced group were sacrificed to confirm obesity induction (preliminary experiments and confirmation of visceral fat accumulation). The remaining animals were then used in an 8-wks exercise intervention. Other than the CON ( $n=7$ ), the obesity-induced animals were divided into the following groups: high-fat diet (HFD,  $n=7$ ), HFD-low intensity (HFD-LI,  $n=7$ , 12 m/min for 75 min), HFD-moderate intensity (HFD-MI,  $n=7$ , 15 m/min for 60 min), and HFD-high intensity (HFD-HI,  $n=7$ , 18 m/min for 50 min). The exercise was performed on an animal treadmill. The expression of the nNOS protein in the hippocampus was significantly higher in the HFD group as compared with that in the CON group ( $p<0.01$ ). However, there was no difference in the hippocampal expression of the nNOS protein in the other exercise groups as compared with that in the CON group. In contrast, nNOS expression in the HFD-HI group was significantly lower than that in the HFD-LI group ( $p<0.05$ ). The expression of phosphorylated Akt (pAkt) was significantly higher in all the exercise groups as compared with that in the CON and HFD groups. There was no difference in the expression of pAkt in the cerebral cortex among groups, and the expression of pAkt in the cerebellum was significantly higher in the HFD-HI group as compared with that in the CON group ( $p<0.05$ ). There were also no between-group differences in pAkt expression in the cerebellum among the various exercise groups. In conclusion, nNOS seems to be overexpressed in response to obesity, and it appears to be downregulated by exercise. Relatively high-intensity exercise may be effective in improving brain function by downregulating nNOS.

**Key words** : Brain, cerebral cortex, hippocampus, nitric oxide, obesity

## 서 론

비만은 유병률은 빠르게 증가하고 있으며 전 세계적으로 비만 및 과체중 인구가 21억명에 도달했다는 충격적인 연구결과가 보고되고 있다[35]. 근본적으로 과도한 영양섭취와 신체 활동량의 부족이 비만의 주요 원인이며 골격근의 인슐린 저항성을 야기하여 제2형 당뇨병의 원인이 되기도 한다[2]. 비만과 포도당 대사에 관련된 대부분의 연구는 지방조직이나 골격근

에 초점이 맞추어져 있다[5, 6, 26, 37]. 하지만 최근의 많은 연구들에서 비만은 뇌에도 악영향을 미친다는 사실을 보고하고 있다. 인구역학적 연구들은 서구화된 식습관의 섭취 또는 높은 체중 모두 작은 해마 부피와 관련되어 있음을 보여주고 있다[16, 22]. 또한 고지방식이(high-fat diet, HFD)에 대한 노출과 인지능력 손상 사이에 강한 연관성이 있다고 보고 하기도 하였으며[23], 우울증과 불안과 같은 정신적 장애를 유발할 수 있다고 보고되었다[23]. 동물 연구에 의하면 HFD로 인한 비만은 뇌유래신경영양인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 발현과 신경 발생을 감소시키고 해마에서 염증을 증가시킨다는 사실을 확인하였다[23, 31, 34, 39]. 이러한 결과는 HFD 또는 서구화된 식이와 관련된 우울증 및 불안과 같은 정신 장애가 뇌, 특히 해마의 퇴행에 의해 유발 될 수 있음을 의미한다.

산화질소(nitric oxide, NO)는 뇌의 신경 전달 물질로 작용

### \*Corresponding author

Tel : +82-51-510-8020, Fax : +82-51-980-0872

E-mail : baekpnu@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

한다[10]. NO는 전구체인 L-아르기닌(L-arginine)에 의한 세가지의 동형(isoform) NO 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)로부터 합성된다. 세가지 NO 합성효소는 신경세포형 산화질소 합성효소(neuronal NOS, nNOS), 유도성 산화질소 합성효소(inducible NOS, iNOS) 그리고 내피세포형 산화질소 합성효소(endothelial NOS, eNOS)로 구분된다. 성인 사람의 뇌에서 nNOS는 중추 신경계에서 NOS의 주요 이성체(isomer)이다[11, 48]. nNOS는 뉴런에서 최초로 발견된 칼슘/칼모둘린-의존형 효소이다[33]. 또한 신경세포의 시냅스 가소성 및 신호전달과 관련된 신경활성을 촉진하고 뇌의 혈류량의 변화를 유발하는 것으로 보고 되었다[3]. 간단히 말해 정상적인 상태에서의 nNOS는 신경조직에서 NO를 생성하고 세포 간 통신기능이 있다. 하지만 병리학적인 상태에서의 nNOS는 신경독소로서 작용할 수 있다. nNOS의 과발현과 관련된 설치류 대상 연구에서 nNOS의 약리학적 선택적 억제제는 해마의 신경 발생을 증가시키고[50] 공간 기억을 향상시키며[4] 공격성을 억제하였다[20]. 따라서 병리학적인 상태에서 과발현된 nNOS의 억제는 긍정적인 효과를 나타내었다. 또한 많은 연구들에서 뇌의 nNOS를 감소시키면 우울증이나 불안 같은 정서적 행동을 조절할 수 있다고 보고하였다[17, 20, 47]. 그리고 최근의 연구에서 마우스로 일반환경과 비교하여 운동을 실시할 수 있는 트레드밀과 스트레스를 풀고 놀이를 할 수 있는 터널 등의 사육 케이지에 제공하고 장기간 사육한 결과 실제로 nNOS가 일반환경에서 노화되었을 때 풍족한 환경에서 자란 마우스에 비해 과발현 되는 것으로 나타났고 행동 테스트를 실시하였을 때 스트레스로 인한 우울관련 행동 데이터가 나타났다[44].

운동은 많은 건강상의 이점을 가지고 있다. 일반적으로 비만을 개선시킬 수 있고 골격근에서의 포도당 항상성을 유지하는데 도움을 줄 수 있는 것으로 알려져 있다. 고령자를 대상으로 한 연구에서 운동은 해마의 크기를 증가시키고 해마 의존성 학습과 기억을 향상시킨다는 것을 보여주었다[18]. 설치류에서 운동은 해마의 BDNF를 증가시키고 해마의 신경 발생을 향상시키는 것으로 나타났다[28, 43]. 또한 설치류에서 자발적인 운동 수행이 가능한 풍부한 사육 환경을 제공하였을 때 노화에 의해 유발된 nNOS 발현 증가를 억제하였으며 정서적 불안을 완화하는 효과가 있었다[45]. 하지만 앞서 언급한 바와 같이 뇌에서 과도한 NO가 신경 독소로 작용할 수 있다고 제안되기도 하였다[1]. 이러한 결과들은 운동이 해마의 nNOS 발현 수준을 조절하는 것과 nNOS/NO 경로의 유지에 중요하다는 것을 나타낸다는 것을 의미한다. NO는 BDNF의 수준 변화를 조절하는 인자로 작용할 수도 있다. 비선택적 NOS 억제제인 L-NAME의 투여가 CREB의 활성화를 감소시키는 것으로 나타났다[38], 운동에 의해 유도된 BDNF mRNA 발현은 NO 생산과 관련이 있는 것으로 보여진다[15]. nNOS의 운동에 의한 조절 경로는 아직 알려지지 않은 부분이 많지만 운동에 의한

산화 환원 항상성이 조절 경로에서 중요한 역할을 하는 것으로 생각되고 있다.

HFD의 섭취와 과도한 체중의 증가는 해마의 기능 저하 및 위축을 유도한다[30]. 이러한 변화는 우울증이나 불안 같은 정신적인 장애와 관련이 깊다. 운동은 비만을 개선시키고 뇌의 건강을 향상시킨다. 또한 nNOS가 정서적 행동의 중요한 조절인자이며, 뇌의 nNOS가 증가하면 불안감이 유발되는 반면 뇌의 nNOS를 감소시키는 환경적인 요소는 항불안 효과를 유발한다. 이와 관련하여 최근 nNOS에 관련하여 이에 HFD와 운동이 미치는 영향을 확인한 연구가 수행되었다[45]. 연구에 의하면 12주간의 HFD 섭취는 해마 및 대뇌 피질의 nNOS 단백질 수준을 증가시켰으며 체지방과 장간막의 지방량을 증가시켰다. 이러한 변화를 확인한 후 6주간의 운동을 실시하였다. 운동은 HFD를 섭취함에도 불구하고 체지방을 감소시키고 해마 및 대뇌피질의 nNOS 발현 수준을 낮추었다고 보고 하였다. 이러한 결과는 HFD에 의하여 유발된 뇌의 기능적 장애가 해마 또는 대뇌피질의 nNOS에 의해 조절될 수 있으며, 운동은 nNOS/NO 경로를 통하여 HFD에 의해 유발된 우울증 및 불안 치료를 위한 치료법이 될 수 있음을 시사하였다. 운동은 HFD 섭취와 관련하여 비만과 뇌 기능저하를 개선하고 일반식이를 섭취하는 좌식 마우스의 경우와 비교하여 인산화된 CREB의 비율을 증가시켰다. 여기서 해마의 cAMP 반응 요소 결합단백질(CREB)의 인산화는 nNOS의 항불안 효과에 필수적이다[49]. 그리고 NO의 생성은 protein kinase B (Akt)에 의해 인산화된 AKT (pAkt, serine 473)이 효소를 활성화시키고 NO를 활성화시키는 것으로 알려져 있다[19]. 이러한 인산화는 nNOS 기능을 NO 생산으로 조절하는 중요한 메커니즘으로 고려되어야 된다고 보고되었다[25]. 따라서 NO의 기능적 역할과 더불어 Akt와 이의 인산화는 매우 중요한 역할을 하기 때문에 nNOS의 발현과 함께 측정되어야 할 것이다.

앞서 언급한 여러 연구들은 비만과 운동 그리고 nNOS와 cAMP 인산화와 관련하여 의미있는 연구들이다. 하지만 비만인에게 뇌의 건강과 정서적인 문제들을 해결하기 위해 운동을 추천하기 위한 가이드라인을 제시하기 위해서는 좀 더 많은 연구가 이루어져야 한다. 운동은 비만을 줄이기 위한 효과적인 전략이지만 비만에 운동을 처방하기 위해서는 다양한 요인들이 고려되어야 한다. 특히, 낮은 강도의 운동은 에너지 소모량이 낮아 효과가 떨어질 수 있으며 반대로 높은 강도의 운동은 부상의 위험이 상존하여 실제적으로 운동을 처방하기가 힘든 경우가 있다. 또한 여러 연구에서 과도한 운동은 스트레스로 작용하여 오히려 면역력을 약화시키는 것으로 알려져 있다[21, 36]. 따라서 운동을 처방하기 위하여 강도의 제시는 가장 필수적인 요소이다. 해마의 nNOS 발현에 관한 최근의 연구에서는 운동군에게만 자발적인 쳇바퀴 운동이 가능한 환경을 설정하여 운동군에서의 유의하게 높은 활동과 에너지소모가 있었던 것으로 보이니 이를 수치화 하지는 못하여 운동

량이나 운동강도에 따른 효과를 비교할 수 없었다[45].

따라서 본 연구자는 비만 마우스를 대상으로 nNOS의 발현이 운동강도에 따라 차이가 있을 것이라는 가설을 세웠다. 본 연구의 목적은 HFD가 공급된 비만 마우스에서 운동량을 동일하게 설정한 후에 각기 다른 강도의 운동을 동물용 트레드밀에서 수행하여 운동강도가 해마의 nNOS 발현 수준에 미치는 영향을 조사하는데 있다.

### 재료 및 방법

#### 실험동물

본 연구에서는 42마리의 6주령의 수컷 C57BL/6NHsd (Kotech, Gyeonggi-do, Korea) 마우스를 분양받아 사용하였다. 동물은 자동 항온 및 항습 그리고 12시간 자동 명암주기 시스템이 설치된 동물실험실에서 사육되었다. 또한 식이와 음수는 자유식이(*ad libitum*)로 공급되었다. 본 연구는 부산대학교 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호:PNU-2017-1669)을 받아 실시되었다.

#### 고지방식이와 운동수행

1주일 간의 적응기간을 거친 후 일반식이 집단(n=14)과 고지방식이(HFD-fed) 집단(n=35)로 나누어 사육하였다. 6주 동안 일반식이 집단은 일반사료(Harlan Teklad, #2018S, Blackthorn, Bicester, UK; 탄수화물 58%, 지방 18%, 단백질 24%)를 공급받아 사육되었고, HFD-fed 집단은 고지방사료(Research Diets Inc., #D12492, NJ, USA; 탄수화물 20%, 지방 60%, 단백질 20%)를 섭취하여 비만이 유도되었다. 6주 동안의 비만유도 기간 후 일반식이 집단과 HFD-fed 집단 각 7마리씩 희생하여 분석에 이용되었다. 희생되지 않은 나머지 실험동물(n=35)은

8주 동안의 중재를 실시하였다. 일반식이 집단 중 희생되지 않은 나머지 실험동물은 대조군(CON, n=7)으로 설정하였으며, 실험종료시까지 일반식이를 섭취하였다. HFD-fed 집단 중 희생되지 않은 나머지 실험동물은 실험종료시까지 HFD를 섭취하면서 운동을 실시하지 않은 고지방대조군(HFD, n=7)과 운동강도에 따라 저강도운동군(HFD-LI, n=7), 중강도운동군(HFD-MI, n=7) 그리고 고강도운동군(HFD-HI, n=7)으로 분류되었다(Fig. 1). 모든 강도별 운동훈련 실시 동물들은 동물용 트레드밀(DJ-344; Daejong Instrument Industry, Daejeon, Korea)에서 운동을 수행하였다. 마우스의 운동강도는 대체적으로 12-20 m/min의 속도로 1시간 가량 수행된다. 본 연구에 사용된 실험동물은 젖산역치를 통한 임계속도 추정 연구에서 약 18.7 m/min의 임계속도를 가지는 것으로 확인되었다[7]. 따라서 그 이상의 속도는 운동 수행자체가 어려울 것으로 예상되었으며, 예비실험을 통하여 15 m/min의 강도는 비만이 유도된 실험동물이 동물용 트레드밀에서 뒤편치지 않으면서 1시간 가량 운동을 충실히 수행할 수 있는 운동강도로 확인하고 중강도의 운동강도(속도)로 설정하였다. 따라서 본 연구에서 설정된 중강도의 운동을 기준으로 HFD-MI가 15 m/min의 속도로 60분 수행하는 운동이 총 900미터(meter)의 운동량(거리)을 가지므로, HFD-LI는 12 m/min의 속도로 75서는 분 그리고 HFD-HI는 18 m/min의 속도로 50분 운동을 수행하여 운동량을 동일하게 통제하였다. 운동강도의 설정은 이전에 수행되었던 운동강도 차이에 의한 대식세포 분화 연구의 트레드밀 운동강도 설정을 참고하였다[5]. 본 연구에서 구별되는 저강도, 중강도 그리고 고강도의 운동은 강도에 따른 운동의 효과의 차이를 확인하고자 하는 것이지 객관적이고 절대적인 운동강도를 의미하는 것은 아니다. 따라서 강도는 같고 무리하지 않는 범위 내에서 약간의 속도차이가 있는 것으로 생각하면 이해가 쉬울 것으로 생각된다. 저강도 운동의 경우 전혀 뒤편치지 않고 오히려 트레드밀 속도보다 빠르게 움직일 수 있는 정도의 속도이며, 중강도 운동은 약간 무리없게 트레드밀과 충분히 맞추어 달릴 수 있는 속도였다. 그리고 고강도의 운동은 한번씩 뒤편지기도 하지만 운동강도에 반비례하여 짧게 운동을 수행을 하였기 때문에 결과적으로 크게 무리는 없었고 설정된 운동강도 사이에 운동량의 차이는 없었다. 체중 및 에너지효율은 일주일 간격으로 측정되었다.

#### 실험 조직 채취

6주간의 비만유도 이후와 14주간의 모든 실험이 종료된 후 모든 실험동물은 단두대를 이용하여 최소한의 고통으로 희생되었다. 잘려진 귀의 두개골을 열어 해마, 대뇌피질 및 소뇌를 신속하게 분리하여 액체질소로 급속동결 시켰다. 이후 분석에 이용하기 전까지 모든 조직은 -80℃의 초저온냉동고에 보관하였다.

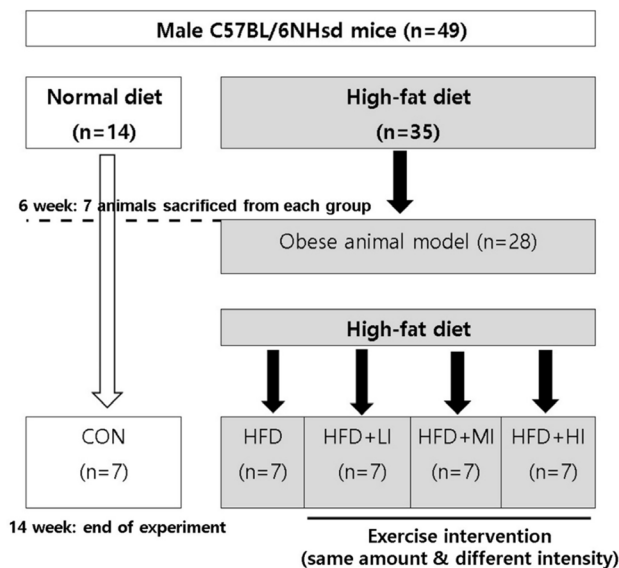


Fig. 1. Experimental design.

### 단백질 발현 분석

Tomiga와 그의 동료들이 수행한 이전 연구를 참고하여 단백질 발현을 분석 하였다[45]. 뇌 조직의 각 부분에서 nNOS, Akt 및 인산화(phosphorylation)된 Akt<sup>ser473</sup> (pAkt<sup>ser473</sup>)의 단백질 수준을 평가하기 위하여 western blotting을 수행하였다. 실험에 사용된 단백질은 각각의 조직을 따로 분리하고 프로테아제 억제제 혼합액(Abcam, Cambridge, MA, USA)이 포함된 1X immunoprecipitation assay (RIPA) buffer를 이용하여 조직을 용해시킨 후 4°C에서 13,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액에서 얻었다. 총 단백질량은 Bradford법으로 정량하였다. 각 샘플의 단백질(각 10 µg)을 7.5% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel) 상에서 200 V에서 35분간 PVDF (polyvinylidene fluoride; Milipore, MA, USA) membrane에 semi-dry법으로 transfer 하였다. Transfer가 완료된 membrane은 1시간 동안 실온에서 3% skim-milk로 blocking 한 다음, 1차 항체인 anti-nNOS (1:500; BD Biosciences, San Jose, CA, USA), anti-Akt (1:1,000; Cell Signaling, Beverly, MA, USA), anti-pAkt<sup>ser473</sup> (1:2,000; Cell Signaling, Beverly, MA, USA) 그리고 anti-GAPDH (1:50,000; Acris Antibodies, Herford, Germany) 항체를 넣고 4°C에서 10시간 반응(overnight) 시켰다. 이후 2차 항체인 horse-radish peroxidase-conjugated anti-mouse 또는 anti-rabbit IgG 항체 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)로 1시간 실온에 반응시켰다. 이후 암실에서 membrane에 enhanced chemiluminescence reagent (Bionote, Hwaseong, Korea)로 1분간 반응시킨 후 cassette에 넣고 투명 필름을 포겐 후 다시 X-ray 필름(Ortho CP-G Plus film, Agfa-Gevaert NV, Belgium)을 포개어 감광 시켰다. 형광에 노출된 X-ray 필름은 developer 용액과 fixer 용액으로 현상하여 밴드를 확인하였다. 현상된 밴드는 FluorChem HD2 (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA)를 이용하여 분석되었다. nNOS 발현 수준은 GAPDH 수준에 대비하여 결정되었고 CON으로 표준화(normalization) 하였다. pAkt<sup>ser473</sup> 발현 수준은 Akt에 대한 상대적 값으로 결정되었다.

### 유전자 발현

소뇌 및 피질 조직을 구슬 균질기(TissueLyser LT, Qiagen, Germany)를 이용하여 균질화 하였다. 해마의 유전자 발현은 해마를 수집하는데 소요된 시간이 5분 이상 경과하여 상당한 RNA 분해가 일어날 가능성이 높아 분석되지 않았다. 각 조직은 Maxwell® 16 LEV System (Promega, Tokyo, Japan) 를 사용하여 RNA를 추출하였다. 유전자 발현 분석을 위하여 quantitative real-time RT-PCR을 수행하였다. TaqMan gene Expression Assay probe를 사용하여 Step One Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)에서 nNOS (Nos1-Mm00435175\_m1)의 mRNA 수준에서의 발현이

분석되었다. nNOS의 mRNA 수준은 GAPDH (Gapdh-Mm99999915\_g1)으로 표준화하고  $\Delta\Delta Ct$  방법을 사용하여 정량화 하였다[32].

### 통계분석

모든 데이터는 평균±표준편차로 표시되었다. 모든 통계분석은 SPSS version 22 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 사용하여 수행되었다. 이원반복분산분석(Two-way repeated-measures ANOVA)과 Bonferonni의 사후분석법(post hoc test)을 수행하여 각 그룹 간의 체중과 식이효율을 분석하였다. nNOS 단백질의 발현과 유전자 발현 수준의 그룹 간 차이 및 pAkt<sup>ser473</sup>의 수준은 one-way ANOVA와 Bonferonni의 사후분석법을 사용하여 평가되었다. 통계적 차이가  $p < 0.05$  일 때 그 차이가 유의한 것으로 간주하였다.

## 결 과

### 체중 및 식이효율

전체 실험 기간 동안의 체중변화와 식이효율을 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2A의 최종 체중에서는 CON군과 나머지 그룹 간에 유의한 차이가 있었다( $p < 0.001$ ). 6주간의 HFD를 통한 체중의 변화는 일반식이군과 고지방식이(HFD-fed)군 사이에 2주부터 유의차( $p < 0.001$ )가 나타나기 시작하여 운동중재 시작 전까지 그 차이가 유지되었다(Fig. 2B). 운동중재를 시작한 후 1주차(실험시작 7주차)부터 HFD-MI군이 HFD군에 비하여 유의하게 체중이 유의하게 낮게 나타났다( $p < 0.05$ ). 또한 중재시작 3주차(실험시작 9주차)에 그 유의차가 가장 크게 나타났다( $p < 0.001$ ). 하지만 중재시작 6주차부터 유의차가 없었고 실험 종료시에는 체중의 그룹간에 체중의 차이가 나타나지 않았다(Fig. 2C). CON군과 나머지 그룹간에 식이효율에서 유의차가 나타났으나( $p < 0.001$ ), 나머지 그룹 사이에는 차이가 없었다(Fig. 2D).

### 뇌의 부위별 nNOS의 발현과 pAkt<sup>Ser473</sup>의 발현

해마와 대뇌피질의 nNOS 단백질의 발현(Fig. 3A, Fig. 3B)은 CON군에 비하여 HFD군에서 유의하게 높게 나타났다( $p < 0.001$ ). 또한 HFD-LI, -MI 그리고 -HI군은 모두 CON군과 차이가 없었다. 특히, 해마에서의 nNOS의 발현(Fig. 3A)은 HFD-LI군과 HFD-MI 사이에 유의한 차이가 있었다( $p < 0.05$ ). 소뇌에서의 nNOS 단백질 발현은 모든 그룹 사이에 차이가 나타나지 않았다(Fig. 3C). nNOS의 유전자 발현은 해마에서는 RNA 분해가 나타났을 것으로 예상되었기 때문에 분석되지 않았고 대뇌피질과 소뇌에서만 분석되었다. 대뇌피질의 nNOS 유전자 발현(Fig. 4A)은 CON군에 비하여 HFD군에서 유의하게 높았다( $p < 0.01$ ). HFD-LI군도 CON군에 비하여 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ). 특히, HFD-HI군은 HFD군에 비하여 유의하게 낮

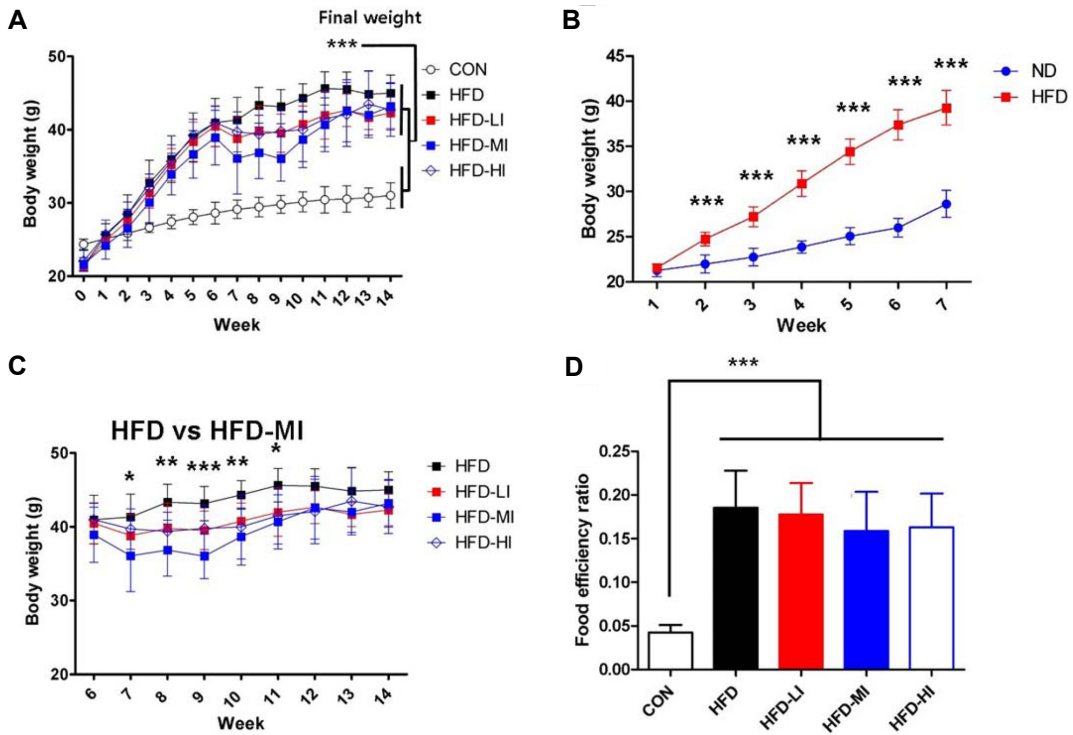


Fig. 2. A. Body weight change during the total experiment period in the total group. B. Body weight change during the induction of obesity phase in the normal diet-fed group and high-fat diet-fed group. C. Body weight change during the intervention phase in the exercised group. D. Food efficiency ratio. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . All data are presented as means  $\pm$  S.D.

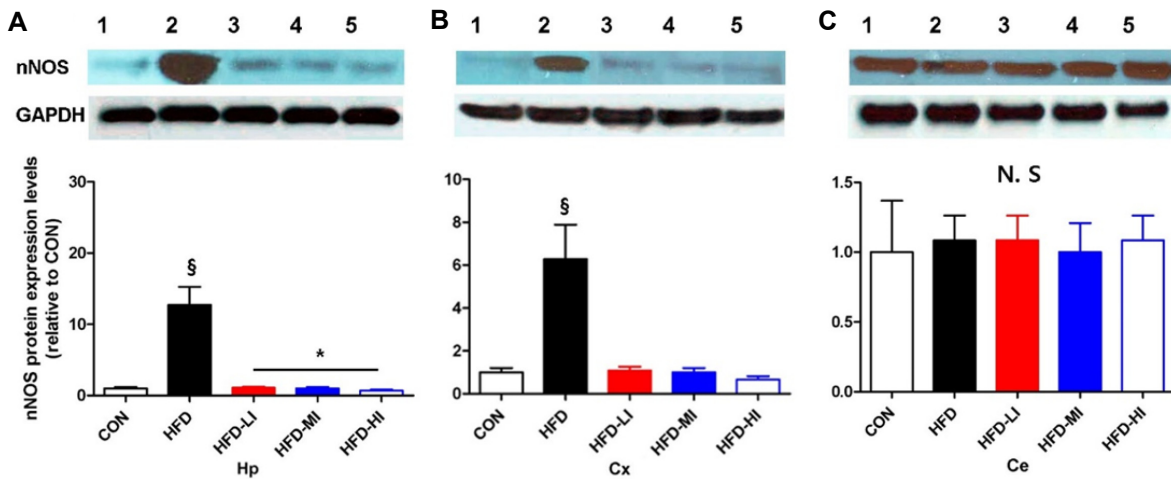


Fig. 3. Western blot showing nNOS protein in the hippocampus (A), cerebral cortex (B), and cerebellum (C) of all groups (1:CON; 2:HFD; 3:HFD-LI; 4:HFD-MI; 5:HFD-HI). \* $p < 0.05$ , between groups connected by a line. § $p < 0.01$  vs. other groups. All data are presented as means  $\pm$  S.D.

게 나타난 것은 물론이고( $p < 0.001$ ), HFD-LI군과 비교하여 유의하게 낮았으며( $p < 0.01$ ), HFD-MI군에 비해서도 유의하게 낮았다( $p < 0.05$ ). 소뇌에서의 nNOS 유전자 발현(Fig. 4B)은 CON군과 비교하여 HFD군에서 nNOS 유전자의 발현이 높았으며( $p < 0.05$ ), HFD-HI군은 HFD군에 유의하게 nNOS의 발현이 낮은 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ). 해마에서 pAkt<sup>Ser473</sup>의 단백질 발

현(Fig. 5A)은 CON군과 HFD군간에는 차이가 없었으나, 운동을 실시한 그룹인 HFD-LI, -MI 그리고 -HI군에서는 CON군과 비교했을 때와 HFD군과 비교했을 때 모두 유의한 차이가 있었다. 유의 수준은 HFD군과 HFD-LI를 비교했을 때( $p < 0.05$ )를 제외하고 모두  $p < 0.01$  수준에서 차이가 있었다. 대뇌피질에서는 pAkt<sup>Ser473</sup> 단백질 발현에서 그룹 간의 차이가 없었고(Fig.

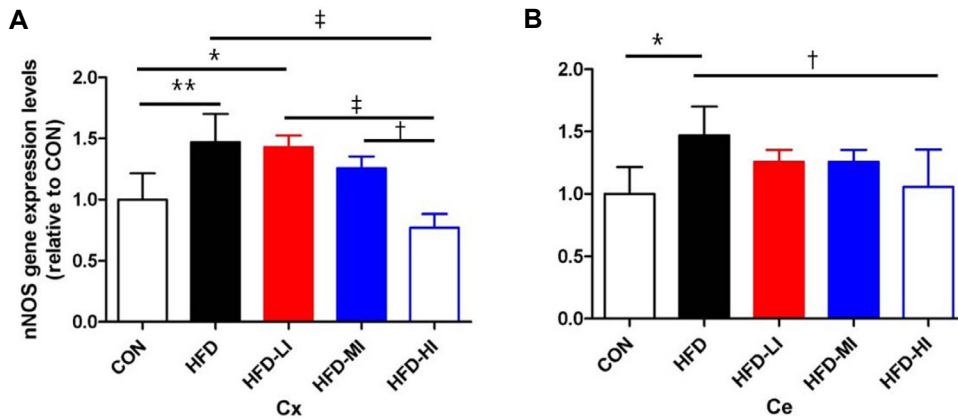


Fig. 4. nNOS gene expression levels in the cerebral cortex (A) and cerebellum (B) of all groups. \*:p<0.05 vs. CON. \*\*:p<0.01 vs. CON. †:p<0.05 vs. HFD. ‡:p<0.01 vs. HFD. All data are presented as means ± S.D.

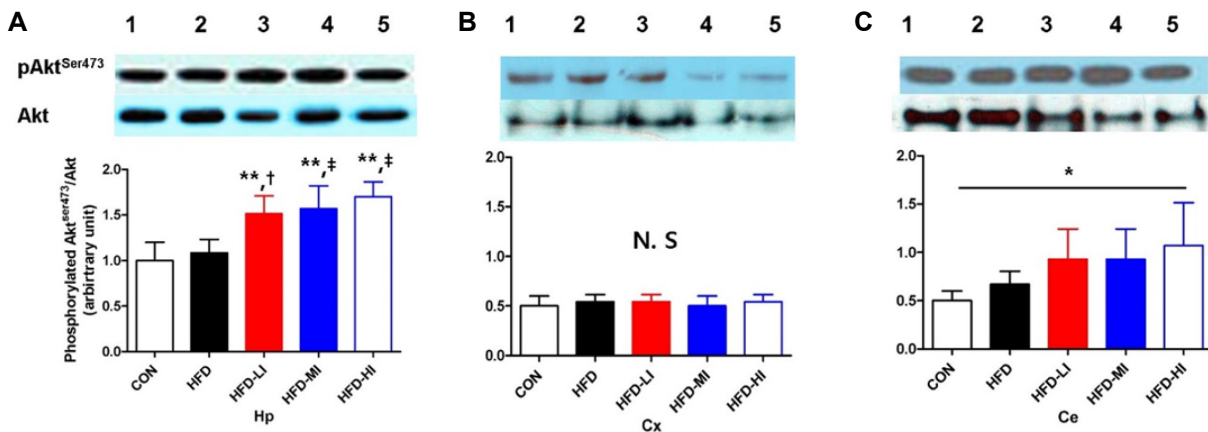


Fig. 5. Western blot showing pAkt<sup>Ser473</sup> protein in the hippocampus (A), cerebral cortex (B), and cerebellum (C) of all groups (1:CON; 2:HFD; 3:HFD-LI; 4:HFD-MI; 5:HFD-HI). (A) \*\*:p<0.01 vs. CON. †:p<0.05 vs. HFD. ‡:p<0.01 vs. HFD. (C) \*:p<0.05. All data are presented as means ± S.D.

5B), 소뇌에서는 HFD-HI군의 pAkt<sup>Ser473</sup> 단백질 발현(Fig. 5C)이 CON군에 비하여 높게 발현되는 것으로 나타났다(p<0.05).

### 고 찰

본 연구에서는 비만을 유도하고 식이와 관계없이 여러 강도의 운동을 통해 nNOS의 발현을 억제할 수 있는지를 확인하기 위하여 6주간의 HFD를 마우스에 자유식으로 공급하였다. 최종체중에서 6주간 고지방사료를 섭취한 모든 그룹은 일반식이군에 비해 유의하게 높은 체중증가로 나타났다(Fig. 2A, Fig. 2B). 이러한 결과는 6주간의 HFD를 통해 효과적인 체중증가를 유도하여 비만이 성공적으로 유도된 것을 의미한다. 비만을 성공적으로 유도하여 운동중재를 실시하였고 HFD-MI군에서 중재초기에 유의한 체중의 감소가 있었으나 결과적으로 최종체중에 차이가 없었다. 이러한 사실은 운동이 체중조절에 효과적이며 감량된 체중을 유지하는데 도움을 주기는 하지만 식이조절이 없는 체중감량에 도움을 주지 못한다는 이전의

연구결과와 같다[27, 41, 46]. 그러나 HFD-MI군에서 운동중재 초기에 체중이 감소하는 경향은 적절한 강도의 운동수행은 단기적으로나마 체중감량에 도움을 줄 수 있다는 것을 의미한다. 결과적으로 최종체중에서는 운동강도간에 차이가 없었기 때문에 정확한 원인을 파악하기 힘들지만 아마도 운동을 통해 시상하부에서의 호르몬 균형을 통해 식욕을 적절히 조절할 수 있다는 연구와 같은 효과라고 생각된다[42]. 비록 운동이 장기적인 체중감량에 직접적으로 영향을 미치지 않지만 다양한 만성질환과 건강상의 이점을 제공한다는 것은 잘 알려진 사실이다[8, 40]. 또한 운동의 실시여부와 상관없이 HFD를 섭취한 모든 그룹에서 식이효율이 높게 나타났다. 이러한 사실은 결과적으로 HFD 사료의 섭취가 높은 식이효율을 나타냄으로써 비만이 유도되었다는 것을 의미한다(Fig. 2D). 또한 운동을 실시하였음에도 불구하고 운동집단이 HFD군과 비교하여 식이효율의 차이가 없었다는 것은 결국 본 연구에서 수행된 트레드밀 운동에 의해 소모된 에너지만큼 칼로리의 섭취가 보상작용으로 이루어졌다는 것을 의미한다. 이러한 사실 또한



식이조절 없이 운동만으로 체중의 감량이나 유지가 어렵다는 이전의 연구결과들과 일치한다.

과체중과 비만은 뇌의 위축을 유도하고 우울증과 불안을 유발할 수 있다는 것이 잘 알려져 있다[23]. 이전의 연구에서는 7주간의 HFD로 인해 해마의 신경생성이 감소하고 BDNF의 수치가 낮아져 체지방량이 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 변화는 뇌의 위축과 비정상적인 정서적 행동으로 이어졌다. 그러나 32주간의 HFD 섭취는 불안과 같은 행동이 나타났으나 뇌의 무게는 변화가 없었다. 따라서 비만 또는 HFD에 의한 뇌의 기능장애는 뇌의 위축에 앞서 발생할 수 있다는 것을 의미한다. 뇌의 기능장애를 개선하기 위한 실시된 여러 연구들에서 nNOS의 억제제 우울증이나 불안과 같은 정서적인 행동을 개선한다고 보고 하였다[24, 29, 47]. Tomiga와 그의 동료 연구자들은 이와 관련하여 일련의 연구들은 수행하였다. 연구에 따르면 노화에 따른 nNOS의 증가가 불안과 스트레스를 유발하여 nNOS의 과발현이 신경독성으로 나타날 수 있다고 보고하였다[44]. 또한 후속연구를 통하여 비만으로 인해 nNOS가 증가할 수 있고 이는 운동에 의하여 억제될 수 있다고 하였다[45]. 따라서 비만으로 인한 nNOS의 발현 증가는 결과적으로 신경독성으로 나타날 수 있으며, 운동을 통해 과발현된 nNOS를 억제할 수 있다는 가능성을 제시한다.

본 연구에서는 해마와 대뇌피질에서 nNOS의 발현이 HFD 군에서 유의하게 높게 나타나 비만으로 해 nNOS의 발현이 증가한 것을 확인하였다. 또한 운동은 CON군과 같은 수준으로 nNOS의 발현을 유지하는 것으로 나타났다. 고무적이게도 유전자 발현 및 단백질 발현에서 모두 nNOS의 발현이 HFD-HI군에서 가장 낮게 나타났다. 이러한 결과는 운동강도에 따른 nNOS의 발현 차이는 분명히 존재하며 실험동물이 무리없이 수행할 수 있는 수준 내에서 운동강도는 높으면 높을수록 nNOS의 발현을 억제하는데 도움을 줄 수 있다는 것을 의미하며 본 연구에서 새롭게 확인된 사실이다. 특히 대뇌피질의 nNOS 유전자 발현차이를 확인했을 때 HFD-LI군은 CON군에 비해서는 발현이 높고 HFD군과는 유의한 차이가 없었고 HFD-HI군은 CON군을 제외한 모든 그룹에 비해 유의하게 낮아 nNOS의 억제에 가장 효과적인 것으로 나타났다. 단백질 수준에서의 발현은 유전자 발현의 수준과 차이가 있고 또한 뇌의 부위에 따른 차이가 있었다. 이와 관련하여 Bredt과 그의 동료 연구자들은 최초로 뇌의 nNOS 단백질 발현의 부위별 차이가 있음을 보여주었고[9], 이러한 차이는 뇌의 nNOS에 대한 운동의 효과에서도 분명히 나타난다는 연구가 있었다[14]. 그리고 마지막으로 최근에 이루어진 Tomiga와 그의 동료들의 연구들에서도 이러한 부위별 차이가 존재하였다[45]. 본 연구까지 포함하여 모든 연구들은 뇌의 nNOS의 발현에 부위별 차이가 있음을 강력하게 지지한다. 하지만 뇌의 nNOS 단백질 발현의 부위별 차이에 대한 기전은 명확하게 알려지지 않았다. 그러나 본 연구에서 가장 분명한 것은 HFD는

nNOS의 발현의 증가시킨다는 것과 과도한 스트레스 없이 수행가능한 운동과 같은 운동량의 운동을 수행하였을 때 분명히 운동강도는 높을수록 nNOS를 억제시킨다는 사실이다. 이전의 연구들에서 HFD는 해마와 대뇌피질에서 산화 스트레스를 유발하고 염증을 증가시킨다는 것을 보여주었다[12, 31]. 이러한 연구결과와 HFD와 함께 운동을 실시하여 nNOS의 억제를 확인한 연구결과는 HFD와 비만에 의한 악영향을 받기 쉽다는 것을 의미함과 동시에 운동에 따른 유익한 영향에도 민감하다는 것을 제시하였다[45]. 이전 연구에서 확인한 사실에 덧붙여 본 연구에서는 이러한 해마와 대뇌피질에서의 민감하고 유익한 운동의 효과가 운동강도에 따라서도 크게 영향을 받을 수 있다는 것을 새롭게 확인하였다.

인산화는 nNOS 기능을 NO 생산으로 조절하는 중요한 메커니즘으로 고려되어야 한다고 제안하였다[25]. 또한 이러한 과정이 랫드(rat)의 시상하부(hypothalamus)와 뇌간의 고립로핵(nucleus tractus solitarius)과 같은 뇌 조직에서 PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/Akt 경로에 의해 조절되는 것으로 보고되었다[13]. 해당 연구에서 운동을 통하여 pAkt<sup>Thr308</sup>의 수준은 증가시키나 pAkt<sup>Ser473</sup>은 증가시키지 않는다고 보고하였다. 그러나 앞의 두 가지 연구의 경우는 짧은 기간의 운동(각각 6시간, 14일 간의 자발적 쳇바퀴 운동)을 수행하여 장기간 운동의 효과는 확인되지 않았다. 그러나 최근 연구에서 장기간의 훈련을 통하여 pAkt<sup>Ser473</sup>의 인산화 증가가 확인되었다[45]. 본 연구에서도 pAkt<sup>Ser473</sup>의 증가가 강도와는 관계없이 운동수행에 의해 해마에서 유의하게 증가하였다. 이러한 결과는 운동을 통하여 nNOS 단백질 수준과 해마에서의 인산화를 변화시켜 NO 생산을 조절할 수 있음을 시사한다. 특히 소녀에서도 높은 강도의 운동훈련에 의해 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 기본적으로 소녀에서 풍부하게 존재하는 nNOS의 발현도 높은 강도의 운동에 의해 조절될 수 있음을 시사한다. 정리하자면 HFD나 비만은 nNOS의 발현을 억제시키지만 운동은 효과적으로 인산화를 변화시켜 nNOS의 발현을 조절하고 이를 통해 뇌의 기능을 보호하거나 향상시킬 수 있다. 특히 운동량이 같은 조건에서 고강도의 운동은 해마뿐만 아니라 소녀에서의 nNOS의 억제에도 관여하여 뇌기능의 보호 또는 향상에 더욱 효과적일 수 있다.

HFD 섭취를 통해 비만이 유도되었고 nNOS는 normal diet를 섭취한 마우스에 비해 발현이 높았기 때문에 아마도 이런 결과는 비만에 의해 nNOS가 과발현된 상태인 것으로 생각되었다. Tomiga와 그의 동료들의 연구 및 본 연구 모두 비만에 의해 nNOS가 과발현되었고, 운동을 통해 감소할 수 있다는 것을 확인하였다. 따라서 우리의 연구는 비만에 의해 nNOS가 과발현되어 뇌의 기능 기능과 위축을 유도할 수 있다는 것을 전제로 하였다. 그러므로 연구 목적상 정상 마우스에 운동을 실시한 그룹이 없었다. 따라서 비만이 아닐 때 운동을 실시하여 NO가 변화하는지는 확인된 바가 없다. 정상적인 생리적

상황이라면 아마도 nNOS의 발현이 운동에 의해서 크게 증가하거나 감소할 것이라고 생각되지 않으며 또한 그것이 비정상적인 nNOS의 발현이라고 보기에도 무리가 있다. 하지만 이러한 예상은 어디까지나 추측일 뿐이며 정상 마우스에서의 nNOS 발현이 운동에 의해 어떻게 조절될 수 있는지는 추후 연구에서 확인할 필요가 있을 것으로 보인다. 본 연구에서 모든 운동군은 HFD 섭취하면서 실시하였기 때문에 식이에 의한 요소의 개입을 차단하고 운동 독립적인 효과를 확인하였다. 그리고 그룹 간의 체중에서 유의한 차이가 없었기 때문에 운동은 체중과 식이에 의한 영향을 배제하고도 nNOS 억제에 효과적이었다고 생각된다. 따라서 비만일 때 운동은 독립적이고 효과적으로 nNOS를 억제하는 것은 거의 확실하다고 생각되며 추후 연구는 운동이 독립적인지 아닌지에 관련한 연구가 아니라 운동에 의해 nNOS의 경로를 어떻게 독립적으로 조절하는지에 초점이 맞추어져야 할 것으로 생각된다.

본 연구자는 마우스에게 행동 테스트를 수행하지 않아 운동 강도에 따른 nNOS의 발현 차이가 우울과 불안 또는 인지능력의 차이에 영향을 미치는지 알 수 없었다. 하지만 nNOS의 발현의 차이가 이미 불안과 스트레스를 유발한다는 것이 잘 알려져 있으며 운동은 강도에 관계없이 nNOS를 억제하였기 때문에 운동강도 간에 우울 및 불안 관련 행동 차이가 유의하게 나타날 것이라고는 생각되지 않는다. 따라서 운동강도에 관계없이 nNOS의 발현을 억제하기 때문에 강도보다는 적절한 운동을 실천하는 것 자체가 중요하며 단지 nNOS의 억제효과를 극대화하기 위해서는 높은 운동강도가 효과적일 수도 있다는 사실을 제안한다.

결론적으로 비만은 해마와 대뇌피질의 nNOS의 발현을 증가시킬 수 있으며, 운동은 강도에 관계없이 nNOS의 발현을 억제하는데 효과적이다. 그러나 운동강도가 높을수록 해마에서의 nNOS의 억제와 소뇌에서의 인산화 증가에 효과적이었다. 따라서 운동은 비만으로 인한 뇌의 건강 저하를 방지하고 향상시키는데 중요하며 이에 과도한 스트레스 없이 수행가능한 범위 내에서 높은 강도의 운동이 더욱 효과적일 수도 있다.

## References

- Abbott, L. C. and Nahm, S. S. 2004. Neuronal nitric oxide synthase expression in cerebellar mutant mice. *Cerebellum* **3**, 141-151.
- Abel, E. D., Peroni, O., Kim, J. K., Kim, Y. B., Boss, O., Hadro, E., Minnemann, T., Shulman, G. I. and Kahn, B. B. 2001. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* **409**, 729-733.
- Akgoren, N., Fabricius, M. and Lauritzen, M. 1994. Importance of nitric oxide for local increases of blood flow in rat cerebellar cortex during electrical stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**, 5903-5907.
- Anaeigoudari, A., Soukhtanloo, M., Shafei, M. N., Sadeghnia, H. R., Reisi, P., Beheshti, F., Behradnia, S., Mousavi, S. M. and Hosseini, M. 2016. Neuronal nitric oxide synthase has a role in the detrimental effects of lipopolysaccharide on spatial memory and synaptic plasticity in rats. *Pharmacol. Rep.* **68**, 243-249.
- Baek, K. W. 2018. Effects of a single bout of exercise on the macrophage phenotypic ratio in the adipose tissue of high-fat diet-induced obese mice. *Exerc. Sci.* **27**, 12.
- Baek, K. W., Cha, H. J., Ock, M. S., Kim, H. S., Gim, J. A. and Park, J. J. 2018. Effects of regular-moderate exercise on high-fat diet-induced intramyocellular lipid accumulation in the soleus muscle of Sprague-Dawley rats. *J. Exerc. Rehabil.* **14**, 32-38.
- Billat, V. L., Moussel, E., Roblot, N. and Melki, J. 2005. Inter- and intrastrain variation in mouse critical running speed. *J. Appl. Physiol.* (1985) **98**, 1258-1263.
- Blair, S. N., Horton, E., Leon, A. S., Lee, I. M., Drinkwater, B. L., Dishman, R. K., Mackey, M. and Kienholz, M. L. 1996. Physical activity, nutrition, and chronic disease. *Med. Sci. Sports Exerc.* **28**, 335-349.
- Bredt, D. S., Glatt, C. E., Hwang, P. M., Fotuhi, M., Dawson, T. M. and Snyder, S. H. 1991. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* **7**, 615-624.
- Bredt, D. S. and Snyder, S. H. 1992. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* **8**, 3-11.
- Bredt, D. S. and Snyder, S. H. 1994. Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. *Neuron* **13**, 301-313.
- Camer, D., Yu, Y., Szabo, A., Fernandez, F., Dinh, C. H. L. and Huang, X. F. 2015. Bardoxolone methyl prevents high-fat diet-induced alterations in prefrontal cortex signaling molecules involved in recognition memory. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **59**, 68-75.
- Canabal, D. D., Song, Z., Potian, J. G., Beuve, A., McArdle, J. J. and Routh, V. H. 2007. Glucose, insulin, and leptin signaling pathways modulate nitric oxide synthesis in glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **292**, R1418-1428.
- Chalimoniuk, M., Chrapusta, S. J., Lukacova, N. and Langfort, J. 2015. Endurance training upregulates the nitric oxide/soluble guanylyl cyclase/cyclic guanosine 3',5'-monophosphate pathway in the striatum, midbrain and cerebellum of male rats. *Brain Res.* **1618**, 29-40.
- Chen, M. J., Ivy, A. S. and Russo-Neustadt, A. A. 2006. Nitric oxide synthesis is required for exercise-induced increases in hippocampal BDNF and phosphatidylinositol 3' kinase expression. *Brain Res. Bull.* **68**, 257-268.
- Cherbuin, N., Sargent-Cox, K., Fraser, M., Sachdev, P. and Anstey, K. J. 2015. Being overweight is associated with hippocampal atrophy: the PATH Through Life Study. *Int. J. Obes (Lond)*. **39**, 1509-1514.
- Dunn, R. W., Reed, T. A., Copeland, P. D. and Frye, C. A. 1998. The nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole displays enhanced anxiolytic efficacy without tolerance in rats



- following subchronic administration. *Neuropharmacology* **37**, 899-904.
18. Erickson, K. L., Voss, M. W., Prakash, R. S., Basak, C., Szabo, A., Chaddock, L., Kim, J. S., Heo, S., Alves, H., White, S. M., Wojcicki, T. R., Mailey, E., Vieira, V. J., Martin, S. A., Pence, B. D., Woods, J. A., McAuley, E. and Kramer, A. F. 2011. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **108**, 3017-3022.
  19. Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T. F., Papapetropoulos, A. and Sessa, W. C. 1999. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* **399**, 597-601.
  20. Gammie, S. C., Olaghere-da Silva, U. B. and Nelson, R. J. 2000. 3-bromo-7-nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase inhibitor, impairs maternal aggression and citrulline immunoreactivity in prairie voles. *Brain. Res.* **870**, 80-86.
  21. Gleeson, M. 2007. Immune function in sport and exercise. *J. Appl. Physiol.* **103**, 693-699.
  22. Jacka, F. N., Cherbuin, N., Anstey, K. J., Sachdev, P. and Butterworth, P. 2015. Western diet is associated with a smaller hippocampus: a longitudinal investigation. *BMC. Med.* **13**, 215.
  23. Jacka, F. N., Pasco, J. A., Mykletun, A., Williams, L. J., Hodge, A. M., O'Reilly, S. L., Nicholson, G. C., Kotowicz, M. A. and Berk, M. 2010. Association of Western and traditional diets with depression and anxiety in women. *Am. J. Psychiatry* **167**, 305-311.
  24. Joca, S. R. and Guimaraes, F. S. 2006. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacology (Berl)* **185**, 298-305.
  25. Kasamatsu, S., Watanabe, Y., Sawa, T., Akaike, T. and Ihara, H. 2014. Redox signal regulation via nNOS phosphorylation at Ser847 in PC12 cells and rat cerebellar granule neurons. *Biochem. J.* **459**, 251-263.
  26. Kawanishi, N., Yano, H., Yokogawa, Y. and Suzuki, K. 2010. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exerc. Immunol. Rev.* **16**, 105-118.
  27. Kempen, K. P., Saris, W. H. and Westerterp, K. R. 1995. Energy balance during an 8-wk energy-restricted diet with and without exercise in obese women. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**, 722-729.
  28. Kobil, T., Liu, Q. R., Gandhi, K., Mughal, M., Shaham, Y. and van Praag, H. 2011. Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. *Learn. Mem.* **18**, 605-609.
  29. Krass, M., Runkorg, K., Wegener, G. and Volke, V. 2010. Nitric oxide is involved in the regulation of marble-burying behavior. *Neurosci. Lett.* **480**, 55-58.
  30. Lindqvist, A., Mohapel, P., Bouter, B., Frielingsdorf, H., Pizzo, D., Brundin, P. and Erlanson-Albertsson, C. 2006. High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. *Eur. J. Neurol.* **13**, 1385-1388.
  31. Liu, Y., Fu, X., Lan, N., Li, S., Zhang, J., Wang, S., Li, C., Shang, Y., Huang, T. and Zhang, L. 2014. Luteolin protects against high fat diet-induced cognitive deficits in obesity mice. *Behav. Brain Res.* **267**, 178-188.
  32. Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) method. *Methods* **25**, 402-408.
  33. Mayer, B., John, M. and Bohme, E. 1990. Purification of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett.* **277**, 215-219.
  34. Molteni, R., Barnard, R. J., Ying, Z., Roberts, C. K. and Gomez-Pinilla, F. 2002. A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neuroscience* **112**, 803-814.
  35. Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., Mullany, E. C., Biryukov, S., Abbafati, C., Abera, S. F., Abraham, J. P., Abu-Rmeileh, N. M., Achoki, T., AlBuhairan, F. S., Alemu, Z. A., Alfonso, R., Ali, M. K., Ali, R., Guzman, N. A., Ammar, W., Anwar, P., Banerjee, A., Barquera, S., Basu, S., Bennett, D. A., Bhutta, Z., Blore, J., Cabral, N., Nonato, I. C., Chang, J. C., Chowdhury, R., Courville, K. J., Criqui, M. H., Cundiff, D. K., Dabhadkar, K. C., Dandona, L., Davis, A., Dayama, A., Dharmaratne, S. D., Ding, E. L., Durrani, A. M., Esteghamati, A., Farzadfar, F., Fay, D. F., Feigin, V. L., Flaxman, A., Forouzanfar, M. H., Goto, A., Green, M. A., Gupta, R., Hafezi-Nejad, N., Hankey, G. J., Harewood, H. C., Havmoeller, R., Hay, S., Hernandez, L., Husseini, A., Idrisov, B. T., Ikeda, N., Islami, F., Jahangir, E., Jassal, S. K., Jee, S. H., Jeffreys, M., Jonas, J. B., Kabagambe, E. K., Khalifa, S. E., Kengne, A. P., Khader, Y. S., Khang, Y. H., Kim, D., Kimokoti, R. W., Kinge, J. M., Kokubo, Y., Kosen, S., Kwan, G., Lai, T., Leinsalu, M., Li, Y., Liang, X., Liu, S., Logroscino, G., Lotufo, P. A., Lu, Y., Ma, J., Mainoo, N. K., Mensah, G. A., Merriman, T. R., Mokdad, A. H., Moschandreas, J., Naghavi, M., Naheed, A., Nand, D., Narayan, K. M., Nelson, E. L., Neuhauser, M. L., Nisar, M. I., Ohkubo, T., Oti, S. O., Pedroza, A., Prabhakaran, D., Roy, N., Sampson, U., Seo, H., Sepanlou, S. G., Shibuya, K., Shiri, R., Shiue, I., Singh, G. M., Singh, J. A., Skirbekk, V., Stapelberg, N. J., Sturua, L., Sykes, B. L., Tobias, M., Tran, B. X., Trasande, L., Toyoshima, H., van de Vijver, S., Vasankari, T. J., Veerman, J. L., Velasquez-Melendez, G., Vlassov, V. V., Vollset, S. E., Vos, T., Wang, C., Wang, X., Weiderpass, E., Werdecker, A., Wright, J. L., Yang, Y. C., Yatsuya, H., Yoon, J., Yoon, S. J., Zhao, Y., Zhou, M., Zhu, S., Lopez, A. D., Murray, C. J. and Gakidou, E. 2014. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* **384**, 766-781.
  36. Nieman, D. C. 1994. Exercise, infection, and immunity. *Int. J. Sports Med.* **15 Suppl 3**, S131-141.
  37. Oliveira, A. G., Araujo, T. G., Carvalho, B. M., Guadagnini, D., Rocha, G. Z., Bagarolli, R. A., Carnevalheira, J. B. and Saad,

- M. J. 2013. Acute exercise induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization in diet-induced obese rats. *Obesity (Silver Spring)* **21**, 2545-2556.
38. Park, C., Shin, K. S., Ryu, J. H., Kang, K., Kim, J., Ahn, H. and Huh, Y. 2004. The inhibition of nitric oxide synthase enhances PSA-NCAM expression and CREB phosphorylation in the rat hippocampus. *Neuroreport* **15**, 231-234.
39. Park, H. R., Park, M., Choi, J., Park, K. Y., Chung, H. Y. and Lee, J. 2010. A high-fat diet impairs neurogenesis: involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. *Neurosci. Lett.* **482**, 235-239.
40. Pedersen, B. K. and Saltin, B. 2006. Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **16 Suppl 1**, 3-63.
41. Racette, S. B., Schoeller, D. A., Kushner, R. F., Neil, K. M. and Herling-Iaffaldano, K. 1995. Effects of aerobic exercise and dietary carbohydrate on energy expenditure and body composition during weight reduction in obese women. *Am. J. Clin. Nutr.* **61**, 486-494.
42. Ropelle, E. R., Flores, M. B., Cintra, D. E., Rocha, G. Z., Pauli, J. R., Morari, J., de Souza, C. T., Moraes, J. C., Prada, P. O., Guadagnini, D., Marin, R. M., Oliveira, A. G., Augusto, T. M., Carvalho, H. F., Velloso, L. A., Saad, M. J. and Carneiro, J. B. 2010. IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition. *PLoS. Biol.* **8**, e1000465.
43. Soya, H., Nakamura, T., Deocaris, C. C., Kimpara, A., Imura, M., Fujikawa, T., Chang, H., McEwen, B. S. and Nishijima, T. 2007. BDNF induction with mild exercise in the rat hippocampus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**, 961-967.
44. Tomiga, Y., Ito, A., Sudo, M., Ando, S., Maruyama, A., Nakashima, S., Kawanaka, K., Uehara, Y., Kiyonaga, A., Tanaka, H. and Higaki, Y. 2016. Effects of environmental enrichment in aged mice on anxiety-like behaviors and neuronal nitric oxide synthase expression in the brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **476**, 635-640.
45. Tomiga, Y., Yoshimura, S., Ito, A., Nakashima, S., Kawanaka, K., Uehara, Y., Tanaka, H. and Higaki, Y. 2017. Exercise training rescues high fat diet-induced neuronal nitric oxide synthase expression in the hippocampus and cerebral cortex of mice. *Nitric Oxide* **66**, 71-77.
46. Velthuis-te Wierik, E. J., Westerterp, K. R. and van den Berg, H. 1995. Impact of a moderately energy-restricted diet on energy metabolism and body composition in non-obese men. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **19**, 318-324.
47. Volke, V., Wegener, G., Bourin, M. and Vasar, E. 2003. Anti-depressant- and anxiolytic-like effects of selective neuronal NOS inhibitor 1-(2-trifluoromethylphenyl)-imidazole in mice. *Behav. Brain Res.* **140**, 141-147.
48. Wultsch, T., Chourbaji, S., Fritzen, S., Kittel, S., Grunblatt, E., Gerlach, M., Gutknecht, L., Chizat, F., Golfier, G., Schmitt, A., Gass, P., Lesch, K. P. and Reif, A. 2007. Behavioural and expressional phenotyping of nitric oxide synthase-I knock-down animals. *J. Neural. Transm. Suppl.* **2007**, 69-85.
49. Zhang, J., Huang, X. Y., Ye, M. L., Luo, C. X., Wu, H. Y., Hu, Y., Zhou, Q. G., Wu, D. L., Zhu, L. J. and Zhu, D. Y. 2010. Neuronal nitric oxide synthase alteration accounts for the role of 5-HT1A receptor in modulating anxiety-related behaviors. *J. Neurosci.* **30**, 2433-2441.
50. Zhou, Q. G., Hu, Y., Hua, Y., Hu, M., Luo, C. X., Han, X., Zhu, X. J., Wang, B., Xu, J. S. and Zhu, D. Y. 2007. Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. *J. Neurochem.* **103**, 1843-1854.

## 초록 : 고지방식으로 유도된 비만 마우스의 해마 및 대뇌피질에서 운동강도에 따른 nNOS 발현의 변화

백경원\*

(부산대학교 스포츠과학부)

최근 비만에 의해 과발현된 신경세포형 산화질소 생성효소(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)가 정서적 행동을 조절하는 중요한 인자라는 보고되었다. 이와 관련한 최근의 연구에서 운동이 비만에 의해 과발현된 nNOS를 억제하고 정서적 우울감과 항불안 효과를 감소시켰다는 연구결과가 보고되었다. 운동은 nNOS를 억제하여 뇌의 기능을 향상시킬 수 있는 효과적인 전략으로 보이지만 운동은 강도에 따라 면역 반응에 큰 차이가 있다. 따라서 본 연구에서는 고지방식이(high-fat diet, HFD)로 유도된 비만 마우스에서 다른 강도의 운동을 실시하여 해마의 nNOS 발현의 차이를 분석하고자 하였다. 실험동물은 C57BL/6 마우스를 사용하였다. 대조군(CON, n=14)을 제외한 마우스(n=35)에게 6주 동안 60%의 고지방식이를 섭취시켜 비만을 유도하였다. 6주간의 비만유도 기간이 종료된 후 CON과 비만이 유도된 동물 각각 7마리씩 희생하여 비만유도를 확인하는데 사용되었다. 나머지 동물은 8주간의 운동중재 연구에 이용되었다. 이 때 CON을 제외하고 비만이 유도된 동물들은 고지방대조군(HFD) 그리고 저강도운동군(HFD-LI, n=7) 중강도운동군(HFD-MI, n=7) 그리고 HFD-고강도(HFD-HI, n=7)로 나누어졌다. HFD-LI는 12 m/min으로 75분, HFD-MI는 15 m/min으로 60분 그리고 HFD-HI는 18 m/min으로 50분 동안 동물용 트레드밀에서 운동이 수행되었다(동등한 운동량, 900 m). 해마(hippocampus)의 nNOS 단백질의 발현은 CON에 비해 HFD에서 유의하게 높았고( $p < 0.01$ ), CON과 운동을 실시한 모든 그룹과 차이가 없었다. 하지만 HFD-LI에 비해 HFD-HI가 유의하게 nNOS 발현이 낮았다( $p < 0.05$ ). 대뇌피질에서는 CON에 비해 HFD에서 유의하게 높았으나( $p < 0.01$ ), 다른 그룹 간에 차이는 없었다. nNOS의 생성을 조절할 수 있는 인산화된 Akt (pAkt)의 발현이 CON과 HFD에 비해 운동을 실시한 나머지 그룹 모두에서 유의하게 높았다. 대뇌피질에서의 pAkt의 발현에서는 차이가 모든 그룹 간에 차이가 없었고, 소뇌에서는 CON에 비해 HFD-HI에서 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ). 소뇌에서는 각 그룹 간에 차이가 없었다. 결론적으로 nNOS는 고지방식이와 비만에 의해 과발현된 것으로 보여지고 이를 운동을 통하여 낮출 수 있는 것으로 보여지며, 이 때 운동량이 같다는 가정하에 상대적으로 높은 강도가 효과적인 가능성이 있다.