

# 트레드밀 운동이 파킨슨 유도 모델 쥐의 $\alpha$ -synuclein 발현과 미토콘드리아 구조적 역동성에 미치는 영향

구정훈

한국체육대학교 운동생화학실

## The Effect of Treadmill Exercise on $\alpha$ -synuclein and Mitochondrial Dynamic in The Mouse Model of Parkinson's Disease

Jung-Hoon Koo

Department of Exercise Biochemistry, Korea National Sport University, Seoul, Korea

**PURPOSE:** The purpose of this study was to investigate the effects of treadmill exercise on motor function,  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn), neuronal cell survival, mitochondrial dynamic-related proteins, and sirtuin-3 (SIRT-3) in the MPTP-induced mice model of Parkinson's disease (PD).

**METHODS:** Twenty four mice model of PD were divided into three groups: (1) Sham control (Sham, n=8), (2) MPTP treatment (MPTP, n=8), and (3) MPTP-Exercise (MPTP-E, n=8). MPTP-E mice group were performed to exercise on a treadmill for 8 weeks (12 m/min, 60 min/day, 5 days/week). In addition, we conducted Rota-rod test to evaluate the motor function. And then, substantia nigra (SN) was evaluated to determine whether any changes in the  $\alpha$ -syn, neuronal cell survival, SIRT-3, mitochondrial fission, and fusion proteins.

**RESULTS:** Treadmill exercise rescued motor deficits by reducing  $\alpha$ -syn expression and alleviating neuronal cell death in the MPTP-induced mice model of PD. In addition, treadmill exercise increased mitochondrial fusion-related protein (Opa1, Mfn1, Mfn2) and decreased mitochondrial fission-related protein (Fis1, Drp1) possibly via activating SIRT-3 expression in the MPTP-induced mice model of PD.

**CONCLUSIONS:** Treadmill exercise improved motor function by inhibiting neurotoxicity and improving mitochondrial dynamic via reducing  $\alpha$ -syn expression and activating SIRT-3 expression. These results indicating that improving mitochondrial dysfunction via treadmill exercise may be potent strategy to alleviate the PD pathogenesis.

**Key words:** Parkinson's disease,  $\alpha$ -synuclein, Treadmill exercise, Mitochondrial dynamic, Sirtuin-3

## 서론

파킨슨질환(Parkinson's Disease, PD)은 알츠하이머질환(Alzheimer's disease) 다음으로 환자 수가 많은 신경퇴행성질환으로 운동완서(bradykinesia), 자세반사이상(postural reflex) 및 강직(rigidity) 등의 운동성 장애가 나타난다[1,2]. 현재까지 파킨슨질환에 대한 정확한 발병기전과 치료책은 알려져 있지 않지만, 중뇌 흑질(substantia nigra, SN)에 존

재하는 도파민 신경세포의 감소와 비정상적인 단백질의 응집체인 루이소체(lewy bodies, LBs)가 병리학적 특징으로 제시되고 있다[3]. 이중 루이소체의 주성분으로 알려진  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn) 단백질은 주로 시냅스 전 종말에서 신경전달물질을 방출하는 역할을 담당하지만 비정상적으로 과도하게 축적되면 산화적 스트레스를 증가시켜 도파민 신경세포의 소실과 함께 운동기능의 장애를 일으킨다[4,5]. 또한,  $\alpha$ -syn 단백질의 축적은 mtDNA 손상, 단백질 분해 기능저하, 미토콘드리아

Corresponding author: Jung Hoon Koo Tel +82-10-2275-6129 Fax +82-2-410-6945 E-mail mt634@knsu.ac.kr

Keywords 파킨슨질환, 알파뉴시클린, 미토콘드리아 역동성, 서투인-3

Received 26 Jul 2016 Revised 8 Aug 2016 Accepted 23 Aug 2016

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

관련 효소들의 활성을 감소시켜 미토콘드리아 기능이상을 일으키는 것으로 보고되었다[6-10].

미토콘드리아(mitochondria)는 ATP 생산, 칼슘의 항상성, 세포의 생존 및 성장에 매우 중요한 세포소기관이다. 특히, 신경세포의 미토콘드리아는 신경전달물질을 분비하기 위해 필요한 에너지를 공급하여 신경세포의 성장과 기능을 조절한다[11]. 일반적으로 미토콘드리아의 구조는 미토콘드리아 융합(fusion)과 분열(fission)에 의해 결정되며, 이러한 반복적인 과정을 통해 세포의 항상성이 조절되지만 이러한 역동성의 균형이 무너지면 산화적 스트레스를 일으키고 결국 병리학적으로 진행되는 것으로 보고되었다[11]. 따라서 미토콘드리아의 구조와 기능을 유지하기 위해 미토콘드리아 역동성(mitochondria dynamic)을 정상적으로 유지하는 것이 신경세포의 생존과 성장에 중요하다고 볼 수 있다.

하지만 최근  $\alpha$ -syn 단백질의 축적은 미토콘드리아 역동성의 장애를 일으켜 미토콘드리아의 구조와 기능을 저하시킨다고 제시되고 있는데, Xie et al. [12]과 Kamp et al. [13]은 과 발현된  $\alpha$ -syn 단백질이 미토콘드리아 융합을 감소시키고 분열을 증가시켜 미토콘드리아 분절과 함께 미토콘드리아 기능이상을 일으키는 것으로 보고하였다. 또한,  $\alpha$ -syn의 축적은 미토콘드리아 분열을 일으키는 dynamin related protein 1 (Drp 1) 단백질의 활성을 증가시켜 미토콘드리아 구조 이상과 신경세포의 사멸을 일으킨다고 보고되었다[14,15]. 따라서  $\alpha$ -syn 단백질을 감소시키는 것은 미토콘드리아 역동성을 정상적으로 유지하여 미토콘드리아 구조와 기능을 개선시킬 수 있는 효과적인 방법이라고 생각된다.

최근 신체활동은 신경퇴행성 질환과 관련되어 신경재생, 신경세포 생존, 행동장애, 인지기능 및 미토콘드리아 기능 개선에 효과적인 방법으로 제시되고 있다[16-18]. 특히, 파킨슨질환을 대상으로 트레드밀 운동은 tyrosine hydroxylase (TH)의 활성을 증가시켜 도파민 신경세포의 소실을 억제하고[19], 신경성장인자인 brain-derived neurotrophic factor (BDNF)와 신경가소성을 회복시켜[20,21] 운동기능의 장애가 개선된 것으로 보고되었다. 또한 트레드밀 운동은 파킨슨질환의 병리학적으로 특징인  $\alpha$ -syn 단백질의 발현을 감소시키고 산화적 스트레스를 완화시키는 항산화 효소들의 활성을 증가시키는 것으로 보고하였다[22]. 따라서 운동에 의한  $\alpha$ -syn 단백질과 산화적 스트레스의 감소는 파킨슨질환에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 생각될 뿐만 아니라 미토콘드리아 역동성의 장애를 일부 개선시킬 수 있을 가능성을 제시할 수 있지만 아직까지 파킨슨질환 유도 모델 동물을 대상으로 운동에 의한  $\alpha$ -syn 단백질과 미토콘드리아 역동성의 관계를 살펴본 연구는 매우 부족한 실정이다. 흥미롭게도 미토콘드리아 기능이상이 파킨슨질환의 병리학적 특징으로 보고되면서, 운동에 의한  $\alpha$ -syn 단백질의 감소가 미토콘드리아 기능개선에 미치는 영향을 확인하는 것은 운동이 파킨슨질환에 긍정적인 영향을 미친다는 메커니즘을 구체적으로 제시할 수 있을

것으로 생각된다.

따라서 본 연구의 목적은 1-methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) 약물을 투여한 파킨슨질환 모델 쥐를 대상으로 8주간의 트레드밀 운동을 통해 흑질의  $\alpha$ -syn 단백질 발현과 미토콘드리아 역동성에 미치는 영향을 확인하는 데 있다.

## 연구 방법

### 1. 연구 대상

본 연구에서 사용된 실험동물은 C57BL/6 마우스를(n=24, 8주령) 분양 받아 K 대학교 동물사육실온도  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도 50%, 주간(08:00-20:00)에 점등, 야간(20:00-08:00)에 소등)에서 사육하였다. 집단은 생리 식염수를 투여하는 Sham집단(n=8, Sham), MPTP 투여집단(n=8, MPTP) 및 MPTP 투여 후 트레드밀 운동집단(n=8, MPTP-E)으로 총 3 집단으로 구분하였으며, 실험기간 동안 식이량과 수분섭취는 제한 없이 공급하였다.

### 2. 연구절차

#### 1) 파킨슨질환 마우스 모델 확립

본 실험에서 만성 파킨슨질환 마우스 모델을 확립하기 위해 복강 내에 25 mg/kg의 1-methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP, Sigma-Aldrich)와 흡수를 돕기 위한 항 보강제인 Probenecid (Sigma-Aldrich, 250 mg/kg)을 복강(intraperitoneal)에 총 10회(2회/주, 5주간) 투여하였다. 투여 방법과 절차는 Lau et al. [23]가 제시한 방법을 적용하여 실시하였다.

#### 2) 운동기능 검사(Rota-rod test)

본 연구는 동물모델의 운동협응 기능과 균형 감각을 평가하기 위해 Rota-rod test (five onin acclerating retardod; JD-A-07, Jeung do, Korea)를 이용하였다. 본 검사 전 실험동물을 120초 동안 10 rpm의 속도로 회전 원통에서 사전적응훈련을 실시하였으며, 본 검사에서는 회전속도를 5-40 rpm까지 점진적으로 증가시켜 진행하였다. 300초의 최대 수행제한 시간 내에서 실험동물이 떨어지는 시간을 2회 측정하여 평균값을 기록하였다.

#### 3) 트레드밀 운동 프로그램

실험동물은 rodent 트레드밀(8Lanes, Daemyung Scientific Co, Ltd, Korea)을 이용하여 1주간 사전 적응훈련(10 min/day, 10 m/min, 5 days/week)을 실시하였다. 이후 처음 2주 동안(10 m/min, 30 min/day, 5 days/week) 운동을 실시하고 점진적으로 운동 강도를 증가시켜 마지막 8주 동안에는 12 m/min 속도로 60분간 실시하였다. 운동 프로그램은 이들의 운동수행능력을 Lau et al. [23]가 제시한 운동 프로그램을 수정하

여 실시하였다.

#### 4) 뇌 적출

8주간 트레드밀 운동과 운동기능검사를 실시한 후 pentobarbital sodium (50 mg/kg)을 복강 내 주입시켜 마취시킨 후, 중뇌 흑질을 적출하여 미토콘드리아를 분리하고 남은 조직은 액화질소에 동결시켜 분석 시까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 의 초저온 냉동기(Bio-Freezer, Forma Science, USA)에 냉동 보관하였다.

#### 5) 미토콘드리아 분리

미토콘드리아 분리는 Mitochondria Extraction Kit (IMGEX Corporation, San Diego, CA, USA)을 이용하였다. 분석은 뇌 조직 100 mg 당 1 mL의 homogenizing buffer를 넣어 균질화시킨 후,  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 3,000 rpm으로 원심 분리하고 분리된 상층액을 다시  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 12,000 rpm으로 원심 분리하였다. 원심분리한 상층액(cytosolic fraction)은 세포질로 분리하고 남은 pellet을 1 mL의 suspension buffer를 넣어 잘 섞어 준 다음 다시  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 12,000 rpm으로 원심 분리하였다. 이후 상층액을 제거 후 1회 더 suspension buffer 1 mL을 넣고 잘 섞어 준 후 다시  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 12,000 rpm으로 원심분리해서 상층액을 제거한 후 남은 pellet은 1 mL의 Complete Mitochondrial lysis buffer를 넣어  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 녹인 후 분리된 mitochondrial extract를  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 12,000 rpm으로 원심 분리하여 획득한 상층액(mitochondria fraction)을 분리하고 총 단백질량은 BSA (Bovine Serum Albumin, 570 nm)를 이용하여 정량하였다.

#### 6) Western blot

집단 별로 분리된 뇌 조직의 미토콘드리아와 세포질의 총 단백질량을 정량하고 준비된 단백질은 20-30  $\mu\text{g}$ 으로 7.5-12% SDS-Polyacrylamide gel에서 전기영동 후 membrane으로 전이시키고, 5% BSA가 첨가된 1×TBS-T 용액으로 90시간 동안 실온에서 blocking 시킨 후, 각각의 1차 항체와  $4^{\circ}\text{C}$ 에서(9-12시간) 반응시켰다. 이후 TBS-T 완충액으로 8분간 5회 세척 후 2차 항체와 실온에서 90분 동안 반응시킨 후에 다시 TBS-T 완충액으로 8분간 5회 세척 후, WB LR 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 이용하여 스캔한 후 Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad, USA)를 이용하여 단백질량을 분석하였다.

#### 7) Immunofluorescence (IF)

각 집단에서 선택된 뇌 조직 샘플(40  $\mu\text{m}$ )을 자유부유법(Free-float-

ing method)을 이용하여 10 mM PBS로 각 5분씩 3번 세척하고 0.01 M Sodium Citrate buffer에 담겨  $90^{\circ}\text{C}$ 에서 60분 동안 반응시켜 항원복구 과정(Antigen retrieval)을 진행한 후 PBS로 5분씩 4번 세척하였다. 항원의 비 특이적 결합을 막기 위해 10% Normal donkey serum을 이용하여 실온에서 60분 동안 반응시킨 후 1차 항체인 anti- $\alpha$ -synuclein (BD bioscience, bd610787, USA) 단백질을 24시간 동안  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 반응시켰다. 이후, 조직샘플을 5분 4번씩 세척한 후 실온에서 2시간 동안 2차 항체 (cy3 conjugated donkey anti-mouse; 1:200 dilution, Jackson Immunochemicals, West Grove, PA, USA)에 반응시켰다. 4번의 세척과정을 거친 후 각 조직은 슬라이드에 옮겨 마운팅 용액과 함께 봉입하고, immunofluorescence microscope (Leica Microsystems, TCS SP8, Germany) 이용하여 실험결과물을 분석하였다.

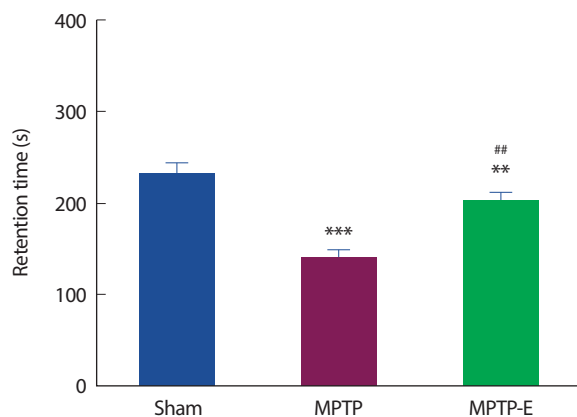
### 3. 자료처리방법

수집된 자료는 SPSS 18.0의 하위 프로그램을 이용하여 기술 통계치 (mean  $\pm$  SD)를 산출하고, 집단 간에 따른 종속변인들 간의 차이 여부 검증은 일원변량분석(One way ANOVA)을 실시하였다. 집단 간 유의한 차이가 나타날 경우 Bonferroni 방법을 이용하여 사후검증을 실시하였다. 이때 가설수락 수준은  $\alpha = .05$ 로 설정하였다.

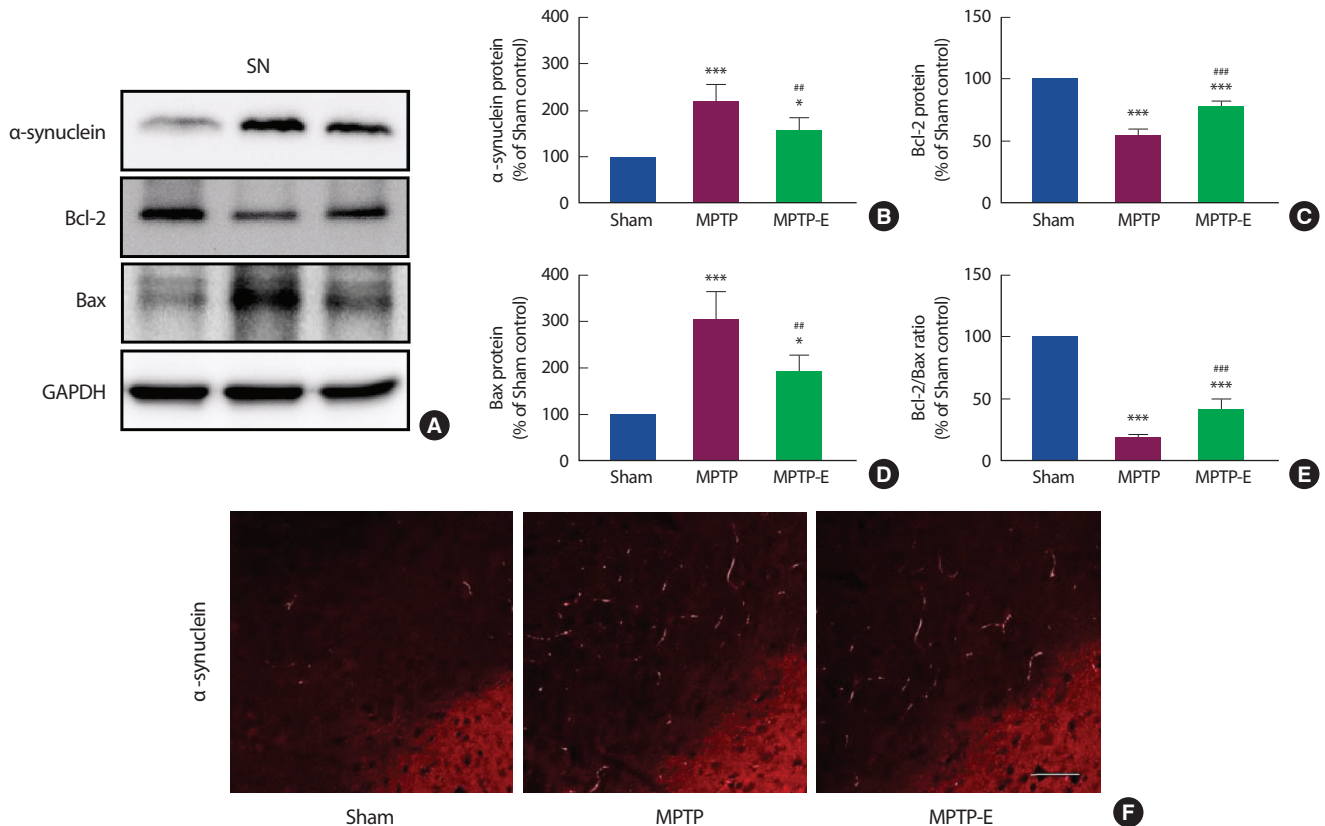
## 연구 결과

### 1. 트레드밀 운동에 의한 Rota-Rod test 변화

8주간 트레드밀 운동 후 운동기능 능력을 평가하기 위해 Rota-Rod 검사를 실시하였다(Fig. 1). 운동유지 시간은 집단 간 통계적으로 유의한 차이가 나타나 사후검증을 실시한 결과 [ $F_{(2,21)} = 24.31, p = .001$ ], MPTP



**Fig. 1.** Treadmill exercise rescued motor deficits in the MPTP-induced mice model of AD. The retention time. Values are expressed to 100% for levels of Sham mice. All bars shown represent the means  $\pm$  SEM. A Bonferroni post-doc test: \*\* $p < .01$ , \*\*\* $p < .001$ , compared with the Sham mice; ## $p < .01$ , compared with the MPTP mice. Sham-control (Sham), MPTP treatment (MPTP), and MPTP treadmill exercise (MPTP-E).



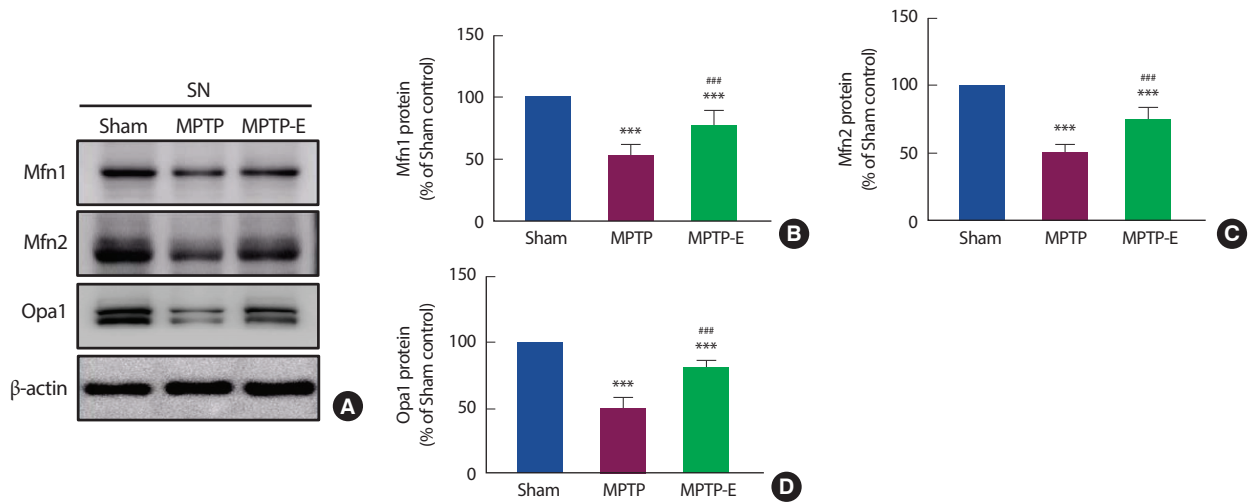
**Fig. 2.** Treadmill exercise reduces  $\alpha$ -synuclein expression and alleviated neuronal cell death in the MPTP-induced mice model of AD. (A) Representative blot of western bands for  $\alpha$ -synuclein, Bcl-2, and Bax ( $n=5$ ). (B-E) Densitometry quantification of  $\alpha$ -synuclein, Bcl-2, Bax, and Bcl-2/Bax ratio. (F) Immunofluorescence analysis of  $\alpha$ -synuclein from each group are shown ( $n=3$ ). Values are expressed to 100% for levels of Sham mice. GAPDH was probed as housekeeping gene. All bars shown represent the means  $\pm$  SEM. A Bonferroni post-doc test: \* $p < .05$ , \*\* $p < .01$ , \*\*\* $p < .001$ , compared with the Sham mice; # $p < .01$ , ### $p < .001$ , compared with the MPTP mice. Sham-control (Sham), MPTP treatment (MPTP), and MPTP treadmill exercise (MPTP-E).

집단은 Sham 집단과 비교하여 운동유지 시간이 통계적으로 유의하게 감소된 것으로 나타났다( $p < .001$ ). 한편, 트레드밀 운동을 실시한 MPTP-E 집단은 MPTP 집단과 비교하여 운동유지 시간이 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 나타났고( $p < .01$ ), Sham 집단과는 유의하게 감소된 것으로 나타났다( $p < .01$ ).

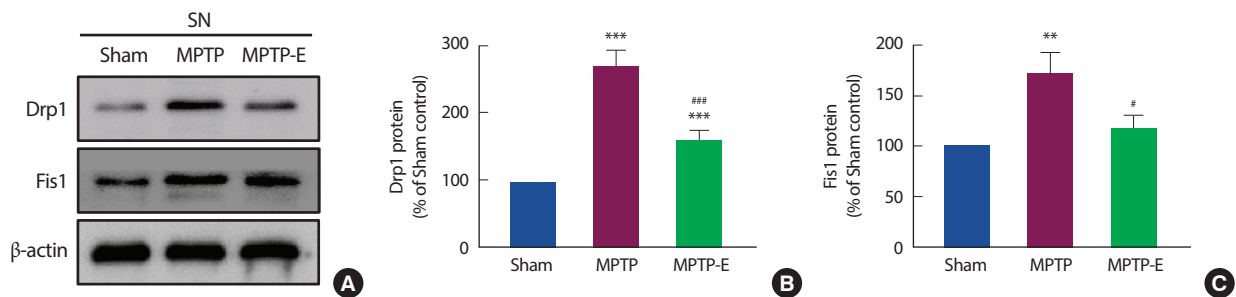
## 2. 트레드밀 운동에 의한 $\alpha$ -syn 단백질과 신경세포사멸의 변화

8주간 트레드밀 운동 후  $\alpha$ -syn 단백질 발현수준을 확인한 결과(Fig. 2B), 집단 간 통계적으로 유의한 차이가 나타나 사후검증을 실시하였다( $F_{(2,12)} = 24.22, p = .001$ ). MPTP 집단은 Sham 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 나타났다( $p < .001$ ). 반면 트레드밀 운동을 실시한 MPTP-E 집단은 MPTP 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 감소된 것으로 나타났고( $p < .01$ ), Sham 집단과는 유의하게 증가된 것으로 나타났다( $p < .05$ ). 면역형광염색 또한 단백질 수준과 유사하게 MPTP 집단에서 광범위하게 염색된 반면 운동을 실시한 MPTP-E 집단에서 감소된 것으로 나타났(Fig. 2F). 또한  $\alpha$ -syn 단백질에 의한 신경세포사멸 관련 단백질 수준을 확인한 결과(Fig. 2C-E), 집단 간 통계

적으로 유의한 차이가 나타나 사후검증을 실시하였다[Bcl-2:  $F_{(2,12)} = 223.13, p = .001$ , Bax:  $F_{(2,12)} = 29.18, p = .001$ , Bcl-2/Bax ratio:  $F_{(2,12)} = 271.27, p = .001$ ]. 먼저 Bcl-2 단백질은(Fig. 2C), MPTP 집단이 Sham 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 감소된 것으로 나타났다( $p < .001$ ). 반면 트레드밀 운동을 실시한 MPTP-E 집단은 MPTP 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 나타났고( $p < .001$ ), Sham 집단과는 통계적으로 유의하게 감소된 것으로 나타났다( $p < .001$ ). Bax 단백질은(Fig. 2D), MPTP 집단이 Sham 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 나타났다( $p < .001$ ). 반면 트레드밀 운동을 실시한 MPTP-E 집단은 MPTP 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 감소된 것으로 나타났고( $p < .01$ ), Sham 집단과는 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 나타났(Fig. 2E). 마지막으로 Bcl-2/Bax ratio (Fig. 2E)는 MPTP 집단이 Sham 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 감소되었지만( $p < .001$ ), 트레드밀 운동을 실시한 MPTP-E 집단은 MPTP 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 나타났고( $p < .001$ ), Sham 집단과는 통계적으로 유의하게 감소된 것으로 나타났(Fig. 2E).



**Fig. 3.** Treadmill exercise increases Mfn1, Mfn2, and Opa-1 expression in the MPTP-induced mice model of AD. A) Representative blot of western bands for Mfn1, Mfn2, and Opa-1 (n=5). B-D) Densitometry quantification of Mfn1, Mfn2, and Opa-1. Values are expressed to 100% for levels of Sham mice.  $\beta$ -actin was probed as housekeeping gene. All bars shown represent the means  $\pm$  SEM. A Bonferroni post-doc test: \*\*\* $p < .001$ , compared with the Sham mice; \*\*\* $p < .001$ , compared with the MPTP mice. Sham-control (Sham), MPTP treatment (MPTP), and MPTP treadmill exercise (MPTP-E).



**Fig. 4.** Treadmill exercise decreases Drp1 and Fis1 expression in the MPTP-induced mice model of AD. A) Representative blot of western bands for Drp1 and Fis1 (n=5). B-C) Densitometry quantification of Drp1 and Fis1. Values are expressed to 100% for levels of Sham mice.  $\beta$ -actin was probed as housekeeping gene. All bars shown represent the means  $\pm$  SEM. A Bonferroni post-doc test: \*\* $p < .01$ , \*\*\* $p < .001$ , compared with the Sham mice; # $p < .05$ , \*\*\* $p < .001$ , compared with the MPTP mice. Sham-control (Sham), MPTP treatment (MPTP), and MPTP treadmill exercise (MPTP-E).

### 3. 트레드밀 운동에 의한 Mfn1, Mfn2 및 Opa1 단백질 변화

8주간 트레드밀 운동 후 미토콘드리아 합성에 관련된 단백질인 Mfn1, Mfn2 및 Opa1을 확인한 결과(Fig. 3), 집단 간 통계적으로 유의한 차이가 나타나 사후검증을 실시하였다[Mfn1:  $F_{(2,12)} = 796.43, p = .001$ , Mfn2:  $F_{(2,12)} = 216.54, p = .001$ , Opa1:  $F_{(2,12)} = 234.99, p = .001$ ]. Mfn1, Mfn2 및 Opa1 단백질 모두(Fig. 3B-D), MPTP 집단이 Sham 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 감소된 것으로 나타났다( $p < .001$ ). 반면, 트레드밀 운동을 실시한 MPTP-E 집단은 MPTP 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 나타났고( $p < .001$ ), Sham 집단과는 통계적으로 유의하게 감소된 것으로 나타났( $p < .001$ ).

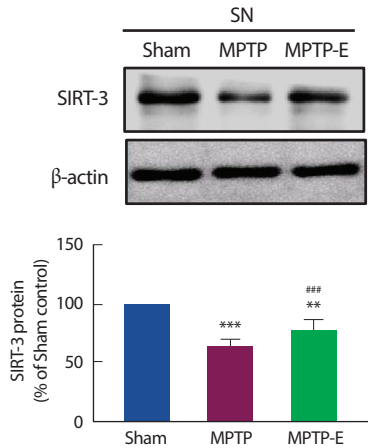
### 4. 트레드밀 운동에 의한 Drp1과 Fis1 단백질 변화

8주간 트레드밀 운동 후 미토콘드리아 분열과 관련된 단백질 수준을 확인한 결과(Fig. 4), 집단 간 통계적으로 유의한 차이가 나타나 사

후검증을 실시하였다[Drp1:  $F_{(2,12)} = 130.19, p = .001$ , Fis1:  $F_{(2,12)} = 7.60, p = .007$ ]. Drp1 단백질은(Fig. 4B), MPTP 집단이 Sham 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 나타났( $p < .001$ ). 반면, 트레드밀 운동을 실시한 MPTP-E 집단은 MPTP 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 감소된 것으로 나타났고( $p < .001$ ), Sham 집단과는 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 나타났( $p < .001$ ). 이와 유사하게 Fis1 단백질도(Fig. 4C), MPTP 집단이 Sham 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 나타났지만( $p < .01$ ), 트레드밀 운동을 실시한 MPTP-E 집단은 MPTP 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 감소된 것으로 나타났( $p < .05$ ).

### 5. 트레드밀 운동에 의한 SIRT-3 단백질 변화

8주간 트레드밀 운동 후 미토콘드리아 SIRT-3 단백질 발현수준을 확인한 결과(Fig. 5), 집단 간 통계적으로 유의한 차이가 나타나 사후검



**Fig. 5.** Treadmill exercise increases SIRT-3 expression in the MPTP-induced mice model of AD. A) Representative blot of western bands for SIRT-3 (n=5) and densitometry quantification. Values are expressed to 100% for levels of Sham mice.  $\beta$ -actin was probed as housekeeping gene. All bars shown represent the means  $\pm$  SEM. A Bonferroni post-doc test: \*\* $p < .01$ , \*\*\* $p < .001$ , compared with the Sham mice; ### $p < .001$ , compared with the MPTP mice. Sham-control (Sham), MPTP treatment (MPTP), and MPTP treadmill exercise (MPTP-E).

증을 실시하였다[F(2,12) = 153.67,  $p = .001$ ]. SIRT-3 단백질은 MPTP 집단이 Sham 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 감소된 것으로 나타났다( $p < .001$ ). 반면, 트레드밀 운동을 실시한 MPTP-E 집단은 MPTP 집단과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 나타났지만( $p < .001$ ), Sham 집단과는 통계적으로 유의하게 감소된 것으로 나타났다( $p < .01$ ).

## 논 의

1-methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)는 미토콘드리아 전자전달계 복합체 I (complex I)의 기능 억제, 도파민 신경세포 감소 및  $\alpha$ -syn 단백질의 축적을 유도하여 운동장애를 일으키기 때문에 파킨슨질환 유도 모델 쥐의 활용 연구에 사용되는 약물로 알려져 있다[24-26]. 본 연구에서도 운동기능 검사를 실시한 결과 MPTP 집단에서 Rota-rod 유지시간이 유의하게 감소하여 운동기능의 장애가 나타난 것으로 확인되었다(Fig. 1). 이러한 운동기능의 장애는 MPTP 약물 투여로 유도된 것으로 해석되며 이는 동일한 약물을 처치하여 운동기능의 소실을 보고한 선행연구와 일치하는 결과를 나타냈다[27-29]. 반면, 트레드밀 운동을 실시한 MPTP-E 집단에서는 Rota-rod 유지시간이 유의하게 증가되어 운동기능의 장애가 일부 완화된 것으로 나타났으며, 파킨슨질환 모델 쥐를 대상으로 운동 후 운동기능의 회복을 보고한 선행연구와 일치하는 결과를 나타냈다[19,30,31]. 아직까지 운동이 파킨슨질환의 운동기능을 개선시킬 수 있는 메커니즘은 확실하게 밝혀진 바가 없지만 MPTP 약물 처치로 인한  $\alpha$ -syn 단백질의 축적이 신경세포의 사

멸과 함께 운동기능의 장애를 증가시킨다고 보고되었다[32,33]. 따라서  $\alpha$ -syn 단백질의 축적을 감소시키는 것이 신경세포사멸을 억제하고 운동장애를 완화시킬 수 있는 방법이라고 생각된다. 예상한 바와 같이 흑질의  $\alpha$ -syn 단백질 발현과 신경세포사멸은 MPTP 집단에서 유의하게 증가된 것으로 나타났고(Fig. 2) 동일한 약물을 처치하여  $\alpha$ -syn 단백질의 축적과 신경세포사멸을 보고한 선행연구와 일치하는 결과를 나타냈다[28,34]. 이는 결과적으로 MPTP 투여로 인한  $\alpha$ -syn 단백질의 축적이 신경세포사멸을 증가시켜 운동장애를 유발한 것으로 판단된다. 반면 8주간의 트레드밀 운동을 실시한 MPTP-E 집단의 경우  $\alpha$ -syn 단백질의 발현과 신경세포사멸이 유의하게 감소되는 것으로 나타났으며, 운동을 통해  $\alpha$ -syn 단백질의 감소를 보고한 Tuon et al. [22]의 선행 연구와도 일치하는 결과는 나타났다. 이를 종합해보면 트레드밀 운동이  $\alpha$ -syn 단백질을 감소시키고 신경세포사멸을 억제시켜 일부 운동기능을 회복시킨 것으로 생각된다. 하지만 아직까지 운동에 의한  $\alpha$ -syn 단백질의 감소를 보고한 연구는 매우 부족한 실정이며, 운동을 통한  $\alpha$ -syn 단백질의 감소 기전도 알려진 바가 없기 때문에 추후 심도 있는 후속연구가 필요하다고 생각된다.

파킨슨질환과 미토콘드리아 기능이상은 매우 밀접하게 관련되어 있으며, 미토콘드리아 기능을 개선시키는 것이 파킨슨질환을 완화시킬 수 있는 새로운 방법으로 제시되고 있다[35,36]. 그 중 미토콘드리아 역동성(mitochondrial dynamic)은 미토콘드리아 구조와 기능을 유지하기 위해 융합과 분열을 끊임없이 반복하여 에너지를 제공하는 기전으로 세포의 생존과정에 매우 중요하다. 미토콘드리아는 mitofusins 1과 2 (Mfn1, Mfn2) 및 optic atrophy 1 (Opa1) 단백질을 증가시켜 융합을 유도하고 fission 1 (Fis 1)과 dynamin related protein 1 (Drp 1) 단백질의 발현을 증가시켜 분열을 유도한다[37,38]. 하지만 최근,  $\alpha$ -syn 단백질의 축적은 미토콘드리아 융합을 억제하고 분열을 증가시켜 미토콘드리아 구조와 기능을 저하시키는 것으로 보고되었다[12,13]. 본 연구에서도 MPTP 그룹에서 미토콘드리아 융합과 관련된 Mfn1, Mfn2 및 Opa1 단백질이 유의하게 감소된 것으로 나타났고(Fig. 3), 미토콘드리아 분열에 관련된 Drp1과 Fis1 단백질이 유의하게 증가된 것으로 나타났(Fig. 4). 이는 앞서 제시한 것처럼 MPTP 약물 투여로 인한  $\alpha$ -syn 단백질의 축적이 미토콘드리아 역동성의 불균형을 초래하고 미토콘드리아 분열을 증가시켜 미토콘드리아 기능 이상이 나타난 것으로 판단된다. 일반적으로 운동은 미토콘드리아의 생합성(mitochondrial biogenesis), 미토콘드리아 역동성 및 손상된 미토콘드리아를 제거하는 미토파지(mitophagy)를 활성화시켜 미토콘드리아 기능을 개선시키는 것으로 알려져 있다[18]. 하지만, 아직까지 파킨슨 질환을 대상으로 운동을 통해 미토콘드리아 역동성을 확인한 연구는 매우 부족한 실정이다. 이에 본 연구에서 살펴본 결과 트레드밀 운동을 실시한 MPTP-E 집단에서 Mfn1, Mfn2 및 Opa1 단백질이 증가된 반면, Drp1과 Fis1 단백질은 유의하게

감소되어 미토콘드리아 역동성의 불균형을 일부 개선시킨 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 나타난 미토콘드리아 역동성의 개선은 일부 운동의 효과라고 생각되며, 이는 파킨슨질환 모델 동물 쥐를 대상으로 운동에 의한 미토콘드리아 역동성의 활성을 확인한 의미있는 연구라고 생각된다.

Sirtuin-3 (SIRT-3) 미토콘드리아에 존재하는 단백질로써 NAD<sup>+</sup>의 존성 디아세틸레이션(NAD<sup>+</sup> dependent deacetylation)을 통해 지방산화(fat oxidation), 미토콘드리아 생합성(mitochondrial biogenesis) 및 ATP 합성을 증가시킬 뿐만 아니라 산화적 스트레스를 증가시키는 ROS의 생성을 감소시킨다[39,40]. 또한, SIRT-3는 미토콘드리아 융합 단백질인 Opa1의 활성을 증가시키는 반면, 분열 단백질인 Fis1와 Drp1을 감소시키는 것으로 보고되었다[41,42]. 이에 본 연구에서 SIRT-3의 발현을 확인한 결과(Fig. 5), 트레드밀 운동을 실시한 MPTP-E 집단에서 유의하게 증가된 것으로 나타나, 운동을 통해 SIRT-3의 발현이 증가됨을 보고한 여러 선행연구와 일치하는 결과를 나타냈다[43,44]. 이러한 SIRT-3의 증가는 결국 운동 후 미토콘드리아 역동성의 개선이 나타났던 근거를 일부 뒷받침해 줄 수 있는 것으로 생각된다.

따라서 운동은 파킨슨질환의 병리학적 특징인  $\alpha$ -syn 단백질의 축적을 감소시키고 신경세포사멸을 완화시켰다는 것을 확인하였고, 이에 운동기능의 장애가 일부 개선되었다는 것을 보여주었다. 또한, 트레드밀 운동은 SIRT-3 단백질을 증가시키고 미토콘드리아 역동성의 불균형을 완화시켜 파킨슨질환에 나타나는 미토콘드리아 기능 이상을 일부 개선시킬 수 있는 효과적인 방법이라고 생각된다.

## 결론

본 연구에서는 MPTP 약물을 투여한 파킨슨질환 동물 모델을 대상으로 8주간의 트레드밀 운동이 운동기능,  $\alpha$ -syn, 신경세포사멸, 미토콘드리아 역동성 및 SIRT-3 단백질에 미치는 영향을 확인하고 다음과 같은 결론을 도출하였다. 8주간의 트레드밀 운동은  $\alpha$ -syn 단백질의 감소시키고 신경세포사멸을 억제시켜 운동기능 소실을 일부 회복시킨 것으로 나타났다. 또한, 트레드밀 운동은 SIRT-3 단백질을 증가시켜 미토콘드리아 역동성의 불균형을 일부 완화시켰다. 따라서 운동은 파킨슨질환에 나타나는 미토콘드리아 기능 이상을 일부 개선시킬 수 있는 효과적인 방법이라고 생각된다.

## REFERENCES

- Hirsch MA, Toole T, Maitland CG, Rider RA. The effects of balance training and high-intensity resistance training on persons with idiopathic Parkinson's disease. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 2003;84(8):1109-1117.
- Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves TD. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Movement Disorder* 2014;29(13):1583-1590.
- Schapira AH. Aetiopathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of Neurology* 2011;258(Suppl 2):S307-310.
- Murphy DD, Rueter SM, Trojanowski JQ, Lee VM. Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience* 2000;20(9):3214-3220.
- Fortin DL, Nemani VM, Voglmaier SM, Anthony MD, Ryan TA, et al. Neural activity controls the synaptic accumulation of alpha-synuclein. *The Journal of Neuroscience* 2005;25(47):10913-10921.
- Chu Y, Morfini GA, Langhamer LB, He Y, Brady ST, et al. Alterations in axonal transport motor proteins in sporadic and experimental Parkinson's disease. *Brain* 2012;135(Pt 7):2058-2073.
- Martin LJ, Semenkow S, Hanaford A, Wong M. Mitochondrial permeability transition pore regulates Parkinson's disease development in mutant  $\alpha$ -synuclein transgenic mice. *Neurobiology of Aging* 2014;35(5):1132-1152.
- Roberts HL, Brown DR. Seeking a mechanism for the toxicity of oligomeric  $\alpha$ -synuclein. *Biomolecules* 2015;5(2):282-305.
- Winner B, Jappelli R, Maji SK, Desplats PA, Boyer L, et al. In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proceeding of National Academy of Science of the United States of America* 2011;108(10):4194-4199.
- Bender A, Desplats P, Spencer B, Rockenstein E, Adame A, et al. TOM40 mediates mitochondrial dysfunction induced by  $\alpha$ -synuclein accumulation in Parkinson's disease. *PLoS One* 2013;8(4):e62277.
- Chen H, Chan DC. Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Human Molecular Genetics* 2009;18(R2):R169-176.
- Xie W, Chung KK. Alpha-synuclein impairs normal dynamics of mitochondria in cell and animal models of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* 2012;122(2):404-414.
- Kamp F, Exner N, Lutz AK, Wender N, Hegermann J, et al. Inhibition of mitochondrial fusion by  $\alpha$ -synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1. *The EMBO Journal* 2010;29(20):3571-3589.
- Gui YX, Wang XY, Kang WY, Zhang YJ, Zhang Y, et al. Extracellular signal-regulated kinase is involved in alpha-synuclein-induced mitochondrial dynamic disorders by regulating dynamin-like protein 1.

- Neurobiology of Aging 2012;33(12):2841-2854.
15. Nakamura K, Nemani VM, Azarbal F, Skibinski G, Levy JM, et al. Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein alpha-synuclein. *The Journal of Biological Chemistry* 2011;286(23):20710-20726.
  16. Hüttenrauch M, Brauß A, Kurdakova A, Borgers H, Klinker F, et al. Physical activity delays hippocampal neurodegeneration and rescues memory deficits in an Alzheimer disease mouse model. *Translational Psychiatry* 2016;6(5):e800.
  17. Li L, Xu M, Shen B, Li M, Gao Q, et al. Moderate exercise prevents neurodegeneration in D-galactose-induced aging mice. *Neural Regeneration Research* 2016;11(5):807-815.
  18. Yan Z, Lira VA, Greene NP. Exercise training-induced regulation of mitochondrial quality. *Exercise and Sport Science Reviews* 2012; 40(3):159-164.
  19. Smith BA, Goldberg NR, Meshul CK. Effects of treadmill exercise on behavioral recovery and neural changes in the substantia nigra and striatum of the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse. *Brain Research* 2011;1386:70-80.
  20. Real CC, Ferreira AF, Chaves-Kirsten GP, Torráo AS, Pires RS, et al. BDNF receptor blockade hinders the beneficial effects of exercise in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 2013;237:118-129.
  21. Tuon T, Valvassori SS, Dal Pont GC, Paganini CS, Pozzi BG, et al. Physical training prevents depressive symptoms and a decrease in brain-derived neurotrophic factor in Parkinson's disease. *Brain Research Bulletin* 2014; 108:106-112.
  22. Tuon T, Valvassori SS, Lopes-Borges J, Luciano T, Trom CB, et al. Physical training exerts neuroprotective effects in the regulation of neurochemical factors in an animal model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 2012;227:305-312.
  23. Lau YS, Patki G, Das-Panja K, Le WD, Ahmad SO. Neuroprotective effects and mechanisms of exercise in a chronic mouse model of Parkinson's disease with moderate neurodegeneration. *The European Journal of Neuroscience* 2011;33(7):1264-1274.
  24. Mandel S, Maor G, Youdim MB. Iron and alpha-synuclein in the substantia nigra of MPTP-treated mice: effect of neuroprotective drugs Rapomorphine and green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Journal of Molecular Neuroscience* 2004;24(3):401-416.
  25. Meredith GE, Totterdell S, Potashkin JA, Surmeier DJ. Modeling PD pathogenesis in mice: advantages of a chronic MPTP protocol. *Parkinsonism & Related Disorders* 2008;14(Suppl 2):S112-115.
  26. Kowall NW, Hantraye P, Brouillet E, Beal MF, McKee AC, et al. MPTP induces alpha-synuclein aggregation in the substantia nigra of baboons. *Neuroreport* 2000;11(1):211-213.
  27. Chen M, Wang T, Yue F, Li X, Wang P, et al. Tea polyphenols alleviate motor impairments, dopaminergic neuronal injury, and cerebral alpha-synuclein aggregation in MPTP-intoxicated parkinsonian monkeys. *Neuroscience* 2015; 286:383-392.
  28. Li XH, Dai CF, Chen L, Zhou WT, Han HL, et al. 7, 8-dihydroxyflavone Ameliorates motor deficits via suppressing alpha-synuclein expression and oxidative stress in the MPTP-induced mouse model of parkinson's disease. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 2016;22(7):617-624.
  29. Liu L, Peritore C, Ginsberg J, Shih J, Arun S, et al. Protective role of SIRT5 against motor deficit and dopaminergic degeneration in MPTP-induced mice model of Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research* 2015;281:215-221.
  30. Klein C, Rasińska J, Empl L, Sparenberg M, Poshtiban A, et al. Physical exercise counteracts MPTP-induced changes in neural precursor cell proliferation in the hippocampus and restores spatial learning but not memory performance in the water maze. *Behavioural Brain Research* 2016;307:227-238.
  31. Shin MS, Jeong HY, An DI, Lee HY, Sung YH. Treadmill exercise facilitates synaptic plasticity on dopaminergic neurons and fibers in the mouse model with Parkinson's disease. *Neuroscience Letters* 2016; 621:28-233.
  32. Fornai F, Schlüter OM, Lenzi P, Gesi M, Ruffoli R, et al. Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein. *Proceeding of the National Academy of Science of United States of America* 2005; 102(9):3413-3418.
  33. Shioda N, Yabuki Y, Kobayashi Y, Onozato M, Owada Y, et al. FABP3 protein promotes alpha-synuclein oligomerization associated with 1-methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry* 2014;289(27):18957-18965.
  34. Heng Y, Zhang QS, Mu Z, Hu JF, Yuan YH, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates motor impairment and neuroinflammation in the MPTP-probenecid-induced parkinsonism mouse model by targeting alpha-synuclein abnormalities in the substantia nigra. *Toxicology Letters* 2016;243:7-21.
  35. Requejo-Aguilar R, Bolaños JP. Mitochondrial control of cell bioenergetics in Parkinson's disease. *Free Radical Biology & Medicine* 2016;pii



- :S0891-5849(16)30030-30032.
36. Von Stockum S, Nardin A, Schrepfer E, Ziviani E. Mitochondrial dynamics and mitophagy in Parkinson's disease: A fly point of view. *Neurobiology of Disease* 2016;90:58-67.
  37. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2010;11(12):872-884.
  38. Chan DC. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annual Review of Cell and Development Biology* 2006;22:79-99.
  39. Duan W. Sirtuins: from metabolic regulation to brain aging. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2013;5:36.
  40. Kincaid B, Bossy-Wetzel E. Forever young: SIRT3 a shield against mitochondrial meltdown, aging, and neurodegeneration. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2013;5:48.
  41. Morigi M, Perico L, Rota C, Longaretti L, Conti S, et al. Sirtuin 3-dependent mitochondrial dynamic improvements protect against acute kidney injury. *The Journal of Clinical Investigation* 2015;125(2):715-726.
  42. Samant SA, Zhang HJ, Hong Z, Pillai VB, Sundaresan NR, et al. SIRT3 deacetylates and activates OPA1 to regulate mitochondrial dynamics during stress. *Molecular and Cell Biology* 2014;34(5):807-819.
  43. Young JS, Smith DV, Coutlee CG, Huettel SA. Synchrony between sensory and cognitive networks is associated with subclinical variation in autistic traits. *Frontier in Human Neuroscience* 2015;9:146.
  44. Vargas-Ortiz K, Perez-Vazquez V, Diaz-Cisneros FJ, Figueroa A, Jiménez-Flores LM, et al. Aerobic training increases expression levels of SIRT3 and PGC-1 $\alpha$  in skeletal muscle of overweight adolescents without change in caloric intake. *Pediatric Exercise Science* 2015;27(2):177-184.