

## 저항성 운동이 알츠하이머 형질전환 생쥐 뇌의 베타 아밀로이드 대사와 인지기능에 미치는 영향

장용철<sup>1,\*</sup> · 구정훈<sup>2,†</sup>

<sup>1</sup>한국체육대학교 운동생화학실, 연구원

<sup>2</sup>한국체육대학교 체육과학연구소, 박사후 연구원

(2020년 4월 1일 접수: 2020년 6월 9일 수정: 2020년 6월 19일 채택)

### The effect of resistance exercise on $\beta$ -amyloid metabolism and cognitive function in a mouse model of Alzheimer's disease

Yong-Chul Jang<sup>1,\*</sup> · Jung-Hoon Koo<sup>2,†</sup>

<sup>1</sup>*Exercise biochemistry Laboratory, Korea National Sport University*

<sup>2</sup>*Institute of Sport Science, Korea National Sport University*

(Received April 1, 2020; Revised June 9, 2020; Accepted June 19, 2020)

**요 약** : 본 연구는 알츠하이머(Alzheimer's disease: AD) 형질전환 생쥐를 대상으로 저항성 운동(resistance exercise: RE)이 해마의 베타 아밀로이드( $\beta$ -amyloid: A $\beta$ ) 단백질 대사, 신경세포사멸 및 인지기능에 미치는 영향을 확인하는데 목적이 있다. AD 비 형질전환 생쥐(non-transgenic: non-tg,  $n=14$ )와 형질전환 생쥐(transgenic: Tg,  $n=14$ )를 무선 배정하여 비 형질전환 생쥐 대조군(non-tg-control: NTC,  $n=7$ ), 비 형질전환 생쥐 저항성 운동군(non-tg-RE: NTRE,  $n=7$ ), 형질전환 대조군(tg-control: TC,  $n=7$ ) 및 형질전환 저항성 운동군(tg-RE: TRE,  $n=7$ )으로 구분하였다. RE는 특수 제작한 사다리 저항성 운동 기구를 사용하여 점진적으로 set 수를 증가시켜 총 8주간 실시하였다. 운동 후 인지기능 능력을 평가하기 위한 수중미로검사와 A $\beta$  단백질 대사, 신경세포사멸 지표 및 SIRT1/PGC-1 $\alpha$  단백질 발현 수준을 확인하였다. 수중미로검사 결과 거리와 시간 모두 TC 집단에서 유의하게 증가 되었지만 RE를 실시한 TRE 집단에서 거리와 시간이 감소 되어 인지능력이 개선된 것으로 확인되었다. 또한, TC 집단에서 증가된 A $\beta$  단백질 발현은 RE를 통해 감소하는 것으로 나타났다. 신경세포사멸 관련 단백질인 Bcl-2/Bax ratio는 TC 집단에서 유의하게 감소되어 신경세포사멸이 증가 된 것으로 나타났지만 RE는 Bcl-2/Bax ratio를 증가시켜 신경세포사멸을 감소시킨 것으로 확인되었다. TC 집단에서 증가된 BACE1 및 ROCK1과 감소된 ADAM10과 RAR $\beta$  단백질 발현은 RE를 통해 감소되거나 증가 된 것으로 나타났고, SIRT1/PGC-1 $\alpha$  단백질 발현은 TC 집단에서 감소 되었지만 RE를 통해 증가 된 것으로 나타났다. 따라서 8주간의 RE는 AD의 병리학적 특징인 A $\beta$  단백질 발현을 감소시키고 관련 생성 기전들을 조절하여(SIRT1/PGC-1 $\alpha$  기전 활성화, 아밀로이드 생성기전 억제, 비-아밀로이드 생성기전 활성화) 신경세포사멸 억제시키고 결과적으로 인지기능을 개선 시킬 수 있는 효과적인 운동 방법이라고 생각된다.

<sup>†</sup>Corresponding author

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

주제어 : 알츠하이머 질환, 아밀로이드 베타, 저항성 운동, 아밀로이드 생성 기전, 비-아밀로이드 생성기전, 신경세포사멸

**Abstract** : The aim of this study was to investigate the effect of resistance exercise(RE) on beta-amyloid(A $\beta$ ) metabolism, neuronal cell death, and cognitive function in the transgenic mice model of Alzheimer's disease(AD). Fourteen transgenic(tg) mice and fourteen non-transgenic(non-tg) mice were divided into four groups: (1)non-tg-control(NTC, n=7) (2)non-tg-RE(NTRE, n=7) (3)tg-control(TC, n=7), and (4)tg-RE(TRE, n=7). The groups with RE were performed to progressive RE on ladder equipment for 8 weeks. The groups with RE were performed to progressive RE on ladder equipment for 8 weeks. After then, the cognitive function was measured by using the water maze test ,and A $\beta$  metabolism-related proteins, neuronal cell death, and SIRT1/PGC-1 $\alpha$  pathway were also measured. Here, we found escape latency and time were significantly increased in the TC compared to the NTC group, but it was significantly reduced in the TRE group, indicating RE may ameliorate cognitive dysfunction. Next, we found an increased in A $\beta$  protein of TC compared to NTC, but it was significantly reduced in the TRE group following RE. In neuronal cell death, Bcl-2 was also significantly decreased and Bax was significantly increased in the TC compared to the NTC group, but RE can increase Bcl-2 and reduce Bax, which may elevate the ratio of Bcl-2/Bax. We further found a decrease in the level of ADAM10 and RAR $\beta$  protein was significantly increased whereas increased in ROCK1 and BACE1 expression level was significantly reduced following RE in the TRE compared to the TC group. In addition, the level of SIRT1/PGC-1 $\alpha$  proteins was decreased in the TC group compared to NTC group, but, these markers were significantly increased in the TRE group following RE. Therefore, our finding indicated that RE may ameliorate cognitive deficits by reducing A $\beta$  protein and neuronal cell death via regulating SIRT1/PGC-1 $\alpha$ , amyloidogenic pathway, and non-amyloidogenic pathway, which may play a role in an effective strategy for AD.

**Keywords** : Alzheimer's disease, Amyloid beta, resistance exercise, Amyloidogenic pathway, Non-amyloidogenic pathway, Neuronal cell death

## 1. 서론

세계적인 노인 인구의 증가로 신경퇴행성질환자의 수는 급격하게 증가하고 있으며 이는 개인과 가족 공동체의 삶을 무너뜨릴 뿐만 아니라 과다한 의료비 손실로 이어질 수 있기 때문에 이를 관리하고 치료하기 위한 다양한 방법들이 모색되고 있다. 특히, 치매(Dementia)는 기억력의 감소와 행동적 장애가 나타나는 신경퇴행성 질환(neurodegenerative disorder)으로 현재 우리나라 65세 이상 치매 인구가 80만 이상으로 추정될 만큼 사회적인 문제가 되고 있으며[1], 현 정부에서도 치매국가책임제라는 국정과제를 제시될 만큼 그 문제의 심각성은 증가 될 것으로 추측된다. 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease: AD)은 치매의 70%를 차지하는 대표적인 뇌 퇴행성 질

환으로 뇌 속에 베타 아밀로이드( $\beta$ -amyloid: A $\beta$ ) 단백질의 축적과 타우(Tau) 단백질의 과인산화가 대표적인 병리학적 특징으로 산화적 스트레스와 함께 신경세포의 사멸을 일으켜 인지기능을 손상시킨다[2]. 이 중 A $\beta$  단백질 축적은 세포 내 핵심적 신호체계인 소포체, 인슐린 신호전달, 오토파지, 미토콘드리아 기능을 붕괴시켜 결과적으로 인지능력의 감소를 유발하는 것으로 보고되었다[3-6]. 따라서 대다수의 연구 분야에서는 A $\beta$  단백질의 축적을 감소시키거나 억제시키는 방법이 AD의 병리학적 기전을 제어할 수 있는 효과적인 방법이라고 제시하였다.

최근 세계보건기구에서 치매에 대한 관리 지침을 발표한 가운데 신체활동(physical activity)은 치매를 관리하기 위한 효과적인 방법이라고 제시하였다[7]. 이를 반영하듯 대다수의 선행연구에서

도 신체활동은 뇌 혈류량, 뇌 글리코겐 및 신경 세포의 활성을 증가시켜 인지기능을 개선시키는 것으로 보고되었다[8-10, 28]. 또한, AD 동물 모델을 대상으로 지구성 운동을 수행한 선행연구에서는 뇌에 축적된 A $\beta$  단백질이 감소되고 이를 통해 뇌의 인지기능 향상을 보고하였다[11-13]. 특히 Koo 등[14]은 A $\beta$  단백질의 감소 기전을 분석한 결과 저항도 유산소성 트레이드밀 운동이 A $\beta$  단백질을 생성시키는 기전을 감소시키는 반면 A $\beta$  단백질의 생성을 억제하는 기전을 증가시켜 결과적으로 A $\beta$  단백질의 발현 수준을 감소시킨다고 보고하였다.

저항성 운동(resistance exercise: RE)은 근육 합성과 근 비대를 유도하기 때문에 노화에 의한 근 위축을 예방하기 위해서 필수적으로 요구되는 운동으로 알려져 있다[15]. 하지만 최근 일부 연구에서 RE를 통해서도 뇌 기능 향상에 중요한 신경재생(neurogenesis)과 신경가소성(neuroplasticity)을 증가시켜 뇌의 활성에 긍정적인 영향을 미친다고 보고되었다[16, 17]. 흥미롭게도, AD 환자들을 대상으로 RE를 수행한 결과 신경염증과 우울 증세가 감소되고 인지기능 일부가 개선되었다고 보고되었다[18, 19]. 이러한 관점을 주목해보면 치매와 관련된 운동의 형태는 유산소성 운동뿐만 아니라 RE도 치매를 관리할 수 있는 또 하나의 운동 프로그램으로 제시할 수 있다고 생각한다. 하지만 아직까지 RE에 의한 AD 질환의 인지기능 향상 기전은 표면적인 연구일 뿐 그 어떠한 분자생물학적 기전으로 개선되는지 정확하게 알려져 있지 않다. 또한, 일부 선행연구에서는 저항성 운동이 뇌의 인지기능 향상에 아무런 효과가 없다는 상반된 연구도 제시될 만큼 RE에 대한 인지기능 관련 연구는 매우 부족한 실정이다[20, 21]. 만약 RE를 통한 A $\beta$  단백질 대사의 변화 양상을 분자생물학적으로 확인할 수 있다면 유산소성 운동뿐만 아니라 RE 또한 AD를 완화시킬 수 있는 효과적인 운동이라고 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

따라서 본 연구의 목적은 AD 형질전환 생쥐를 대상으로 8주간 RE가 뇌의 A $\beta$  단백질 대사 및 신경세포사멸과 관련된 메커니즘과 Sirtuin-1 (SIRT1)/Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 $\alpha$ ) 단백질 발현 및 인지기능에 미치는 영향을 확인하는데 있다.

## 2. 실험

### 2.1. 실험동물

본 실험에 사용된 neuron-specific enolase (NSE)/human mutant PS2 gene(PS2m) AD 형질전환 마우스는 식품의약품안전청 국립독성연구원 실험동물실에서 분양받아 사용하였다[29]. 먼저 같은 어미의 배 속에서 출생한 AD 형질전환 마우스( $n=14$ )와 형질전환 되지 않은 마우스( $n=14$ )를 분양받아 온도( $20\pm 2^\circ\text{C}$ )와 습도(50%)가 조절되고 주간(08:00-20:00), 야간에는 자동적으로 소등(20:00-08:00)하도록 한 K대학교 실험 동물실에서 20개월 동안 사육한 뒤 실험을 진행하였다. 실험기간 동안 동물용으로 제조된 사료(Purina 쥐사료-5057)와 수분은 제한 없이 공급하였다. 집단은 AD로 형질전환 되지 않은 마우스 비교집단(NTC,  $n=7$ ), 형질전환 되지 않은 마우스 저항성 운동집단(NTRE,  $n=7$ )과 AD로 형질전환 된 마우스 비교집단(TC,  $n=7$ ), 형질전환 된 마우스 저항성 운동집단(TRE,  $n=7$ )으로 구분하였다.

### 2.2. 저항성 운동 프로토콜

RE는 특수 제작한 실험동물용 사다리 운동기구 (width $\times$ length $\times$ interval, 128 $\times$ 24 $\times$ 2, 경사도 80 $^\circ$ )를 사용하여 실시하였다. 먼저 본 실험에서 사용된 AD 마우스는 노화된(20 months) 상태로 사전 운동을 실시한 결과 추가적으로 부하를 증가시켜 RE를 수행할 수 없었기에 저항 없이 몸무게(body weight)만을 이용하여 RE를 수행하였다. 저항성 사다리 운동에 대한 적응은 1주일간 (2set/day, 5 times, 1 week) 실시하였으며 본 운동은 8주간 점진적으로 세트 수를 증가시켜 RE를 실시하였고 세트 간 휴식은 2분으로 설정하여 진행하였다(표 1).

Table 1. Resistance exercise protocol

period	sets	frequency (per week)
Pre-RE	2	
1-2 week	4	5 times
3-4 week	8	
5-8 week	10	

RE: resistance exercise.

### 2.3. 수중미로검사

인지기능을 평가하기 위해 수중미로검사(water maze test: WMT)를 실시하였으며 측정 변인은 수영 거리(escape distance)와 시간(escape latency)을 컴퓨터 프로그램(SMART-LD)을 이용한 카메라로 측정하고 SMART-CS 프로그램(Panlab, Barcelona, Spain)을 활용하여 분석하였다. WMT는 원형수조(지름 1.5m×높이 40cm)에 지름 12cm인 표적을 수면에서 1cm 정도 낮게 설치하고 물(23°C-25°C)을 받아 우유를 용해 시켜 표적을 보이지 않도록 하였다. WMT 검사는 5일 동안 각각 2회씩 출발지점에서 시작하여 표적에 도달할 수 있도록 훈련하고 2회 모두 표적을 찾지 못한 경우에는 AD 마우스를 표적으로 유도하여 위치를 인지할 수 있도록 조치하였다. 각각의 WMT 검사는 5분 정도의 간격을 두었으며 마지막 6일째에는 표적을 제거한 후 동일한 출발지점에서 시작하여 60초 동안 표적을 2번 지나간 때의 시간과 거리를 실험 데이터로 사용하였다.

### 2.4. 뇌 분리

8주간 RE 후 pentobarbital sodium(50mg/kg)을 복강 내 주입시켜 마취하고 난 후, 뇌 조직(hippocampus)을 적출하여 액화 질소에 동결시키고 -80°C의 초저온 냉동기(Bio-Freezer, Forma Science)에 분석시까지 냉동 보관하였다.

### 2.5. western blotting

집단별로 분리된 해마를 Bradford[30]법에 따라 정량하고 단백질을(25-30 $\mu$ g) 10-12% SDS-Polyacrylamide gel을 통해 전기영동 한 후 polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane으로 전이시켰다. 이후 3% BSA가 첨가된 TBS-T 용액으로 1시간 동안 상온에서 반응시키고 각각의 1차 항체(Amyloid-beta, Bcl-2, Bax, ADAM10, RAR $\beta$ , BACE1, ROCK1, SIRT1, PGC-1 $\alpha$ , and  $\beta$ -actin)를 4°C에서 (14시간 이상) 반응시켰다. TBS-T 용액으로 10분간 5회 세척 후 상온에서 2차 항체와 90분 동안 반응시키고 난 후 TBS-T 완충액으로 10분간 5회 세척하였다. 마지막으로 membrane을 WBRL solution(WBLUF0100; Millipore, USA)에 1분동안 발색하고 이미지 분석 시스템(Molecular Imager ChemiDoc XRS System, Bio-Rad, USA)을 이용하여 촬영한 후 Quantity One 1-D Analysis

Software(Bio-Rad, USA) 시스템을 이용하여 단백질 발현 수준을 산출하였다.

### 2.6. 자료처리방법

수집된 자료는 SPSS Statistics 24.0 통계 프로그램을 이용하였으며 각 변인들에 대한 기술 통계치는 평균±표준오차(Mean±SEM)로 산출하였다. 각 집단 및 운동 기간에 따른 변인들의 차이를 확인하기 위해서 이원변량분석(Two-way ANOVA)을 실시한 후, 그 차이를 구체적으로 확인하기 위해 LSD (least significant difference)를 이용하여 사후 검증을 실시하였다. 모든 검증의 통계적인 유의수준은  $\alpha=0.05$ 로 설정하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 저항성 운동이 인지기능에 미치는 영향

인지기능 저하는 AD 질환 모델에서 공통적으로 나타나는 현상으로 많은 선행연구에서 지구성 운동을 통한 인지기능 개선을 보고하였다[12-14]. 이에 본 연구에서는 RE를 통해서도 인지기능 개선 여부가 나타나는지 확인하기 위해 WMT를 수행하였다(Fig. 1). 일반적으로 WMT 검사는 AD 마우스가 출발지점에서 목표 지점까지 도달하는 시간과 거리를 측정하는 방식으로 시간과 거리가 증가 될수록 인지기능이 저하되었다고 해석된다. 본 연구에서 선행연구와 유사하게 TC 집단은 NTC 집단과 비교하여 목표 지점에 도착한 시간과 거리가 통계적으로 유의하게 증가한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 앞서 언급한 것처럼 TC 집단에서 인지기능 감소가 나타난 것으로 해석될 수 있으며 AD 모델을 대상으로 인지기능 감소를 보고한 선행연구와 비슷한 결과를 나타냈다(시간:  $p=.001$ , 거리:  $p=.001$ , Fig. 1A, B). 하지만 8주간 RE를 실시한 결과 non-tg 그룹들에서 시간과 거리의 유의한 차이는 나타나지 않았지만 TRE 집단은 TC 집단과 비교하여 목표 지점까지 도달하는 시간과 거리가 통계적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다(시간:  $p=.001$ , 거리:  $p=.016$ ). 이는 인지기능 저하가 RE를 통해 일부 회복된 것으로 생각되며 지구성 운동을 통해 인지능력 개선을 보고한 선행연구와 일치하는 결과를 나타냈다[12, 14]. 따라서 지구성 운동뿐만 아니라 RE도 AD 질환 모델에서 나타나는 인지기능 저하를 개선시킬 수 있는 효과적인 운동

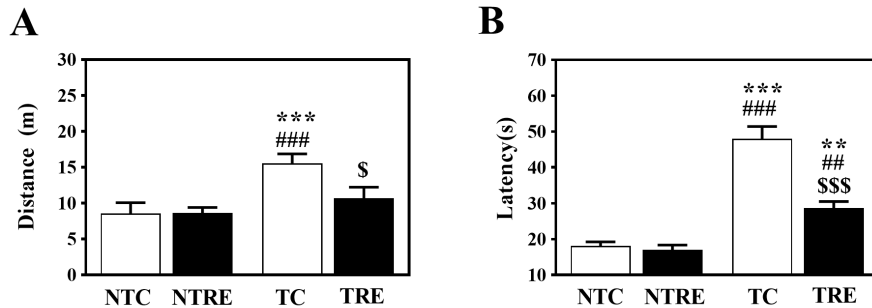


Fig. 1. Resistance exercise improves cognitive deficits in the AD mice model. A) Escape distance of probe test. B) Escape latency of probe test. All bars shown represent the means  $\pm$  SEM ( $n=7$ /group). A LSD post-doc test: \* $p<.05$ , \*\* $p<.01$ , \*\*\* $p<.001$ , compared to the NTC group; # $p<.05$ , ## $p<.01$ , ### $p<.001$  compared to the NTRE group. \$ $p<.05$ , \$\$ $p<.01$ , \$\$\$ $p<.001$  compared to the TC group. NTC: non tg control, NTRE: non tg resistance exercise, TC: tg control, TRE: tg resistance exercise.

방법이라고 생각된다. 최근 일부 경도인지장애 (mild cognitive impairment) 노인을 대상으로 진행된 선행연구에서도 저항성 운동 후 인지기능 개선을 보고하였다[18]. 따라서 본 연구에서 사용된 노화된 AD 질환 모델을 대상으로 RE에 의한 인지기능 개선 효과를 분자생물학적인 메커니즘을 분석하여 확인한다면 치매 질환자에게 나타나는 RE에 의한 인지기능 개선 효과를 과학적으로 밝힐 수 있을 것으로 기대된다.

### 3.2. 저항성 운동이 아밀로이드 단백질 대사와 신경세포사멸에 미치는 영향

인지기능 저하는 뇌 속에 축적된 A $\beta$  단백질과 매우 높은 정적 상관관계를 나타낸다[22, 23]. 따라서 앞서 확인된 RE에 의한 인지기능 개선이 A $\beta$  단백질 축적과 관련이 있는지 확인하였다 (Fig. 2). 예상한 바와 같이 A $\beta$  단백질 발현은 여러 선행연구와 유사하게 TC 집단이 NTC 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가한 것으로 나타났으며( $p=.008$ , Fig. 2B), 이는 앞서 TC 집단에서 인지기능 저하가 나타난 결과를 뒷받침한다. 또한, A $\beta$  단백질 축적에 의한 신경세포사멸은 인지기능 저하를 유도하기 때문에 본 연구에서 신경세포사멸 관련 단백질들을 확인한 결과 (Fig 2E-G), A $\beta$  단백질의 축적이 증가된 TC 집단이 NTC 집단과 비교하여 신경세포사멸 유도 인자인 BCL-2 Associated X(Bax)가 유의하

게 증가하는 것으로 나타났고( $p=.001$ ), 세포사멸 억제 단백질인 B-cell lymphoma 2(Bcl-2)와 Bcl-2/Bax ratio는 유의하게 감소한 것으로 나타났다(Bcl-2:  $p=.001$ , Bcl-2/Bax:  $p=.001$ ). 이러한 결과는 TC 집단에서 축적된 A $\beta$  단백질이 신경세포사멸을 증가시키고 결과적으로 인지기능을 감소시킨 것으로 생각된다. 하지만 8주간 RE를 수행한 TRE 그룹은 TC 그룹과 비교하여 A $\beta$  단백질의 발현이 유의하게 감소 되었으며( $p=.018$ ) 지구성 운동 후 A $\beta$  단백질의 감소를 보고한 선행연구와 비슷한 결과를 나타냈다[12-14]. 또한, RE는 Bax 단백질을 감소시키고( $p=.009$ ), Bcl-2( $p=.001$ ) 및 Bcl-2/Bax ratio( $p=.001$ )를 유의하게 증가시켰다. 이는 TC 집단에서 증가된 신경세포사멸이 일부 완화된 것으로 해석되며 지구성 운동을 통해 A $\beta$  단백질과 그에 따른 신경세포사멸의 감소를 보고한 선행연구와 일치하는 결과를 나타냈다[14, 24]. 이를 종합해 보면 RE에 의한 인지기능 개선은 A $\beta$  단백질과 신경세포사멸의 감소로 나타난 결과라고 생각된다. 하지만 RE를 통해 A $\beta$  단백질의 축적이 어떠한 기전으로 감소되는지 확실히 알려져 있지 않다. 일반적으로 A $\beta$  단백질은 아밀로이드 전구 단백질(amyloid precursor protein: APP)이 각각  $\beta$ -secretase 와  $\gamma$ -secretase 효소에 의해 분절되는 아밀로이드 생성 기전(amyloidogenic pathway)으로 축적되거나  $\alpha$ -secretase 와  $\gamma$

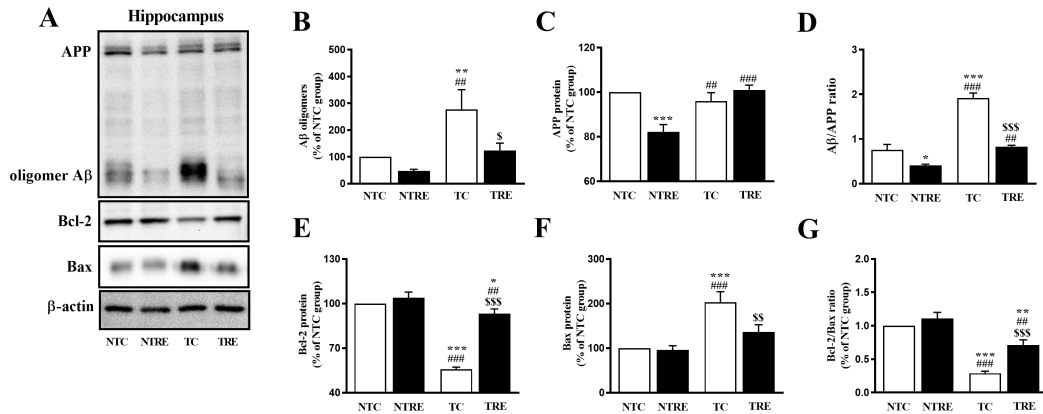


Fig. 2. Resistance exercise reduces  $A\beta$  protein and apoptosis-related factors in the AD mice model. A) Representative blot of western bands for APP, oligomer  $A\beta$ , Bcl-2, and Bax. B-G) Densitometry quantification of the oligomer  $A\beta$ , APP, and  $A\beta$ /APP ratio, Bcl-2, Bax, and Bcl-2/bax ratio. Values are expressed to 100% for levels of NTC group.  $\beta$ -actin was probed as housekeeping gene. All bars shown represent the means  $\pm$  SEM ( $n=4$ /group). A LSD post-doc test: \* $p<.05$ , \*\* $p<.01$ , \*\*\* $p<.001$ , compared to the NTC group; # $p<.05$ , ## $p<.01$ , ### $p<.001$  compared to the NTRE group. \$ $p<.05$ , \$\$ $p<.01$ , \$\$\$ $p<.001$  compared to the TC group. NTC: non tg control, NTRE: non tg resistance exercise, TC: tg control, TRE: tg resistance exercise.

-secretase 효소에 의해 분절되는 비-아밀로이드 생성기전(non-amyloidogenic pathway)으로 축적이 억제된다[25]. 따라서 APP 단백질 대사와 관련된 단백질들의 발현 수준을 분석하는 것은 RE에 의한  $A\beta$  단백질 감소 기전을 보다 명확하게 확인할 수 있을 것으로 생각된다. 이에 본 연구에서 APP 단백질 발현 수준을 확인한 결과 NTRE 집단이 다른 모든 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 감소한 것으로 나타났지만 ( $p=.001$ , respectively), Tg 내 운동 여부에 따라서는 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다 (Fig 2C). 하지만  $A\beta$ /APP ratio 분석한 결과 (Fig 2D) 앞서 언급한 것처럼 NTC 그룹과 비교하여 TC 그룹에서 통계적으로 유의하게 증가한 것으로 나타났다( $p=.008$ ). 이러한 결과는 TC 그룹에서 amyloidogenic pathway가 증가되었거나 혹은 non-amyloidogenic pathway가 억제되어 결과적으로  $A\beta$  단백질 축적이 증가한 것으로 해석될 수 있다. 하지만 8주간 RE는  $A\beta$ /APP ratio를 유의하게 감소시켰으며( $p=.015$ ), 이는 RE가 amyloidogenic pathway를 억제시켜  $A\beta$  단백질 생성을 감소시키거나 혹은 non-

amyloidogenic pathway를 활성화시켜  $A\beta$  단백질을 감소시킨 것이라고 생각된다. 따라서 8주간 RE는 amyloidogenic pathway를 억제시키고 non-amyloidogenic pathway를 활성화시켜 결과적으로  $A\beta$  단백질의 축적을 감소시킨 것으로 생각된다.

### 3.3. 저항성 운동이 amyloidogenic pathway related proteins 발현에 미치는 영향

RE에 의한  $A\beta$  단백질 감소가 amyloidogenic pathway 혹은 non-amyloidogenic pathway 기전에 의한 것인지 구체적으로 확인하기 위해 각각의 분절에 대한 단백질 발현을 확인하였다(Fig. 3). 먼저 non-amyloidogenic pathway 관련 단백질인 ADAM10과 RAR $\beta$  단백질 발현은 TC 집단이 NTC 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 감소한 것으로 나타났다( $p=.001$ , respectively, Fig. 3B,C). 또한, amyloidogenic pathway 관련 단백질인 BACE1과 ROCK1은 TC 집단이 NTC 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가한 것으로 나타났다( $p=.001$ , respectively, Fig. 3D,E). 이는 TC 집단에서 non-amyloidogenic pathway

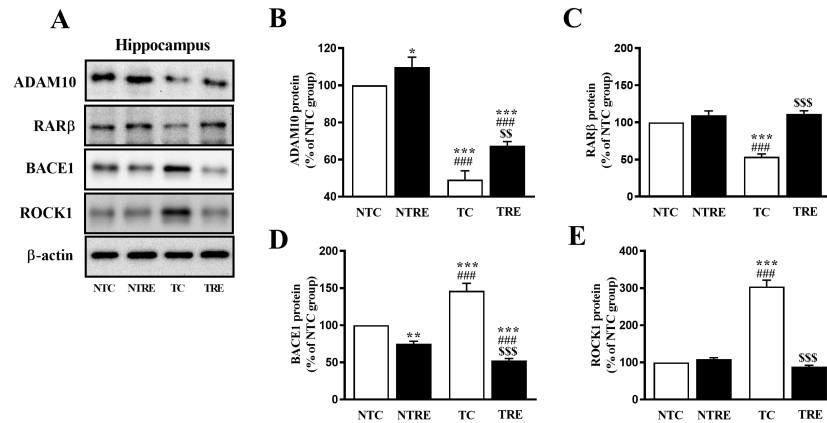


Fig. 3. Resistance exercise activates non-amyloidogenic pathway and reduces amyloidogenic pathway in the AD mice model. A) Representative blot of western bands for ADAM10, RAR $\beta$ , BACE1, and ROCK1. B-E) Densitometry quantification of the ADAM10, RAR $\beta$ , BACE1, and ROCK1. Values are expressed to 100% for levels of NTC group.  $\beta$ -actin was probed as housekeeping gene. All bars shown represent the means  $\pm$  SEM ( $n=4$ /group). A LSD post-doc test: \* $p<.05$ , \*\* $p<.01$ , \*\*\* $p<.001$ , compared to the NTC group; # $p<.05$ , ## $p<.01$ , ### $p<.001$  compared to the NTRE group. \$ $p<.05$ , \$\$ $p<.01$ , \$\$\$ $p<.001$  compared to the TC group. NTC: non tg control, NTRE: non tg resistance exercise, TC: tg control, TRE: tg resistance exercise.

가 억제된 반면 amyloidogenic pathway가 활성화된 것으로 해석되며 결국 TC 집단에서 A $\beta$  단백질의 증가된 이유를 뒷받침한다. 하지만 8주간 RE를 수행한 TRE 집단은 TC 집단과 비교하여 ADAM10과 RAR $\beta$  단백질 발현을 유의하게 증가시켰고( $p=.001$ , respectively) BACE1과 ROCK1 단백질 발현을 유의하게 감소시킨 것으로 나타났다( $p=.001$ , respectively). 이러한 결과는 AD 질환 동물 모델을 대상으로 지구성 운동을 통해 ADAM10과 RAR $\beta$  발현 증가와 BACE1과 ROCK1 단백질 발현 감소를 보고한 선행연구와 일치하는 결과를 나타냈다[14]. 따라서 본 연구에서 8주간의 RE는 non-amyloidogenic pathway를 증가시키고 amyloidogenic pathway를 억제시켜 A $\beta$  단백질 발현을 감소시키고 결과적으로 신경세포사멸을 억제와 함께 인지기능을 개선 시킨 것으로 생각된다.

### 3.4. 저항성 운동이 SIRT1/PGC-1 $\alpha$ 단백질 발현에 미치는 영향

운동은 어떠한 기전으로 A $\beta$  단백질의 생성과 억제에 관여하는 기전을 조절하는지 정확하게 알려지지 않았다. 최근 SIRT1/PGC-1 $\alpha$  기전은 A $\beta$  단백질의 생성과 억제 기전을 조절하는 것으로 보고되었다[26, 27]. 특히 일부 연구에서 SIRT1/PGC-1 $\alpha$ 의 발현 감소는 BACE1을 증가시키고 ADAM10을 감소시켜 A $\beta$  단백질의 축적을 증가시킬 수 있다고 보고하였다[26, 27]. 또한, AD 모델을 이용한 지구성 운동은 SIRT1/PGC-1 $\alpha$ 를 증가시켜 BACE1과 ROCK1 발현 수준을 감소시키고, ADAM10과 RAR $\beta$  발현을 증가시킨 것으로 보고하였다[14]. 이는 지구성 운동을 통한 SIRT1/PGC-1 $\alpha$  기전이 amyloidogenic pathway와 non-amyloidogenic pathway를 조절하여 결과적으로 A $\beta$  단백질을

감소시킨 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서도 RE에 의한 amyloidogenic pathway와 non-amyloidogenic pathway 조절이 SIRT1/PGC-1 $\alpha$  기전에 의해 활성화 혹은 억제되는지 확인한 결과 (Fig 4), TC 집단은 NTC 집단들과 비교하여 SIRT1과 PGC-1 $\alpha$  단백질 발현이 통계적으로 유의하게 감소한 것으로 나타났다( $p=.001$ , respectively, Fig 4B, C). 특히, A $\beta$  단백질과 SIRT1 및 PGC-1 $\alpha$ 의 상호 관련성을 확인한 결과(Fig 4D, E) 두 단백질 모두 부적 상관도를 나타냈다(A $\beta$  and SIRT1:  $r=-0.926$ ,  $p=.001$ ; PGC-1 $\alpha$ :  $r=-0.874$ ,  $p=.001$ ). 따라서 TC 집단에서 증가된 A $\beta$  단백질은 아마도 SIRT1/PGC-1 $\alpha$  기전 감소와 관련이 있을 것으로 생각되며 SIRT1/PGC-1 $\alpha$  기전을 활성화 시키는 것이 A $\beta$  단백질 발현을 감소시킬 수 있는 중요 기전이라고 생각된다. 흥미롭게도 8주간 RE를 실시한 TRE 집단에서 감소된 SIRT1과 PGC-1 $\alpha$  단백질 발현이 TC 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가 되었다( $p=.001$ , respectively). 이러한 결과는 amyloidogenic

pathway와 non-amyloidogenic pathway의 조절과 그에 따른 A $\beta$  단백질의 감소는 RE를 통한 SIRT1/PGC-1 $\alpha$  단백질 발현에 따른 것으로 일부 해석될 수 있다. 따라서 RE에 의한 인지기능 개선은 SIRT1/PGC-1 $\alpha$  발현 증가와 그 하위 기전인 A $\beta$  단백질 대사와 신경세포사멸 감소와 관련이 있는 것으로 생각된다.

#### 4. 결론

본 연구는 RE에 대한 AD의 병리학적 특징인 A $\beta$  단백질 축적과 인지기능에 미치는 영향을 확인하기 위해 A $\beta$  단백질 대사와 그 하위 기전을 확인하고 신경세포사멸 수준을 확인하였다. 먼저 RE는 SIRT1/PGC-1 $\alpha$  기전을 증가시켜 A $\beta$  단백질 생성을 유도하는 amyloidogenic pathway 관련 단백질의 발현을 감소시키고 생성을 억제하는 non-amyloidogenic pathway 관련 단백질을 증가시켜 결과적으로 A $\beta$  단백질 수준을 감소시켰다. 또한, RE에 의한 A $\beta$  단백질 감소는 신경

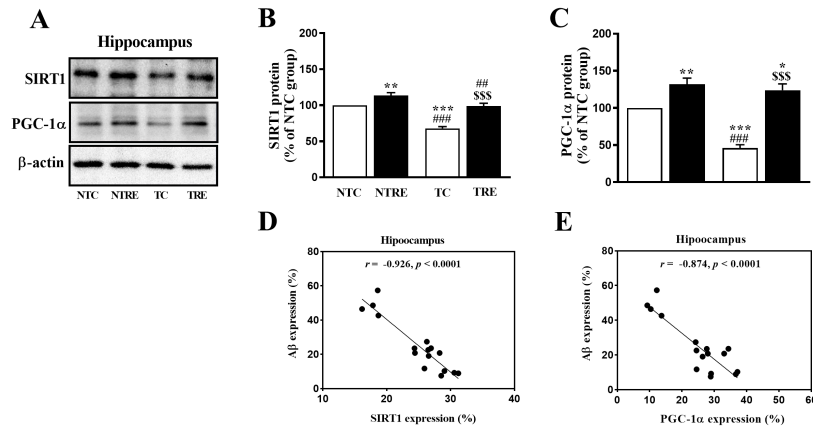


Fig. 4. Resistance exercise activates the level of SIRT1 and PGC-1 $\alpha$  in the AD mice model. A) Representative blot of western bands for SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . B-C) Densitometry quantification of the SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . D-E) Correlation analysis of A $\beta$ -42 and SIRT1 and PGC-1 $\alpha$  ( $n=4$ /group). Values are expressed to 100% for levels of NTC group.  $\beta$ -actin was probed as housekeeping gene. All bars shown represent the means  $\pm$  SEM ( $n=4$ /group). A LSD post-doc test: \* $p<.05$ , \*\* $p<.01$ , \*\*\* $p<.001$ , compared to the NTC group; # $p<.05$ , ## $p<.01$ , ### $p<.001$  compared to the NTRE group. \$ $p<.05$ , \$\$ $p<.01$ , \$\$\$ $p<.001$  compared to the TC group. NTC: non tg control, NTRE: non tg resistance exercise, TC: tg control, TRE: tg resistance exercise.



세포사멸을 억제시켜 인지기능을 개선시킨 것으로 나타났다. 따라서 이를 종합해 보면 RE는 A $\beta$  단백질 대사를 조절할 수 있는 또 하나의 효과적인 운동 형태로 사람에게서 나타나는 RE의 인지능력 개선 효과 기전을 구체적으로 밝힐 수 있는 의미 있는 연구 결과라고 생각한다. 하지만 A $\beta$  단백질 대사를 조절하는 다양한 기전(인슐린 신호전달, 소포체 스트레스, 오토파지, 미토콘드리아 기능)들이 존재하기 때문에 RE 운동에 대한 보다 구체적인 기전연구가 필요하다고 생각된다.

### 감사의 글

\*This work was supported by the Ministry of Education of the Republic of Korea and the National Research Foundation of Korea (NRF-2018S1A5A2A02070874)

### References

1. H. J. Nam, S. H. Hwang, Y. J. Kim, K. W. Kim, "Korean Dementia observatory 2018", Seoul Central Dementia Center, *Ministry of Health and Welfare*, (2018).
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. G Botteri, L Salvadó, A. Gumà, Lee D. Hamilton, P. J. Meakin, G. Montagut, M. L. J. Ashford, V. Ceperuelo-Mallafre, S. Fernández-Veledo, J. Vendrell, M. Calderón-Dominguez, D. Serra, L. Herrero, J. Pizarro, E. Barroso, X. Palomer, M. Vázquez-Carrera, "The BACE1 product sAPP $\beta$  induces ER stress and inflammation and impairs insulin signaling", *Metabolism*, Vol.85, pp. 59-75, (2018).
4. P. H. Reddy, X. Yin, M. Manczak, S. Kumar, J. A. Pradeepkiran, M. Vijayan, A. P. Reddy, "Mutant APP and amyloid beta-induced defective autophagy, mitophagy, mitochondrial structural and functional changes and synaptic damage in hippocampal neurons from Alzheimer's disease", *Human molecular genetics*, Vol.27, No.14 pp. 2502-2516, (2018).
5. R. J. Mullins, T. C. Diehl, C. W. Chia, D. Kapogiannis, "Insulin resistance as a link between Amyloid-Beta and Tau pathologies in Alzheimer's disease", *Frontiers in Aging Neuroscience*, Vol.9, pp. 118, (2017).
6. V. Sharma, P. Nagu, R. Thakur, P. Sharma, H. Kumar, "Amyloid Beta Mediated Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's disease: A Mini Review", *Current Pharma Research*, Vol.9, No.3 pp. 2981-2990, (2019).
7. W. H. Organization, "Risk reduction of cognitive decline and dementia: WHO guidelines", in Risk reduction of cognitive decline and dementia: *WHO guidelines*. pp. 401-401, (2019).
8. L. A. van der Kleij, E. T. Petersen, H. R. Siebner, J. Hendrikse, K. S. Frederiksen, N. A. Sobol, S. G. Hasselbalch, E. Garde, "The effect of physical exercise on cerebral blood flow in Alzheimer's disease", *NeuroImage: Clinical*, Vol20, pp. 650-654, (2018).
9. T. Matsui, H. Omuro, Y. F. Liu, M. Soya, T. Shima, B. S. McEwen, H. Soya, "Astrocytic glycogen-derived lactate fuels the brain during exhaustive exercise to maintain endurance capacity", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol114, No.24 pp. 6358-6363, (2017).
10. H. C. Park, J. U. Cheon, "Effects of 16-week Combined Exercise on Dementia, Depression, and Cognitive Function in Elderly Women", *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol36, No.2 pp. 456-467, (2019).
11. F. Liang, T. Huang, B. Li, Y. Zhao, X. Zhang, B. Xu, "High-intensity interval training and moderate-intensity continuous training alleviate  $\beta$ -amyloid deposition by

- inhibiting NLRP3 inflammasome activation in APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mice”, *NeuroReport*, Vol31, No.5 pp. 425–432, (2020).
12. B. Zeng, G. Zhao, H. L. Liu, “The differential effect of treadmill exercise intensity on hippocampal soluble  $\alpha\beta$  and lipid metabolism in APP/PS1 mice”, *Neuroscience*, Vol430, pp. 73–81, (2020).
  13. L. Woost, P. L. Bazin, M. Taubert, R. Trampel, C. L. Tardif, A. Garthe, G. Kempermann, U. Renner, G. Stalla, D. V. M. Ott, V. Rjosk, H. Obrig, A. Villringer, E. Roggenhofer, T. A. Klein, “Physical exercise and spatial training: a longitudinal study of effects on cognition, growth factors, and hippocampal plasticity”, *Scientific reports*, Vol8, No.1 pp. 1–13, (2018).
  14. J. H. Koo, E. B. Kang, Y. S. Oh, D. S. Yang, J. Y. Cho, “Treadmill exercise decreases amyloid- $\beta$  burden possibly via activation of SIRT-1 signaling in a mouse model of Alzheimer's disease”, *Experimental neurology*, Vol288, No.5 pp. 142–152, (2017).
  15. C. McGlory, M. C. Devries, S. M. Phillips, “Skeletal muscle and resistance exercise training: the role of protein synthesis in recovery and remodeling”, *Journal of Applied Physiology*, Vol122, No.3 pp. 541–548, (2017).
  16. E. M. P. ortugal, P. G. Vasconcelos, R. Souza, E. Lattari, R. S. Monteiro-Junior, S. Machado, A. C. Deslandes, “Aging process, cognitive decline and Alzheimers disease: can strength training modulate these responses?”, *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, Vol14, No.9 pp. 1209–1213, (2015).
  17. K. J. Marston, M. J. Newton, B. M. Brown, S. R. Rainey-Smith, S. Bird, R. N. Martins, J. J. Peiffer., “Intense resistance exercise increases peripheral brain-derived neurotrophic factor”, *Journal of science and medicine in sport*, Vol20, No.10 pp. 899–903, (2017).
  18. K. M. Broadhouse, M. F. Singh, C. Suo, N. Gates, W. Wen, H. Brodaty, N. Jain, G. C. Wilson, J. Meiklejohn, N. Singh, B. T. Baune, M. Baker, N. Foroughi, Y. Wang, N. Kochan, K. Ashton, M. Brown, Z. Li, Y. Mavros, P. S. Sachdev, M. J. Valenzuela, “Hippocampal plasticity underpins long-term cognitive gains from resistance exercise in MCI”, *NeuroImage: Clinical*, Vol25, pp. 102–182, (2020).
  19. M. C. Chang, A. Y. Lee, S. Kwak, S. G. Kwak, “Effect of resistance exercise on depression in mild Alzheimer disease patients with sarcopenia”, *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, Vol28, No.5 pp. 587–589, (2019).
  20. S. E. Lamb, D. Mistry, S. Alleyne, N. Atherton, D. Brown, B. Copsey, S. Dosanjh, S. Finnegan, B. Fordham, F. Griffiths, S. Hennings, I. Khan, K. Khan, R. Lall, S. Lyle, V. Nichols, S. Petrou, P. Zeh, B. Sheehan, “Aerobic and strength training exercise programme for cognitive impairment in people with mild to moderate dementia: the DAPA RCT”, *Health Technology Assessment*, Vol22, No.28 pp. 1–202, (2017).
  21. T. M. Vital, S. S. S. Hernández, R. V. Pedroso, C. V. L. Teixeira, M. Garuffi, A. M. Stein, J. L. R. Costa, F. Stella, “Effects of weight training on cognitive functions in elderly with Alzheimer's disease”, *Dementia & neuropsychologia*, Vol6, No.4 pp. 253–259, (2015).
  22. J. P. Cleary, D. M. Walsh, J. J. Hofmeister, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, Ashe KH, “Natural oligomers of the amyloid- $\beta$  protein specifically disrupt cognitive function”, *Nature neuroscience*, Vol8, No.1 pp. 79–84, (2005).
  23. L. R. Clark, A. M. Racine, R. L. Kosciak, O. C. Okonkwo, C. D. Engelman, C. M. Carlsson, S. Asthana, B. B. Bendlin, R.

- Chappell, C. R. Nicholas, H. A. Rowley, J. M. Oh, B. P. Hermann, M. A. Sager, B. T. Christian, S. C. Johnson, "Beta-amyloid and cognitive decline in late middle age: Findings from the Wisconsin Registry for Alzheimer's Prevention study", *Alzheimer's & Dementia*, Vol12, No.7 pp. 805-814, (2016).
24. H. S. Um, E. B. Kang, J. H. Koo, H. T. Kim, Jin-Lee, E. J. Kim, C. H. Yang, G. Y. An, I. H. Cho, J. Y. Cho, "Treadmill exercise represses neuronal cell death in an aged transgenic mouse model of Alzheimer's disease", *Neuroscience research*, Vol69, No.2 pp. 161-173, (2011).
25. F. Kamenetz, T. Tomita, H. Hsieh, G. Seabrook, D. Borchelt, T. Iwatsubo, S. Sisodia, R. Malinow, "APP processing and synaptic function", *Neuron*, Vol37, No.6 pp. 925-937, (2003).
26. G. Marwarha, S. Raza, C. Meiers, O. Ghribi, "Leptin attenuates BACE1 expression and amyloid- $\beta$  genesis via the activation of SIRT1 signaling pathway", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, Vol1842, No.9 pp. 1587-1595, (2014).
27. H. R. Lee, H. K. Shin, S. Y. Park, H. Y. Kim, W. S. Lee, B. Y. Rhim, K. W. Hong, C. D. Kim, "Cilostazol suppresses  $\beta$ -amyloid production by activating a disintegrin and metalloproteinase 10 via the upregulation of SIRT1-coupled retinoic acid receptor- $\beta$ ", *Journal of neuroscience research*, Vol92, No.11 pp. 1581-1590., (2014).
28. Y. I. Kim, D. P. Ok, S. Y. Cho, "The Effects of Regular Taekwondo Exercise on Brain wave activation and Neurotrophic Factors in Undergraduate male students", *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol35, No.2 pp. 412-422., (2018).
29. D. Y. Hwang, K. R. Chae, T. S. Kang, J. H. Hwang, C. H. Lim, H. K. Kang, J. S. Goo, M. R. Lee, H. J. Lim, S. H. Min, J. Y. Cho, J. T. Hong, C. W. Song, S. G. Paik, J. S. Cho, Y. K. Ki, "Alterations in behavior, amyloid beta-42, caspase-3, and Cox-2 in mutant PS2 transgenic mouse model of Alzheimer's disease", *Federation of American Societies for Experimental Biology*, Vol16 No.8 pp. 805-813., (2002).
30. L. W. Bradford, "Problems of ethics and behavior in the forensic sciences", *Journal of forensic sciences*, Vol21, No.2 pp. 763-768., (1976).
31. K. Bromley-Brits, Y. Deng, W. Song, "Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice", *Journal of Visualized Experiments*, Vol53, e2920, (2011).