

Effects of treadmill exercise and MitoQ treatment on vascular function in D-galactose-induced aging rat

Dong-Won Kim¹, Ki-Chun Kwon¹, Dong-Hun Choi¹, Dong-Joo Hwang¹, Jung-Hoon Koo¹,
Yoo-Sung Oh² & Joon-Yong Cho^{1*}

¹Korea National Sport University ²University of Seoul

[Purpose] The purpose of this study was to investigate the effect of treadmill exercise and MitoQ treatment on NADPH oxidase, antioxidation and vascular function-related factors in aortic of D-galactose-induced aging rats. **[Methods]** To induce the animal model of aging, D-galactose was diluted in saline, and a dose of 100mg /kg was intraperitoneally injected into Sprague-Dawley rats once a day for a total of 10 weeks. Rats were divided into five groups: Control group (CON, n=9), D-galactose control group (DC, n=9), D-galactose+MitoQ group (DM, n=9), D-galactose+Exercise group (DE, n=9), D-galactose+MitoQ + Exercise group(DME, n=9), and treadmill exercise was conducted for 5 days/week during 8 weeks with gradual increase of intensity. MitoQ treatment was intraperitoneally injected at a concentration of 100µM/kg twice a week for 8 weeks during the research period. **[Results]** The result showed that treadmill exercise and MitoQ treatment decreased the expression of NADPH oxidase level and increased antioxidant enzyme such as SOD-2, catalase. It lead to positive effects such as increasing the level of eNOS, a protein involved in vascular function while decreasing the level of VCAM-1. In addition, as a result, it showed the structurally reduced intima-media thickness. **[Conclusions]** It can be concluded that treadmill exercise and MitoQ treatment are effective in ameliorating and treating vascular dysfunction resulting from aging.

Key words: Aging, Reactive Oxygen Species, vascular function, Endothelial cell, Treadmill Exercise, MitoQ

서론

인체의 혈관의 내측에는 혈관내피 세포층(vascular endothelium)이 존재한다(Sumpio 등, 2002). 내피는 혈관, 임파선, 심장 등 내강의 내측을 덮는 한 층의 세포층으로 정상상태의 혈관내피세포 (endothelial cell)는

일반적으로 산화질소 (nitric oxide)와 엔도텔린 (endothelin)과 같은 다양한 인자들을 생성하여 세포 내 항상성을 조절하며, 혈관의 수축과 이완 뿐만 아니라 염증 및 면역반응 등에 기여하여 인체의 안정상태를 유지한다(Deanfield 등, 2007; Higashi 등, 2009). 반면, 혈관내피세포의 손상은 혈관의 물리적 기능장애와 함께 혈류에 의한 화학적 신호전달을 방해하여 인체의 생리적 불균형을 초래하는 것으로 알려져 있다.

노화과정에서 발생하는 산화적 스트레스는 혈관내피세포의 손상을 유발시키는 위험요인으로 미토콘드리아의 기능적 이상으로 인한 산화적 인산화 과정과 NADPH

논문 투고일 : 2019. 09. 25.

논문 수정일 : 2019. 10. 18.

게재 확정일 : 2019. 11. 29.

* 교신저자 : 조준용(chojy86@knsu.ac.kr).

* 이 논문은 김동원(한국체육대학교)의 석사학위논문을 수정 보완하였음.

oxidase(Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase)의 활성화에 의해 유도된다(Sena & Chandel, 2012). 미토콘드리아의 손상과 기능장애는 혈관내피세포 내 SOD1(Cu-Zn Superoxide dismutase), SOD2(Manganese Superoxide dismutase, catalase 및 GPx(Glutathione peroxidase)와 같은 항산화 효소의 활성도는 감소하는 반면 반응산소종의 생성은 증가된다(Turrens, 2003; Fukai & Ushio-Fukai, 2011; Dai 등, 2012). 또한, NADPH oxidase는 세포막 단백질(gp91phox, p22phox)과 세포질 단백질(p40 phox, p47 phox, p67 phox, GTPase Rac)로 구성된 단백질복합체로서 고혈당, 사이토카인, 성장 인자 및 지질과산화물과 같은 병리적 자극에 의해 활성화되어 반응산소종의 생성을 증가시킨다(Frey 등, 2009; Selemidis 등, 2007; Drummond & Sobey, 2014). 이러한 일련의 과정을 통해 증가된 산화 스트레스는 VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1)과 같은 혈관 세포 접착 분자의 활성화로 이어진다(Deem & Cook-Mills). 이는 혈관내피세포의 증식에 부정적으로 작용하여 혈관내피의 정상적 기능을 방해하며(Haendeler 등, 2012), 심혈관 질환, 뇌 혈관질환, 대사 질환 등의 발병에 중요한 역할을 한다(Heitzer 등, 2001; Hill 등, 2003; Rajendran 등, 2013; Drummond & Sobey, 2014). 따라서 혈관내피세포 기능장애의 원인으로 작용하는 산화적 불균형을 완화시키기 위한 대안이 요구된다.

운동은 오랫동안 건강을 유지하는데 중요한 수단이라고 알려져 왔다. 특히, 유산소성 운동은 항산화 기능을 증진시켜 혈관내피의 기능개선에 따른 심혈관질환 발병 가능성을 낮추는 것으로 확인되었다(Higashi & Yoshizumi, 2004; Di Francescomarino 등, 2009). 선행연구에 의하면 유산소성 운동은 혈관내피세포 내 항산화 효소의 활성을 증가시킬 뿐만 아니라 NADPH oxidase의 하위 구성요인의 발현을 하향 조절하여 ROS 감소와 함께 혈관내피기능 개선을 유도한다고 보고되었다(Marsh & Coombes, 2005; Duerschmidt 등, 2006; Fearheller 등, 2009). 게다가, 지속적인 운동은 혈관내벽에 전단응력(shear stress)을 증가시켜 혈관내피세포 내 혈관내피산화질소합성효소(endothelial Nitric Oxide Synthase) 활성을 유도하여 혈관확장 물질인 산화질소의 생성을 증가시킨다고 보고되었다(Wang 등, 1993; Hambrecht 등, 2000). 이러한 선

행연구결과들은 적절한 유산소성 운동이 노화에 의해 손상된 혈관내피의 기능을 개선시킬 수 있음을 제안하지만(Seals 등 2008), 아직까지 혈관내피세포 내 산화 스트레스의 주요 생성원인으로 작용하는 미토콘드리아와 NADPH oxidase의 역할에 대한 연구는 부족한 실정이다.

최근, 산화적 불균형을 조절하기 위한 대안으로 운동의 역할을 보완하는 항산화제 섭취에 대한 높은 관심과 함께 미토콘드리아를 표적하여 작용하는 항산화제의 역할이 규명되고 있다(Murphy & Smith, 2007). 마이토큐(MitoQ)는 유비퀴논(Ubiquinone)의 낮은 수용성과 막 투과성을 높인 항산화 보충제로서(McManus 등, 2011), 미토콘드리아 내 불안정 상태의 ROS를 안정화시키는 것으로 알려져 있다(Mao 등, 2013). Gioscia-Ryan 등(2014)과 Rossman 등(2018)은 MitoQ 섭취를 통해 노화된 혈관에서 미토콘드리아에 의한 반응산소종의 감소와 산화질소의 생성증가를 확인하였으며, Vergeade 등(2010), Braakhuis 등(2018)은 MitoQ 처치를 통한 항산화 효소의 활성증가를 실험적으로 증명하였다. 이를 통해, 미토콘드리아 표적 항산화제 MitoQ 섭취가 노화에 의해 유도되는 혈관 및 혈관내피세포의 손상을 지연시켜 궁극적으로 심혈관질환을 예방하고 개선시키는 대안이 될 수 있음을 추론할 수 있지만(Supinski 등, 2009; Gruber 등, 2013), 아직까지 혈관내피세포 기능장애의 예방 및 치료적 접근을 위한 외인성 항산화제 MitoQ 섭취의 효과에 대한 과학적인 근거는 부족한 실정이다. 뿐만 아니라 선행연구에서는 운동과 다양한 약물에 관한 복합 연구는 진행되었지만 MitoQ와의 복합연구가 진행되어 있지 않다. 따라서 본 연구는 D-galactose로 유도된 노화 쥐를 대상으로 8주간의 트레드밀 운동과 MitoQ 섭취가 대동맥에서 NADPH oxidase 활성과 항산화 효소의 발현 조절에 따른 혈관기능에 미치는 영향을 규명하고자 한다.

연구방법

실험동물

본 연구는 실험을 실시하기 전에 K대학교 동물실험윤리위원회의 승인(KNSU-IACUC-2018-05)을 얻은 후에

진행하였다. 실험동물은 6주령 SD rat(Sprague-Dawley Rat)을 (주중아바이오로부터 분양받은 후 식이와 음수는 제한 없이 공급하였으며 K대학교 동물사육실(온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $50\pm 5\%$, 명암주기 12시간)에서 사육하였다. 2주간의 환경에 대한 적응기를 거친 후, 실험집단은 대조집단(Control group; CON, n=9), D-galactose 투여집단(D-galactose Control group; DC, n=9), D-galactose/MitoQ 투여집단(D-galactose+MitoQ group; DM, n=9), D-galactose/운동집단(D-galactose+Exercise group; DE, n=9), D-galactose/MitoQ/운동집단(D-galactose+MitoQ+Exercise group; DME, n=9)의 총 5개의 집단으로 구분하여 실험에 실시하였다.

노화 동물 모델

본 실험에서 SD rat의 노화를 유도하기 위하여 Lei 등(2008)이 제시한 방법을 인용하여, 혈관 내 산화적 손상을 유도하기 위하여 생리식염수에 녹인 D-galactose(Sigma Chemical Co, USA)를 100mg/kg 의 농도로 총 10주간 1일 1회 복강 내 주사(intraperitoneal injection)하였다.

운동방법

본 실험은 D-galactose로 유도된 노화 모델인 SD rat을 대상으로 rodent treadmill(8 Lanes, Daemyung Scientific Co, Ltd, Korea)을 이용하여 일주일 동안 사전 적응훈련을 하였다. 본 운동은 실험동물의 운동수행 능력과 Hong 등(2015)이 제시한 점증적 운동 프로그램을 수정 및 보완하여 1주차 $10\sim 12\text{ m/min}$, 10 min (grade 0%), 2주차 $10\sim 12\text{ m/min}$, 20min(grade 0%), 3주차 $18\sim 20\text{ m/min}$, 20min (grade 0%), 4주차 $18\sim 20\text{ m/min}$, 30min (grade 0%), 5~8주차 $18\sim 20\text{ m/min}$, 50min (grade 0%)로 설정하여 주 5일, 총 8주간 트레드밀 운동을 실시하였으며, 운동 프로토콜은 <Table 1>과 같다.

MitoQ 투여

MitoQ는 Dr. Mike Murphy (University of Cambridge, England)에게 지원받아 사용하였다. MitoQ 투여는

Table 1. Treadmill exercise protocol for 8 weeks

Exercise Period	Intensity	Time	Grade	frequency
1week	10~12m/min	10min	0%	5 days/week
2week	10~12m/min	20min	0%	5 days/week
3week	18~20m/min	20min	0%	5 days/week
4week	18~20m/min	30min	0%	5 days/week
5~8week	18~20m/min	50min	0%	5 days/week

McManus등(2011)이 제시한 투여한 방법을 근거로 수정 및 보완하여 $100\mu\text{M/kg}$ 의 농도로 희석된 MitoQ 용액을 주 2회, 총 8주간 복강 내 주사(Intraperitoneal injection: IP)하였다.

분석방법

조직적출 및 고정

8주간의 처치와 기억력 행동검사 수행 후, 동물용 챔버(chamber)를 이용하여 CO_2 (이산화탄소)가스의 농도를 20%정도로 흡입시켜 무의식 상태의 모습이 보이면 50~70% 점증적으로 증가시켜 안락사 시킨 후 집단 당 5마리씩 Western blot analysis로 사용하기 위해서 심장부터 장골동맥(iliac artery) 전까지의 대동맥 조직을 적출하여 분석 시까지 -80°C 에서 냉동 보관하였다. 집단 당 4마리씩 혈관 내중막의 두께를 측정하기 위해서 흉강을 열고 좌심실을 통해 50mM 인산염 완충 식염수(phosphoate buffer saline, PBS)를 주입하고, 0.1M 인산 완충액에 녹인 4% paraformaldehyde (PFA) 고정액을 관류하였다. 관류 고정된 뒤 대동맥 조직은 적출한 후 4% PFA 고정액에 담아서 4°C 에서 24시간 침전시킨 후 30% Sucrose 용액으로 옮겨 5일 동안 고정하였다.

혈관 내중막 두께 측정

고정된 대동맥 조직은 freezing microtome(Leica, Nussloch, Germany)를 이용하여 $6\mu\text{m}$ 로 두께로 절편하여 24시간 건조시켰다. 이후 Hematoxylin-eosin 염색을 실시한 대동맥 조직을 Leica dm-2500(LAS V4.2)으로 관찰하여 분석하였다. 심장에서 장골동맥까지의 대동맥 중 심장에서 가장 가까이 위치한 부분과 장골동맥에서 가장 가까이 위치한 부분을 제외한 대부분은 1cm간격으로

균등하게 절편 하였으며, 대동맥의 내막부터 중막까지의 두께(Aortic Intima-Media Thickness)를 측정하여 평균값을 산출하였다.

SDS-PAGE

12% separating gel(Triple Distilled Water, 30% acrylamide/bis-acrylamide, 1.5M tris buffer pH 8.8, 10% SDS, 10% Ammonium persulfate solution, TEMED)와 5% stacking gel(Triple Distilled Water, 30% acrylamide/bis-acrylamide, 1M tris buffer pH 6.8, 10% SDS, 10% Ammonium persulfate solution, TEMED)을 사용하였다. 샘플은 원심분리(14,000rpm, 30분)한 상층액과 2x Sample loading buffer(125mM Tris-HCL pH 6.8, 20% Glycerol, 2% SDS, 2% β -mercaptoethanol, 0.02% Bromophenol blue)를 1:1 비율로 혼합한 후 80~100°C에서 10분간 끓여 단백질을 변성시킨 후 10분간 식히고, 다시 14,000rpm으로 10분간, 4°C에서 원심분리 하였다. Standard maker (PageRuler Prestained Protein Ladder, #SM0671-Fermentas)와 함께 각 샘플을 Mini-Protean II Dual slab apparatus(Bio-Rad, CA, USA)에 준비된 stacking gel well에 총 단백질량이 30 μ g이 되도록 분주하고 80volt로 샘플이 바닥에 닿을 때까지(약 110~120분) 전기영동 하였다.

Western blot analysis

Polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane을 Methanol에 적셔 활성화 시킨 후, Transfer buffer (190mM glycine, 50mM Tris-base, 0.05% SDS, 20% methanol)로 washing 한 다음 Transfer buffer에 적신 Whatman 3M paper를 차례로 겹쳐 Mini trans-bolt cell(Bio-Rad, CA, USA)에 장치한 후 60volt로 90분 전사시켰다. Membrane으로 증착이 끝나면 rocker platform 위에서 60~90분 동안 membrane을 4% BSA 용액(in TBS-T: 10mM tris-base pH 8.0, 150mM NaCl, 0.05% Tween-20)으로 Blocking 시킨 후에 1차 항체 gp91 phox(Santa cruz, 1:1000); p22 phox(Santa cruz, 1:1000); p47 phox(Santa cruz, 1:1000); SOD-2(Santa cruz, 1:1000); catalase

(Santa cruz, 1:1000); VCAM-1(Santa cruz, 1:1000); eNOS(Santa cruz, 1:1000)를 각각 BSA 용액에 희석시켜 12~16시간 동안 흔들어 주고 난 다음 0.05% TBS-T 용액으로 10분씩 4차례 세척한 후 2차 항체(horseradish peroxidase(HRP)-conjugated goat anti-mouse; horseradish peroxidase(HRP)-conjugated goat anti-rabbit)를 Blocking 용액으로 1:5000으로 희석시켜 90분 동안 흔들어 주고 다시 TBS-T 용액으로 10분씩 4차례 헹구고 마지막 단계로 Western Blotting Luminol Reagent(WBLR) solution 또는 Immobilon Forte Western HRP substrate을 membrane에 적셔 1분간 발색하여 얻어진 membrane을 이미지 분석 시스템(Molecular Imager ChemiDoc XRS System, Bio-Rad, USA)으로 스캔한 후 Quantity One 1-D Analysis Software(Bio-Rad, USA)를 이용하여 단백질량을 산출하였다.

통계 처리

본 연구에서 얻어진 모든 자료는 SPSS/PC 24.0 통계 프로그램을 이용하여 기술 통계치(Mean \pm SD)를 산출하였으며, 집단 간 변인의 차이를 확인하기 위해 일원변량 분석(One-way ANOVA)을 실시하였다. 집단 간 유의한 차이가 나타날 경우 Bonferroni 사후검증을 실시하였다. 본 연구의 통계적 유의수준은 $\alpha=.05$ 로 설정하였다.

연구결과

혈관 내중막 두께의 변화

D-galactose로 유도된 노화 쥐를 대상으로 8주간의 트레드밀 운동 및 MitoQ 처치에 따른 집단 간 차이를 확인하기 위해 대동맥의 혈관 두께를 측정한 결과 (Fig 1)과 같이 집단 간 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다 (F(4,15)=45.031, $p=.001$). CON 집단에 비해 DC 집단에서 유의하게 증가하였다($p=.001$). DC 집단에 비해 DM, DE, DME 집단에서 유의하게 감소하였다 ($p=.001$).

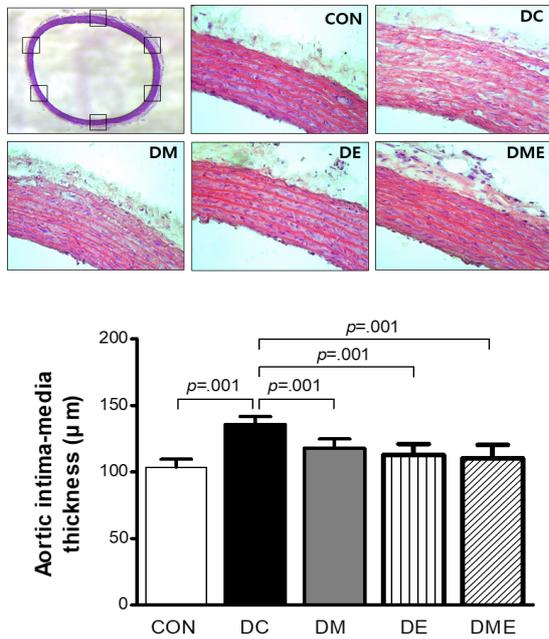


fig 1. Differences of aortic intima-media thickness in each group. intima-media thickness was probed as an internal control. Bonferroni post-hoc test after ANOVA. Values are presented as the mean±SD. (Con:Control, DC:D-galactose+Control, DM:D-galactose+MitoQ, DE:D-galactose+Exercise, DME:D-galactose+MitoQ+Exercise)

집단 간 대동맥 조직 내 NADPH oxidase 발현수준의 차이

D-galactose로 유도된 노화 쥐를 대상으로 8주간의 트레드밀 운동 및 MitoQ 처치 후 산화스트레스의 원인인 ROS의 생산에 기여하는 NADPH oxidase를 구성하는 효소인 gp91 phox, p22 phox, p47 phox의 발현에 미치는 영향을 분석하였다(Fig 2). 먼저 gp91 phox의 발현은 집단 간 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다(F[4,20]=26.295, p=.001). CON 집단에 비해 DC 집단이 유의하게 증가하였다(p=.001). DE 집단(p=.003)과 DME(p=.001) 집단은 DC 집단에 비해 유의하게 감소하였다. p22 phox의 발현은 집단 간 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다(F[4,20]=24.364, p=.001). CON 집단에 비해 DC 집단이 유의하게 증가하였다(p=.001). DM 집단(p=.001), DE 집단(p=.001)과 DME(p=.001) 집

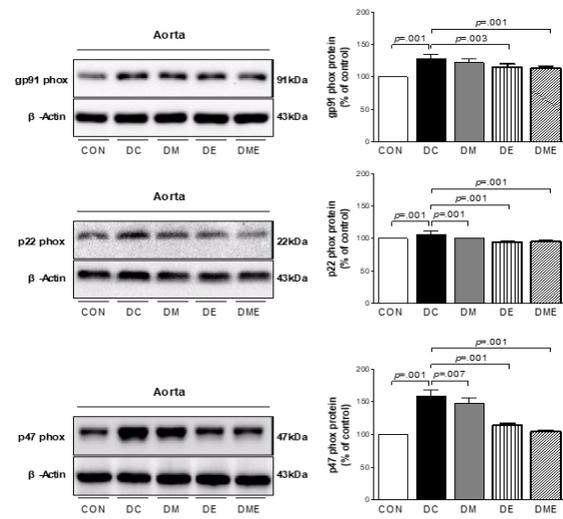


Fig 2. Differences of expression level of gp91 phox, p22 phox and p47 phox in each group. The data shown in the western blot are means from five rat aorta tissue. β-actin was probed as an internal control. Bonferroni post-hoc test after ANOVA. Values are presented as the mean±SD. (Con:Control, DC:D-galactose+Control, DM:D-galactose+MitoQ, DE:D-galactose+Exercise, DME:D-galactose+MitoQ+Exercise)

단은 DC 집단에 비해 유의하게 감소하였다. p47 phox의 발현은 집단 간 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다(F[4,20]=114.345, p=.001). CON 집단에 비해 DC 집단이 유의하게 증가하였다(p=.001). DM 집단(p=.007), DE 집단(p=.001)과 DME(p=.001) 집단은 DC 집단에 비해 유의하게 감소하였다.

집단 간 대동맥 조직 내 SOD-2, catalase 발현수준의 차이

D-galactose로 유도된 노화 쥐를 대상으로 8주간의 트레드밀 운동 및 MitoQ 처치 후 산화스트레스의 원인인 ROS를 분해하는 SOD-2, catalase를 분석하였다(Fig 3). 먼저 SOD-2의 발현은 집단 간 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다(F[4,20]=17.05, p=.001). CON 집단에 비해 DC 집단이 유의하게 감소하였다(p=.003). DM 집단(p=.003), DE 집단(p=.003)과 DME(p=.001) 집단은 DC 집단에 비해 유의하게 증가하였다. catalase의 발현은 집단 간 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다

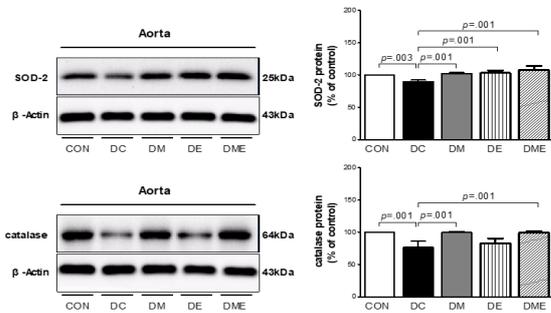


fig 3. Differences of expression level of SOD-2 and catalase in each group. The data shown in the western blot are means from five rat aorta tissue. β -actin was probed as an internal control. Bonferroni post-hoc test after ANOVA. Values are presented as the mean \pm SD. (Con:Control, DC:D-galactose+Control, DM:D-galactose+MitoQ, DE:D-galactose+Exercise, DME:D-galactose+MitoQ+Exercise)

($F(4,20)=21.205, p=.001$). CON 집단에 비해 DC 집단이 유의하게 감소하였다($p=.001$). DM 집단($p=.003$)과 DME($p=.001$) 집단은 DC 집단에 비해 유의하게 증가하였다.

집단 간 대동맥 조직 내 eNOS 발현수준의 차이

D-galactose로 유도된 노화 쥐를 대상으로 8주간의 트레드밀 운동 및 MitoQ 처치 후 혈관확장을 유도하는 혈관내피 산화질소 합성효소인 eNOS를 분석한 결과(Fig 4) 집단 간 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다($F(4,20)=40.99, p=.001$). CON 집단에 비해 DC 집단이 유의하게 감소하였다($p=.001$). DM 집단($p=.001$), DE 집단($p=.002$)과 DME($p=.008$) 집단은 DC 집단에 비해 유의하게 증가하였다.

집단 간 대동맥 조직 내 VCAM-1 발현수준의 차이

D-galactose로 유도된 노화 쥐를 대상으로 8주간의 트레드밀 운동 및 MitoQ 처치 후 혈염증에 의하여 유도되는 대표적인 혈관 내 세포접착자인 VCAM-1을 분석한 결과(Fig 5) 집단 간 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다($F(4,20)=38.153, p=.001$). CON 집단에 비해 DC 집단이 유의하게 증가하였다($p=.001$). DE 집단

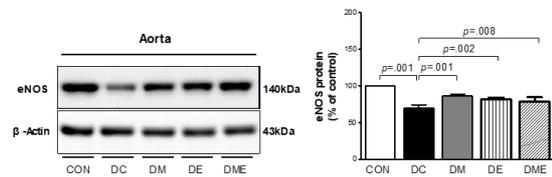


fig 4. Differences of expression level of eNOS in each group. The data shown in the western blot are means from five rat aorta tissue. β -actin was probed as an internal control. Bonferroni post-hoc test after ANOVA. Values are presented as the mean \pm SD. (Con:Control, DC:D-galactose+Control, DM:D-galactose+MitoQ, DE:D-galactose+Exercise, DME:D-galactose+MitoQ+Exercise)

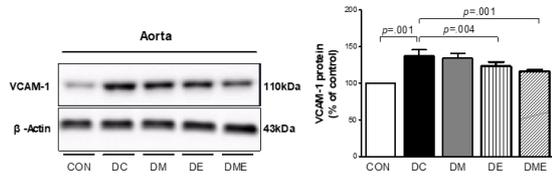


fig 5. Differences of expression level of VCAM-1 in each group. The data shown in the western blot are means from five rat aorta tissue. β -actin was probed as an internal control. Bonferroni post-hoc test after ANOVA. Values are presented as the mean \pm SD. (Con:Control, DC:D-galactose+Control, DM:D-galactose+MitoQ, DE:D-galactose+Exercise, DME:D-galactose+MitoQ+Exercise)

($p=.004$)과 DME($p=.001$) 집단은 DC 집단에 비해 유의하게 감소하였다.

논 의

노화에 의해 발생하는 대표적인 질환인 심혈관질환의 발생률이 증가함에 따라 심혈관질환의 관리와 예방을 위한 대안으로 운동과 외인성 항산화제의 섭취는 많은 관심을 받고있다. 따라서 본 연구는 D-galactose로 유도된 노화 쥐를 대상으로 8주간의 트레드밀 운동과 미토콘드리아를 표적으로 작용하는 항산화제 MitoQ 처치가 NADPH oxidase 활성 및 항산화 효소의 발현조절에 따른 혈관기능에 미치는 영향을 규명하고자 하였다.

기존의 선행연구들에 따르면 노화와 함께 증가하는 혈

관 내중막 두께는 뇌 혈관 및 심혈관 질환으로 이어질 가능성이 높다고 보고되고 있다(Bots 등, 1997; Raitakari 등, 2003). 본 연구에서 D-galactose 처치를 통해 유도한 노화 동물모델의 대동맥 내중막 두께를 분석한 결과, 노화를 유도한 DC 집단과 대동맥 혈관 두께가 CON 집단과 비교하여 상대적으로 높은 것을 확인하였다. 이는 노화가 진행됨에 따라 혈관 내중막의 두께가 증가한다고 보고한 O'Leary 등(1999)과 Najjar 등(2005)의 연구결과와 일치하였다. 운동과 MitoQ 처치에 의한 혈관 두께의 변화는 DM, DE, DME 집단이 DC 집단과 비교하여 상대적으로 얇은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 혈관벽의 진단능력에서 기인하는 운동의 긍정적 효과로 추론되며(Gnasso 등, 1996), MitoQ 처치의 경우 명확한 원인을 알 수 없지만 MitoQ에 의한 항산화 작용에서 기인하는 긍정적 영향이 혈관의 구조적 변화에 기여한 것으로 판단된다(Escribano-Lopez 등, 2016). 복합 처치를 통한 혈관 내중막 두께의 변화는 단일처치 집단과 차이가 없는 것으로 확인되었다.

Zalba 등(2005)은 심혈관질환의 진단척도인 혈관 내중막 두께와 NADPH oxidase의 연관성에 대해 NADPH oxidase를 통한 ROS의 증가는 혈관내피 뿐만 아니라 다른 조직에까지 손상을 준다고 제안하였다(Zalba 등, 2000; Parola & Robino, 2001). 이를 근거로 트레드밀 운동과 MitoQ 처치에 따른 혈관 내 NADPH oxidase 하위 구성요소 gp91phox, p22phox 및 p47phox 단백질의 발현 수준을 분석한 결과, 모든 구성요인들의 발현수준이 CON 집단과 비교하여 DC 집단에서 증가하였으며, 운동과 MitoQ 처치 및 복합처치에 의해 구성요인들의 발현수준이 일부 회복되는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 노화로 인한 혈관 내 NADPH oxidase의 발현증가를 증명하며, 운동과 MitoQ 처치에 의한 산화 스트레스 발생기전의 긍정적 조절 가능성을 제안한다(Chernyak 등, 2006; La Favor 등, 2016).

미토콘드리아 내 적정수준의 반응산소종은 항산화 효소에 의해 환원되어 체내의 항상성을 유지시키지만(Melov 등, 2000), 과도한 반응산소종 증가에 의한 산화적 환경에서는 미토콘드리아 기능장애가 유발되어 혈관 내피세포의 손상을 일으킨다. 본 연구에서 운동과 MitoQ 처치를 통해 유도되는 항산화 효소의 발현수준 변화 분석

한 결과, SOD-2와 catalase 발현수준이 DC 집단에서 감소한 것으로 나타났으며, 일부 결과를 제외하고 운동, MitoQ 그리고 복합처치에 의해 항산화 효소의 발현이 회복되는 것으로 확인되었다. 이는 노화 쥐를 대상으로 운동 및 MitoQ 처치 후 항산화 효소의 증가를 보고한 Navarro 등(2004), Gioscia-Ryan 등(2018)의 연구와 일치하였다. 종합적으로 보았을 때 운동과 MitoQ의 복합 처치는 혈관 내 항산화 기능조절에 긍정적으로 기여할 수 있다고 판단된다.

NADPH oxidase의 활성 감소와 미토콘드리아의 기능 향상으로 산화적 스트레스가 감소된 환경에서는 혈관확장에 기여하는 산화질소가 증가하여 혈관내피세포의 안정상태가 유지되지만(Hobbs 등, 1999), 혈관 내 산화적 손상을 유발하는 반응산소종이 증가된 환경에서는 VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1)과 같은 혈관접착인자가 증가하고 반대로 혈관확장인자인 eNOS(endothelial Nitric oxide synthase)의 발현은 감소하여 혈관 기능장애를 유발시킨다고 보고하였다(Kobayashi 등, 2003). 본 연구에서 D-galactose로 유도된 노화 쥐의 혈관기능을 대동맥 내 VCAM-1과 혈관내피산화질소합성효소(endothelial Nitric Oxide Synthase)의 발현수준으로 분석한 결과, MitoQ 처치 집단의 VCAM-1 결과를 제외하고 혈관접착 및 혈관기능개선 관련인자에 대한 노화의 부정적 영향이 운동과 MitoQ 처치에 의해 일부 회복되는 것을 확인하였다.

종합해보면, 트레드밀 운동과 MitoQ 처치는 항산화 효소의 증가를 통해 노화에 의해 유도된 산화적 불균형 개선과 함께 혈관의 구조적, 기능적 변화를 유도하는 것으로 확인됨에 따라 규칙적인 운동과 미토콘드리아를 표적으로 하는 항산화제 MitoQ 처치의 혈관기능장애 개선에 대한 긍정적 가능성을 제안한다. 그러나 복합처치의 실험결과가 단일처치보다 유의한 차이가 없는 결과는 Mari 등(2015)의 보고한 바와 같이 항산화제인 MitoQ가 운동을 통해 작용되는 미토콘드리아의 산화와 환원 조절 작용에 부정적인 영향을 타내어 복합처치의 효과가 낮을 가능성도 있다고 판단되어진다. 따라서, MitoQ와 운동과 관련 후속연구를 통해 추가적 논의가 요구된다.

결론 및 제언

본 연구는 8주간 트레드밀 운동과 MitoQ 처치가 D-galactose로 유도된 노화 쥐의 대동맥에서 산화적 불균형에 기여하는 NADPH oxidase 복합체 구성요인 및 항산화 효소 그리고 혈관 기능관련 인자의 발현수준을 분석한 결과, 트레드밀 운동과 MitoQ 처치는 노화에 의해 유도되어 산화적 불균형 개선과 함께 혈관의 구조적, 기능적 변화를 유도하는 것으로 확인되었다. 따라서, 규칙적인 운동과 미토콘드리아를 표적으로 작용하는 항산화제 MitoQ의 처치는 혈관기능장애의 개선에서 비롯되는 심혈관질환의 예방 및 완화에 기여하는 대안으로 제안할 수 있으며, MitoQ와 운동과 관련하여 추가적인 후속연구가 필요할 것이다.

참고문헌

- Bots, M. L., Hoes, A. W., Koudstaal, P. J., Hofman, A., Grobbee, D. E. (1997). Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation*, *96*(5), 1432-7.
- Braakhuis, A. J., Nagulan, R., Somerville, V. (2018). The Effect of MitoQ on Aging-Related Biomarkers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 8575263.
- Chernyak, B. V., Izyumov, D. S., Lyamzaev, K. G., Pashkovskaya, A. A., Pletjushkina, O. Y., Antonenko, Y. N., Sakharov, D. V., Wirtz, K. W., Skulachev, V. P. (2006). Production of reactive oxygen species in mitochondria of HeLa cells under oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1757*(5-6), 525-34.
- Dai, D. F., Rabinovitch, P. S., Ungvari, Z. (2012). Mitochondria and cardiovascular aging. *Circulation Research*, *110*(8), 1109-24.
- Deanfield, J. E., Halcox, J. P., Rabelink, T. J. (2007). Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*, *115*(10), 1285-95.
- Deem, T. L., Cook-Mills, J. M. (2004). Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) activation of endothelial cell matrix metalloproteinases: role of reactive oxygen species. *Blood*, *104*(8), 2385-93.
- Di Francescomarino, S., Sciarilli, A., Di Valerio, V., Di Baldassarre, A., Gallina, S. (2009). The effect of physical exercise on endothelial function. *Sports Medicine*, *39*(10), 797-812.
- Drummond, G. R., Sobey, C. G. (2014). Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? *Trends Endocrinology Metabolism*, *25*(9), 452-63.
- Duerrschmidt, N., Stielow, C., Muller, G., Pagano, P. J., Morawietz, H. (2006). NO-mediated regulation of NAD(P)H oxidase by laminar shear stress in human endothelial cells. *The Journal of Physiology*, *576*(Pt2), 557-67.
- Escribano-Lopez, I., Diaz-Morales, N., Rovira-Llopis, S., de Marañon, A. M., Orden, S., Alvarez, A., Banuls, C., Rocha, M., Murphy, M. P., Hernandez-Mijares, A., Victor, V. M. (2016). The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ modulates oxidative stress, inflammation and leukocyte-endothelium interactions in leukocytes isolated from type 2 diabetic patients. *Redox Biology*, *10*, 200-205.
- Fearheller, D. L., Brown, M. D., Park, J. Y., Brinkley, T. E., Basu, S., Hagberg, J. M., Ferrell, R. E., Fenty-Stewart, N. M. (2009). Exercise training, NADPH oxidase p22phox gene polymorphisms, and hypertension. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, *41*(7), 1421-8.
- Frey, R. S., Ushio-Fukai, M., Malik, A. B. (2009). NADPH oxidase-dependent signaling in endothelial cells: role in physiology and pathophysiology. *Antioxidants & Redox Signaling*, *11*(4), 791-810.
- Fukai, T., Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, *15*(6), 1583-606.
- Gioscia-Ryan, R. A., LaRocca, T. J., Sindler, A. L., Zigler, M. C., Murphy, M. P., Seals, D. R. (2014). Mitochondria-targeted antioxidant (MitoQ) ameliorates age-related arterial endothelial dysfunction in mice. *The Journal of Physiology*, *592*(12), 2549-61.
- Gnasso, A., Carallo, C., Irace, C., Spagnuolo, V., De Novara, G., Mattioli, P. L., Pujia, A. (1996). Association between intima-media thickness and wall shear stress in common carotid arteries in healthy male subjects. *Circulation*, *94*(12), 3257-62.
- Gruber, J., Fong, S., Chen, C. B., Yoong, S., Pastorin, G., Schaffer, S., Cheah, I., Halliwell, B. (2013). Mitochondria-targeted antioxidants and metabolic modulators as pharmacological interventions to slow ageing. *Biotechnology Advances*, *31*(5),

- 563-92.
- Haendeler, J., Eckers, A., Lukosz, M., Unfried, K., & Altschmied, J. (2012). Endothelial NADPH oxidase 2: when does it matter in atherosclerosis? *Cardiovascular Research*, *94*(1), 1-2.
- Hambrecht, R., Wolf, A., Gielen, S., Linke, A., Hofer, J., Erbs, S., Schoene, N., Schuler, G. (2000). Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *The New England Journal of Medicine*, *342*(7), 454-60.
- Heitzer, T., Schlinzig, T., Krohn, K., Meinertz, T., Munzel, T. (2001). Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*, *104*(22), 2673-8.
- Higashi, Y., Yoshizumi, M. (2004). Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. *Pharmacology & Therapeutics*, *102*(1), 87-96.
- Higashi, Y., Noma, K., Yoshizumi, M., Kihara, Y. (2009). Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circulation Journal*, *73*(3), 411-8.
- Hill, J. M., Zalos, G., Halcox, J. P., Schenke, W. H., Waclawiw, M. A., Quyyumi, A. A., Finkel, T. (2003). Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *The New England Journal of Medicine*, *348*(7), 593-600.
- Hobbs, A. J., Higgs, A., Moncada, S. (1999). Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *39*, 191-220.
- Hong, Y. P., Lee, H. C., Kim, H. T. (2015). Treadmill exercise after social isolation increases the levels of NGF, BDNF, and synapsin I to induce survival of neurons in the hippocampus, and improves depression-like behavior. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry*, *19*(1), 11-8.
- Kobayashi, N., Mita, S., Yoshida, K., Honda, T., Kobayashi, T., Hara, K., Nakano, S., Tsubokou, Y., Matsuoka, H. (2003). Celiprolol activates eNOS through the PI3K-Akt pathway and inhibits VCAM-1 Via NF-kappaB induced by oxidative stress. *Hypertension*, *42*(5), 1004-13.
- La Favor, J. D., Dubis, G. S., Yan, H., White, J. D., Nelson, M. A., Anderson, E. J., Hickner, R. C. (2016). Microvascular Endothelial Dysfunction in Sedentary, Obese Humans Is Mediated by NADPH Oxidase: Influence of Exercise Training. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *36*(12), 2412-2420.
- Lei, M., Hua, X., Xiao, M., Ding, J., Han, Q., Hu, G. (2008). Impairments of astrocytes are involved in the d-galactose-induced brain aging. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *369*(4), 1082-7.
- Mao, P., Manczak, M., Shirendeb, U. P., Reddy, P. H. (2013). MitoQ, a mitochondria-targeted antioxidant, delays disease progression and alleviates pathogenesis in an experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model of multiple sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1832*(12), 2322-31.
- Mari C. G., Andrea S. P., Helena C., Beatriz F., Jose V. (2015). Redox modulation of mitochondriogenesis in exercise. Does antioxidant supplementation blunt the benefits of exercise training? *Free Radical Biology and Medicine*, *86*, 37-46.
- Marsh, S. A., Coombes, J. S. (2005). Exercise and the endothelial cell. *International Journal of Cardiology*, *99*(2), 165-9.
- McManus, M. J., Murphy, M. P., Franklin, J. L. (2011). The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ prevents loss of spatial memory retention and early neuropathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal Of Neuroscience*, *31*(44), 15703-15.
- Melov, S., Ravenscroft, J., Malik, S., Gill, M. S., Walker, D. W., Clayton, P. E., Wallace, D. C., Malfroy, B., Doctrow, S. R., Lithgow, G. J. (2000). Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science*, *289*(5484), 1567-9.
- Murphy, M. P., Smith, R. A. (2007). Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *47*, 629-56.
- Najjar, S. S., Scuteri, A., Lakatta, E. G. (2005). Arterial aging: is it an immutable cardiovascular risk factor? *Hypertension*, *46*(3), 454-62.
- Navarro, A., Gomez, C., Lopez-Cepero, J. M., Boveris, A. (2004). Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, *286*(3), R505-11.
- O'Leary, D. H., Polak, J. F., Kronmal, R. A., Manolio, T. A., Burke, G. L., Wolfson, S. K. Jr. (1999). Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *The New England Journal of Medicine*, *340*(1), 14-22.
- Parola, M., Robino, G. (2001). Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *Journal of Hepatology*, *35*(2), 297-306.
- Raitakari, O. T., Juonala, M., Kahonen, M., Taittonen, L., Laitinen,

- T., Maki-Torkko, N., Jarvisalo, M. J., Uhari, M., Jokinen, E., Ronnema, T., Akerblom, H. K., Viikari, J. S. (2003). Cardiovascular risk factors in childhood and carotid artery intima-media thickness in adulthood: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *JAMA*, 290(17), 2277-83.
- Rajendran, P., Rengarajan, T., Thangavel, J., Nishigaki, Y., Sakthisekaran, D., Sethi, G., Nishigaki, I. (2013). The vascular endothelium and human diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 9(10), 1057-69.
- Rossmann, M. J., Santos-Parker, J. R., Steward, C. A. C., Bispham, N. Z., Cuevas, L. M., Rosenberg, H. L., Woodward, K. A., Chonchol, M., Gioscia-Ryan, R. A., Murphy, M. P., Seals, D. R. (2018). Chronic Supplementation With a Mitochondrial Antioxidant (MitoQ) Improves Vascular Function in Healthy Older Adults. *Hypertension*, 71(6), 1056-1063.
- Seals, D. R., Desouza, C. A., Donato, A. J., Tanaka, H. (2008). Habitual exercise and arterial aging. *Journal of Applied Physiology*, 105(4), 1323-32.
- Selemedis, S., Dusting, G. J., Peshavariya, H., Kemp-Harper, B. K., Drummond, G. R. (2007). Nitric oxide suppresses NADPH oxidase-dependent superoxide production by S-nitrosylation in human endothelial cells. *Cardiovascular Research*, 75(2), 349-58.
- Sena, L. A., Chandel, N. S. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular Cell*, 48(2), 158-67.
- Sumpio, B. E., Riley, J. T., Dardik, A. (2002). Cells in focus: endothelial cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(12), 1508-12.
- Supinski, G. S., Murphy, M. P., Callahan, L. A. (2009). MitoQ administration prevents endotoxin-induced cardiac dysfunction. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 297(4), R1095-102.
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552(Pt2), 335-44.
- Vergeade, A., Mulder, P., Vendeville-Dehaut, C., Estour, F., Fortin, D., Ventura-Clapier, R., Thuillez, C., Monteil, C. (2010). Mitochondrial impairment contributes to cocaine-induced cardiac dysfunction: Prevention by the targeted antioxidant MitoQ. *Free Radical Biology & Medicine*, 49(5), 748-56.
- Wang, J., Wolin, M. S., Hintze, T. H. (1993). Chronic exercise enhances endothelium-mediated dilation of epicardial coronary artery in conscious dogs. *Circulation Research*, 73(5), 829-38.
- Zalba, G., Beaumont, F. J., San Jose, G., Fortuno, A., Fortuno, M. A., Etayo, J. C., Diez, J. (2000). Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 35(5), 1055-61.
- Zalba, G., Beloqui, O., San Jose, G., Moreno, M. U., Fortuno, A., Diez, J. (2005). NADPH oxidase-dependent superoxide production is associated with carotid intima-media thickness in subjects free of clinical atherosclerotic disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(7), 1452-7.

트레드밀 운동과 MitoQ 처치가 D-galactose로 유도된 노화 쥐의 혈관기능에 미치는 영향

김동원 · 권기천 · 최동훈 · 황동주 · 구정훈(한국체육대학교, 석사·박사수료·박사·박사수료·박사),
오유성(서울시립대학교, 교수), 조준용(한국체육대학교, 교수)

【목적】 본 연구의 목적은 D-galactose로 유도된 노화 쥐를 대상으로 트레드밀 운동과 MitoQ 처치가 대동맥 내 NADPH oxidase와 항산화 및 혈관기능에 미치는 영향을 알아보는 데 있다. **【방법】** 노화 유도는 D-galactose를 생리식염수에 녹여 100 mg/kg의 용량을 총 10주간 1일 1회 SD rat(Sprague-Dawley rat) 복강 내 주사(intraperitoneal injection)하였다. 실험집단은 Control group(CON, n=9), D-galactose control group(DC, n=9), D-galactose+MitoQ group(DM, n=9), D-galactose+Exercise group(DE, n=9), D-galactose+MitoQ+Exercise group(DME, n=9)의 총 5개의 집단으로 구분하였으며, 트레드밀 운동은 주 5일 8주간 점진적으로 증가시키는 운동 강도로 실시하였고 MitoQ 처치는 운동이 진행되는 8주 동안 주 2회 100 μ M/kg의 농도로 회석하여 복강 내 주사하였다. **【결과】** 트레드밀 운동과 MitoQ 처치는 NADPH oxidase의 수준을 감소시키고 SOD-2, catalase와 같은 항산화효소를 증가시켜 혈관기능에 관여하는 단백질인 eNOS의 수준을 증가시키는 반면 VCAM-1의 수준은 감소시키는 긍정적인 효과를 보였다. 이를 통한 혈관 내중막 두께를 감소시킬 뿐만 아니라 인지능력 또한 유의하게 증가시켰다. **【결론】** 따라서 운동과 MitoQ 처치는 노화로 인한 혈관기능장애를 개선하고 치료하는데 효과적인 것으로 나타났다.

주요어: 노화, 활성산소, 혈관기능, 혈관내피세포, 트레드밀 운동, 마이토큐