



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

박사학위논문

좌골신경 손상 후 규칙적인 운동이
축삭재생, 비복근과 가자미근의
근 비대에 미치는 영향

제주대학교 대학원

체육학과

김 지 은

2020년 8월

좌골신경 손상 후 규칙적인 운동이 축삭재생, 비복근과 가자미근의 근 비대에 미치는 영향

지도교수 김 영 표

김 지 은

이 논문을 체육학 박사학위 논문으로 제출함

2020년 8월

김지은의 체육학 박사학위 논문을 인준함

심사위원장	서 태범	(인)
위 원	류 제철	(인)
위 원	김 미애	(인)
위 원	현 광석	(인)
위 원	김 영표	(인)

제주대학교 대학원

2020년 8월

Effect of regular exercise on axonal regrowth,
soleus and gastrocnemius hypertrophy
after sciatic nerve injury

Ji-Eun Kim

(Supervised by professor Yeong-Pyo Kim)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree
of Doctor of Kinesiology

2020. 08.

This thesis has been examined and approved

.....
Thesis director, Tae-Beom, Seo, Prof., Dept. of Kinesiology
.....
.....
.....

.....
Date

Department of Kinesiology
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

I. 서 론	1
1. 연구의 필요성	1
2. 연구의 목적	5
3. 연구의 가설	5
4. 용어 정의	6
II. 이론적 배경	9
1. 월러변성과 축삭재생	9
2. 말초신경재생 관련 단백질 대사 경로	11
3. 말초신경 재생 시 성장뿔(growth cone) 역할	13
4. 말초신경 재생 유도를 위한 신경영양인자	14
5. 축삭재생에 관여하는 전사인자	17
6. 근비대 및 근위축 유도 단백질 기전	19
III. 연구 I	22
1. 연구의 필요성	22
2. 연구방법	25
1) 실험 동물	25
2) 실험 설계	26
3) 트레드밀 트레이닝 protocol	27
4) 좌골신경수술	28
3. 측정항목 및 방법	30
1) 조직적출	30
2) Western blot analysis	30
3) 등쪽감각신경절(dorsal root ganglion)과 슈반세포의 일차 배양	35
4) 조직학적 면역형광염색법	36
4. 자료처리	36
5. 연구결과	37

IV. 연구 II	50
1. 연구의 필요성	50
2. 연구방법	53
1) 실험 동물	53
2) 실험 설계	53
3) 트레이드밀 트레이닝 protocol	55
3. 측정항목 및 방법	55
1) 조직적출	55
2) Western blot analysis	56
3) 조직학적 면역형광염색법	56
4. 자료처리	57
5. 연구결과	58
V. 논의	71
VI. 결론 및 제언	79
<Abstract>	81
참고문헌	85

<List of Tables>

Table 1. Grouping of the experimental animals in Study I	25
Table 2. Descriptive statistics of neurite outgrowth in DRG after SNI	37
Table 3. Descriptive statistics of GAP-43 expression levels after SNI	38
Table 4. Descriptive statistics of immunofluorescence with NF-200 and GAP-43 in injured nerve after SNI	39
Table 5. Descriptive statistics of p-ERK1/2 expression levels after SNI	41
Table 6. Descriptive statistics of p-CREB expression levels after SNI	42
Table 7. Descriptive statistics of JNK expression levels after SNI	43
Table 8. Descriptive statistics of ATF3 and p-c-Jun expression levels after SNI	44
Table 9. Descriptive statistics of p-ERK1/2 expression levels in ipsilateral soleus after SNI ..	46
Table 10. Descriptive statistics of p-Akt expression levels in ipsilateral soleus after SNI	47
Table 11. Descriptive statistics of p-mTOR expression levels in ipsilateral soleus after SNI	48
Table 12. Descriptive statistics of p-4E-BP1 expression levels in ipsilateral soleus after SNI	49
Table 13. Grouping of the experimental animals in Study II	53
Table 14. Descriptive statistics of GAP-43 expression level by TMT performed pre and post SNI	58
Table 15. Descriptive statistics of p-ERK1/2 expression level by TMT performed pre and post SNI	59
Table 16. Descriptive statistics of p-Akt expression level by TMT performed pre and post SNI	60
Table 17. Descriptive statistics of p-mTOR expression level by TMT performed pre and post SNI	61
Table 18. Descriptive statistics of p-ERK1/2 expression level by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral soleus	62
Table 19. Descriptive statistics of p-Akt expression level by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral soleus	63
Table 20. Descriptive statistics of p-mTOR expression level by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral soleus	64
Table 21. Descriptive statistics of p-4E-BP1 expression level by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral soleus	65
Table 22. Descriptive statistics of p-ERK1/2 expression level by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral gastrocnemius	66
Table 23. Descriptive statistics of p-Akt expression level by TMT performed pre and	

post SNI in ipsilateral gastrocnemius	67
Table 24. Descriptive statistics of p-mTOR expression level by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral gastrocnemius	68
Table 25. Descriptive statistics of p-4E-BP1 expression level by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral gastrocnemius	69
Table 26. Descriptive statistics of muscle fiber size in ipsilateral soleus after SNI	70

<List of Figures>

Figure 1. Wallerian degeneration and regeneration process after peripheral nerve injury	10
Figure 2. Oligodendrocyte and astrocyte in CNS and Schwann cell in PNS	12
Figure 3. The growth cone: axonal elongation	13
Figure 4. PI3K/Akt/mTOR pathway: cell growth	20
Figure 5. Foxo/atrogen-1, MuRF-1 pathway	21
Figure 6. The experimental animals in controlled environment	25
Figure 7. The experimental design for Study I	26
Figure 8. Treadmill apparatus for small animals	27
Figure 9. Animal inhalation narcosis control	28
Figure 10. Sciatic nerve injury procedure	29
Figure 11. Dissected tissues	30
Figure 12. Apparatus for Western blot analysis	31
Figure 13. Apparatus used for SDS-PAGE	32
Figure 14. Electrophoresis	32
Figure 15. Wet transfer	33
Figure 16. Wester ECL substrates	34
Figure 17. Fusion Solo with Western blotting detection system	35
Figure 18. Immunofluorescence staining with NF-200 and hoechst substrates in DRG neurons after SNI	37
Figure 19. Expression level of GAP-43 by TMT after SNI	38
Figure 20. Immunofluorescence staining with NF-200 and GAP-43 proteins in 5mm distal to the injured nerve ..	40
Figure 21. Expression level of p-ERK1/2 by TMT after SNI	41
Figure 22. Expression level of p-CREB by TMT after SNI	42
Figure 23. Expression level of JNK by TMT after SNI	43
Figure 24. ATF3 and p-c-Jun were shown as exercise-dependent proteins at an early stage of nerve regeneration after SNI	45
Figure 25. Expression level of p-ERK1/2 by TMT in ipsilateral soleus after SNI	46
Figure 26. Expression level of p-Akt by TMT in ipsilateral soleus after SNI	47
Figure 27. Expression level of p-mTOR by TMT in ipsilateral soleus afer SNI	48
Figure 28. Expression level of p-4E-BP1 by TMT in ipsilateral soleus after SNI	49

Figure 29. The experimental design for Study II	54
Figure 30. Dissected tissues	55
Figure 31. Expression level of GAP-43 by TMT performed pre and post SNI	58
Figure 32. Expression level of p-ERK1/2 by TMT performed pre and post SNI	59
Figure 33. Expression level of p-Akt by TMT performed pre and post SNI	60
Figure 34. Expression level of p-mTOR by TMT performed pre and post SNI	61
Figure 35. Expression level of p-ERK1/2 by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral soleus	62
Figure 36. Expression level of p-Akt by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral soleus	63
Figure 37. Expression level of p-mTOR by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral soleus	64
Figure 38. Expression level of p-4E-BP1 by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral soleus	65
Figure 39. Expression level of p-ERK1/2 by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral gastrocnemius	66
Figure 40. Expression level of p-Akt by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral gastrocnemius	67
Figure 41. Expression level of p-mTOR by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral gastrocnemius	68
Figure 42. Expression level of p-4E-BP1 by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral gastrocnemius	69
Figure 43. Immunofluorescence staining with Laminin and MyHC-1 staining in ipsilateral soleus	70
Figure 44. Schematic presentation of effect of treadmill exercise on axonal regrowth and muscle hypertrophy after sciatic nerve injury	78

I. 서론

1. 연구의 필요성

신경계(nervous system)는 중추신경계(central nervous system)와 말초신경계(peripheral nervous system)로 구분된다. 중추신경계에 속하는 뇌와 척수의 회백질(gray matter)에서 보내진 신호는 말초신경에 의해서 온몸으로 소통되어진다. 뉴런(neuron)은 신경돌기(neurites)라 칭하는 축삭(axon)과 축삭돌기(dendrite)들이 갖추어져 있어 이웃해 있는 신경세포들과 연결하여 기능적인 네트워크를 형성한다(Jin et al, 2012).

말초신경이 손상을 입을 경우, 손상부위에서 말단 부위 쪽으로 월리변성(Wallerian degeneration)이라는 축삭변성이 점차적으로 일어난다(Allodi et al, 2012). 이로 인해 손상부위에 신경돌기 간의 연결이 끊어지고 신경학적 통증 발생은 물론 운동과 감각 기능의 상실을 초래한다(Fitzgerald & McKelvey, 2016). 그러나 대식세포(macrophagy)가 손상된 슈반세포로 침윤(infiltration)하여 축삭변성으로 인해 발생한 잔해(axonal debris)들을 자식작용(autophagy)으로 제거함으로써 신경재생(neuronal regeneration)과 축삭재성장(axonal regrowth)이 이루어질 수 있는 공간을 확보한다(Zigmond & Echevarria, 2019). 반면에 중추신경은 말초 신경에 비하여 월리변성이 이루어지는 시기가 한참 지연되어 손상 부위의 축삭, 수초(myelin sheath) 아교세포(glia cell), 내피세포(endothelial cell)등의 잔해물이 정리되지 않은 환경으로 인해 신경재생과 축삭 재성장이 이루어질 수 있는 공간이 확보되지 않아 생리학적 회복 제약을 가져온다(George & Griffin, 1994; Mietto et al, 2015). 그러므로 중추신경손상과 달리 말초신경 손상은 손상 부위의 재성장과 기능적인 회복을 기대할 수 있다.

말초신경계의 기본적인 신경아교세포(neuroglia cell)인 슈반세포(Schwann cell)는 두 가지 유형으로 나뉜다. 그 중 하나는 리막 세포(Remak cell) 혹은 무수초

(non-myelin) 슈반세포이다. 리막 세포는 작은 직경의 축삭으로 감싸져 있고 많은 감각 축삭과 자율신경계 축삭이 여기에 속한다. 다른 하나는 수초로 감싸여져 있는 큰 축삭으로 리막 세포보다 2-3배는 길고 두껍게 형성되어 있다(Liu et al., 2019). 이 두 가지 슈반세포의 축삭은 대사적, 영양학적 공급을 제공받지만 수초화된 세포만이 신경자극전도(nerve impulse conduction)를 가속화하는 중요한 역할을 한다(Jessen & Mirsky, 2016). 수초는 연속적이지 않으며 일정한 간격으로 축삭을 감싸고 있다. 인접한 슈반세포와의 사이에는 약 1 μ m의 랑비에르 결절(node of Ranvier)이 자리하고 있어 활동전위(action potential)가 결절과 결절 사이를 뛰어넘는 도약전도(saltatory conduction)를 하기 때문에 반응 속도를 증가시킨다(Carroll, 2017; Salzer, 2015).

또한, 슈반세포는 대식세포에 의해 앞서 언급한 월러변성으로 인해 퇴행하는 조직(degenerated tissue)을 제거하여 새로운 축삭이 재성장하고 재수초화(remyeliation)될 수 있는 환경을 제공한다(Ceci et al., 2014; Zhou & Notterpek, 2016). 변성된 수초를 정리한 후, 말초신경은 기저막(basal laminae)으로 감싸여진 버그너 밴드(bands of Büngner)라는 구획화된 구조(columnar structure)를 따라 축삭 재생이 이루어진다. 즉, 슈반세포는 소실되었던 축삭과의 연결이 다시 일어나고 수초화된 세포에서 다시 분화(differentiation)를 진행한다(Gomez-Sanchez et al., 2017). 하지만 신경손상 후 버그너 밴드가 닫히기 전에 축삭의 성장이 제대로 이루어지지 않게 되면 섬유아세포(fibroblast cell)가 슈반세포의 자리를 대신하여 신경 재생이 어렵게 되고 신경손상으로 인한 기능적 회복에 제약을 받는다(Jessen & Farraj, 2018).

슈반세포내로 세포외 소듐(extracellular sodium)과 칼슘(calcium) 유입의 증가는 말초신경의 기계적 손상(mechanical insult)과, 혈액과 산소공급의 차단으로 인해 발생한다. 이는 활동전위(action potential) 발생을 유도하여 축삭 퇴행을 야기하는 단백질분해효소(protease)인 calpain과 세포골격을 이루는 spectrin과의 결합을 촉진시켜 본격적으로 축삭의 구조가 붕괴되기 시작한다(He & Jin, 2016). 이러한 초기에 발생하는 신경 손상 신호는 세포내 mitogen-activated protein kinase family(MAPK): extracellular signal-regulated kinases 1 and 2(ERK1/2), stress activated protein kinases(p38 MAPK) 그리고 c-Jun NH₂-terminal kinases(JNK)와 같은 유전자 조절 단백질들을 활성화시킨다. ERK1/2 신경전달경로(signal cascade)는, 세포막에서

GTPase Ras가 Raf-1 효소를 활성화시키고, 곧이어 MEK1/2와 ERK1/2 순으로 활성화된다. 이러한 신호전달경로를 통해 세포의 생존(survival)과 증식(proliferation)을 가져온다(Boyer et al., 2019). 그리고 P38 MAPK의 활성화는 월러변성 과정 중 발현되는 분자 신호(molecular signal) 중 하나이며 칼슘, 시냅스의 크기를 조절하는 단백질 뉴레굴린(neuregulin), 그리고 섬유아세포 성장 인자-2(Fibroblast Growth Factor-2, FGF-2) 수치를 증가시킨다. 마지막으로, JNK는 말초신경손상 후 슈완세포의 수초화 수치를 나타내는 전사인자인 c-Jun 발현을 이끌어내는 매개 효소이다. 단백질 신호 전달 경로 중 하위분자(downstream)에서의 c-Jun은 손상 말단부의 변성으로 인해 발생한 잔해 정리와 슈반세포 확산(proliferation)과 관련된 유전자 발현에 중요한 전사인자(transcription factor)이다(Svenningsen & Dahlin, 2013).

이처럼 말초신경의 기계적 손상 후 축삭-슈반세포의 연결 및 축삭재생의 발판을 제공하는 분자 신호와 합성(synthesis)은 중요한 기전이다. 그러므로 슈반세포의 확산, 손상된 신경 부위로의 세포 이동(migration), 그리고 재수초화에 관여하는 분자 현상(molecular event)에 대한 연구는 성공적인 재생과 기능적 회복에 중요할 것으로 사료된다.

신경 재생이 일어나는 동안에 발현되는 많은 단백질 중 하나인, growth associated protein-43(GAP-43)는 신경의 성장과 재생에 밀접한 관련이 있고, 축삭 성장뿔(axonal growth cone)의 양을 확인하는 신경재생 표식인자(neuronal marker)이다(Curtis et al., 1992). Vaudano 등은(1995) 좌골신경 손상 후 재생이 일어나는 부위에서 GAP-43의 발현량이 증가하였다고 보고하였다. 그리고 Curtis 등의(1992) 연구에서는 축삭 연결의 소실은 GAP-43의 발현량을 증가시켜 슈반세포의 축삭 성장을 촉진시킨다고 보고하였다. 관련 연구에 따르면, 트레드밀 운동은 말초신경 손상 후 재생 초기 단계에 ERK1/2, GAP-43 상향 발현을 이끌어 축삭 재생을 향상시킬 수 있는 슈반세포 증진을 촉진시킨다고 보고하였다(Armada-da-Silva et al., 2013). 따라서 신체활동은 말초신경 손상 후 신경 재생을 촉진하는데 필요한 과정이다.

신경 손상은 관련 표적 근육과의 탈신경(denervation)으로 인해 근육량(muscle mass)과 근섬유 크기(muscle fiber size)의 감소를 초래한다. 이러한 근육위축(muscle atrophy)은 단백질 퇴행(protein degradation)의 증가와 단백질 합성(protein

synthesis)의 감소로 인해 나타나는 현상이다(Schiaffino et al., 2013). 골격근(skeletal muscle)은 인체에서 가장 큰 기관으로 인체의 40%의 양을 차지하고 모든 단백질의 50~70%가 근육에 함유되어 있다. 따라서 근육량의 감소는 독립적인 생활, 삶의 질, 기대수명과 깊게 연관되어 있다(Langer et al., 2018).

최근의 많은 연구에서는 유산소성 운동이 유산소성 능력(aerobic capacity), 심혈관 기능(cardiovascular function), 대사성 조절(metabolic regulation)과 관련되어 있으나 근육량에는 미미한 영향을 미친다고 보고하였다. 하지만 유산소성 운동은 이화작용에 관여하는 단백질 발현을 감소시키고 ATP 형성에 관여하는 미토콘드리아 발생과 활성화(mitochondria biogenesis and dynamics)를 촉진시키며, 또한 근 비대 관련 단백질 합성을 증가시킨다(Konopka & Harber, 2014). 따라서 유산소성 운동은 유산소성 능력을 향상시킬 뿐만 아니라 근육의 크기를 증가시킨다. Konopka 등의(2010) 연구에서는 12주간의 유산소성 운동이 근 감소를 보이는 노인 여성의 골격근 조절에 관여하는 분자 요인(molecular factor)의 증가와 근 건강에 효과가 있음을 보여주었다.

근 비대를 조절하는 주요한 신경전달경로(signaling pathway) 중 하나인 Akt/mTOR는 근 성장 조절에 긍정적인 영향을 미친다(Maltzahn et al., 2012). 많은 연구에서 근성장과 재생에 필요한 insulin like growth factor-I(IGF-I)이 IGF-I 수용체(IGFR)에 결합(binding)한 후 receptor tyrosine kinase에 의해 insulin receptor substrate-1(IRS-1)을 결합시킨다. IGF-I/IGFR/IRS-1에 의한 Akt/mTOR 신호전달 체계는 근 비대에 직접적으로 필요하다는 것을 보여주었다. Akt(protein kinase B)는 tuberous sclerosis 1/2(TSC1/2) 인산화시켜 G protein Rheb쪽으로 TSC1/2의 GTPase-activating protein(GAP) 활성을 억제한다. 그 후 GTP-bound Rheb은 mammalian target of rapamycin(mTOR)를 활성화시키고 이는 ribosomal protein S6 kinase 1(S6K1)와 eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1(4E-BP1)을 인산화 시킨다. 결과적으로 S6K1과 4E-BP1의 인산화는 단백질 합성을 촉진하여 근 비대를 가져온다(Yoon, 2017). 하지만 Ito et al., (2018) 연구에서, 운동에 의한 mTOR의 발현은 근 비대 과정 초기에 활성화되는 IGF-I/Akt pathway에 의해 조절되는 것이 아니라 운동을 통해 세포내 칼슘 수치로 인해 활동전위를 발현시켜 근수축 작용 기전 활성화를 통해 mTOR가 조절되고 이로써 근 비대를 가져온

다는 결과를 보였다. 이러한 선행연구들은 근성장시 Akt/mTOR 신호전달체계에 대해 구체적으로 설명되고 있지만, 좌골신경과 같은 말초신경 손상 후 운동이 축삭재생과 근 위축 억제에 관련된 연구는 미비한 실정이다. 따라서 좌골신경 손상 후 규칙적인 유산소성 운동 수행이 근 비대 관련 Akt/mTOR 신호전달체계에 미치는 영향이 명확하게 제시되어야 한다고 생각된다.

2. 연구의 목적

본 연구의 목적은 첫 번째 Sprague-Dawley계열 쥐를 대상으로 좌골신경 손상 후 규칙적인 운동 수행이 Akt/mTOR 신호전달체계 활성화를 유도하여 축삭재생과 근 위축억제에 미치는 영향을 규명하고(Study I), 두 번째 좌골신경 손상 전·후 수행한 운동 시점에 따른 축삭재성장(axonal regrowth) 및 비복근(gastrocnemius)과 가자미근(soleus) 비대 관련 기전에 미치는 효과를 분석하고자 하는데 있다(Study II).

3. 연구의 가설

본 연구 목적을 달성하기 위하여 다음과 같은 연구 가설을 설정하였다.

- 1) 좌골신경 손상 후, 운동은 축삭재성장을 촉진시킬 것이다.
- 2) 좌골신경 손상 후, 운동은 신경에서 GAP-43, p-ERK1/2, Akt, mTOR 그리고 4E-BP1의 발현을 증가시킬 것이다.
- 3) 좌골신경 손상 후, 운동은 근 비대 관련 단백질 발현을 촉진시킬 것이다.
- 4) 좌골신경 손상 전, 운동이 축삭 재성장을 촉진할 것이다.
- 5) 좌골신경 손상 전, 운동은 신경에서 GAP-43, p-ERK1/2, Akt, mTOR 그리고 4E-BP1 발현을 증가시킬 것이다.

- 6) 좌골신경 손상 전, 운동은 근 비대 관련 단백질 발현을 촉진시킬 것이다.
- 7) 좌골신경 손상 전·후, 규칙적인 운동이 축삭재성장을 촉진할 것이다.
- 8) 좌골신경 손상 전·후, 규칙적인 운동은 신경에서 GAP-43, p-ERK1/2, Akt, mTOR 그리고 4E-BP1의 발현을 증가시킬 것이다.
- 9) 좌골신경 손상 전·후, 규칙적인 운동은 인산화된 4EBP1 증가를 유도해 근 비대 관련 단백질 발현을 촉진시킬 것이다.

4. 용어 정의

본 연구에서 사용되는 용어에 대한 정의는 다음과 같다.

1) 좌골신경과 손상(sciatic nerve and injury)

좌골신경은 천골 신경총(sacral plexus)의 하부에서 시작하여 고관절(hip joint)을 지나 하지(lower extremity)로 뻗어 나가는 인체에서 가장 큰 신경이다. 신경 손상을 주기 위해서 실험동물의 왼쪽 다리의 대전자가 축지되는 부위의 피부를 약 2cm정도 절개하고 대둔근을 들어낸 후, 노출된 좌골신경을 포셉(forceps)으로 1분과 30초간 간격으로 두 번 단단히 압박하여 신경 손상을 입힌다.

2) 슈반세포(Schwann cell)

슈반세포는 말초신경계의 신경아교세포이다. 슈반세포는 수초화된 세포와 무수초화된 세포로 나뉜다. 감각과 운동 신경의 축삭을 싸고 있는 수초화된 세포는 말초신경의 신경전달속도, 신경 재생, 신경영양지원, 신경근 연결기능 그리고 면역계에 중요한 역할을 한다.

3) 슈반세포 증식(proliferation)과 이동(migration)

좌골신경 손상 후, 신경 재생 과정 초기에 신경손상 부위의 근위부에서는 신경영양인자의 발현으로 증식(proliferation)이 이루어지고 말단부에서는 월러변성이 이루어진다. 변성으로 인해 발생한 부유물이 제거되는 중에 근위부의 증식된 세포는 재생된 축삭을 따라 말단부로 이동(migration)을 시작한다. 결과적으로 신경과 표적조직(target tissue)과의 탈신경을 재연접한다.

5) 월러변성 (Wallerian degeneration)

좌골신경 손상 후, 말단부에서의 축삭과 수초 퇴행이 발생하고 대식세포가 침범하여 축삭과 수초변성에 의해 발생한 잔해들을 정리해준다.

7) 전방향과 역방향 경로(anterograde and retrograde tracing)

본 연구에서 전방 경로는 척수의 운동신경 세포체(motor neuron cell body)에서 표적 골격근으로 향하는 경로를 의미하고 역방 경로는 좌골신경의 손상부위에서 척수 운동신경 세포체로 향하는 경로를 뜻한다.

8) GAP-43

GAP-43는 43kDa 크기의 시냅스 전 인단백질(phosphoprotein)로 다른 폴리펩타이드 선두에서 발현이 촉진된다. GAP-43는 시냅스 전 종말(presynaptic terminal)의 신경연접과 축삭 성장의 신경학적 표식 인자로서 신경 손상 후 발현이 증가한다.

9) Akt(PKB)

단백질 키나아제 B(protein kinase B)라고 불리며 당대사, 세포이동, 세포증식 과정에 중요한 역할을 하는 serine/threonine kinase이다. mTOR 발현을 억제하는 TSC1/2를 억제하고 근성장 단백질 mTOR를 활성화시킨다. 다른 한편으로 glycogen synthase kinase 3 beta(GSK3 β)를 인산화 시켜 당 합성 단백질(glycogen

synthase)을 비활성화 시킨다.

10) mTOR

mTOR는 상위분자인 IGF-1의 하위 분자로서 세포 영양, 산소, 에너지를 감지한다. mTOR pathway는 포유동물의 간(liver), 근육(muscle), 장(intestinal), 등의 대사 작용(metabolism)과 생리작용(physiology)에 중요한 역할을 한다(Wei et al., 2019). mTOR는 하위분자인 4E-BP1의 인산화를 이끌어 세포성장을 위한 단백질 합성에 기여한다.

11) 4E-BP1

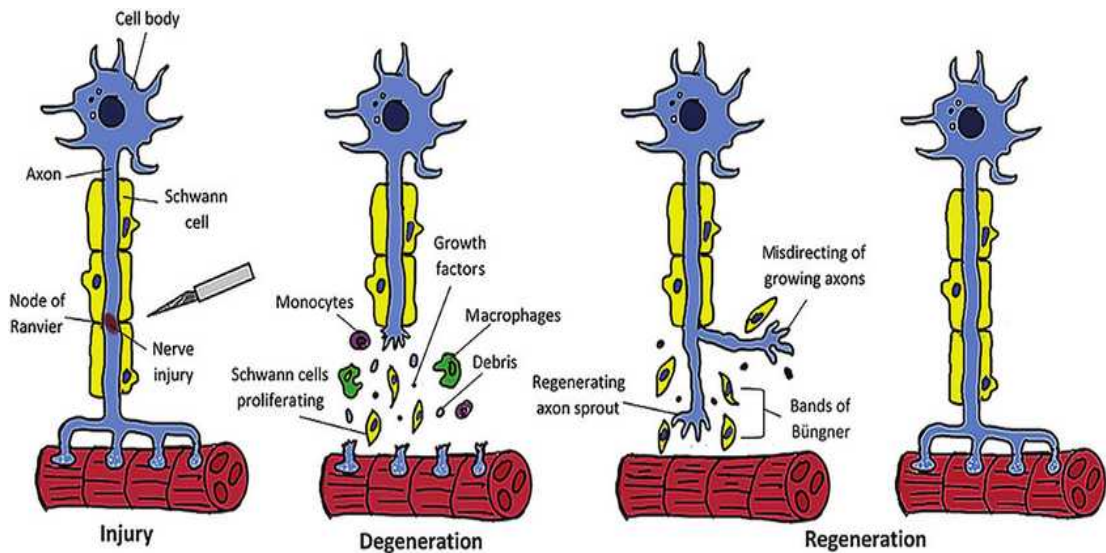
진핵 세포 번역 개시 인자 4E-결합 단백질 1은 EIF4EBP1 유전자에 의해 코딩되는 단백질로써 번역 억제 단백질(translation repressor protein)이다. mTOR 신호전달체계의 하위 분자로서 mTOR에 의해 인산화 되며, 이는 단백질 합성을 증진시켜 세포 성장을 가져온다(Qin et al., 2016).

II. 이론적 배경

1. 월리변성과 축삭재생

말초신경손상은 중추신경손상과 다르게 재생의 기능을 가지고 있어 손상을 받으면 아교세포인 슈반세포의 가소성(plasticity)에 의해 손상 부위를 빠르게 회복시킨다(Boerboom, 2017). 중추신경계의 대표적 세포들인 희소돌기아교세포(oligodendroglia)는 수초에 큰 축삭을 형성하고 정상세포(astroglia)는 신경망(neuropil)에 이온과 분자 농도를 조절한다. 반면에 말초신경계 세포인 슈반세포는 축삭의 직경과 세포골격 구조를 조절한다. 수초는 지방질의 아교세포 혹은 슈반세포 원형질막으로써 빠른 신경전달을 위한 도약전도를 이끌어낸다(Gordon, 2016). 일부 정상세포를 제외하고 중추신경의 아교세포는 기저막이 존재하지 않아 중추신경조직안의 혈관 외벽 연질막(pia mater)과 연결되어 있지 않기 때문에 말초신경의 슈반세포와 다르게 축삭 재생장을 촉진하는데 제약이 있다. 또한 중추신경세포는 말초신경세포보다 월리변성이 지연되어 나타날 뿐 아니라 축삭 재생장에 적합한 환경을 제공하지 않아 회복의 지연을 가져온다(Vargas & Barres, 2007). 말초신경의 기계적 손상에 의해 슈반세포와 축삭의 연결이 소실되었을 때, 신경의 말단부(distal stump)에서 월리변성을 야기한다. 이는 혈류를 타고 단핵세포(mononuclear)가 손상된 부위로 들어가고, 슈반세포와 소아교세포의 수초가 분열을 일으키고 대식세포와 면역세포단백질(cytokine)들을 분비한다. 이는 월리변성이 일어나는 동안 수초와 버그너 밴드 형성을 위해 발견되는 분자가 감소되어 재생을 지연시키고 우선적으로 변성된 수초와 축삭 사멸이 일어난다(Huebner & Strittmatter, 2009). 변성된 잔해물들이 정리된 후, 손상 근위부에서 축삭이 자라기 시작하고(sprouting axon) 성장뿔의 존재가 감지되기 시작한다 <Figure 1>. 근위부 축삭은 정상세포만큼 재성장하고 신경내막의 슈반세포와 연결되게 된다. 손상 후 짧은 시간 안에 발생하는 월리변성은 수초와 축삭을 퇴행시키지만 신경내막(endoneurium)은 여전히 남아있게 된다. 재생의 후반기에는, 남아있는

신경내막이 표적기관을 향하여 축삭 성장을 지휘한다. 신경 회복을 위해서는 축삭은 성장의 기능을 갖추어야하고, 말단부 환경이 다시 성장하기 위한 공간이 확보되어야 하며 표적기관이 새로운 축삭을 받아들이는 데 문제가 없어야 한다. 이러한 환경이 구축되지 않아 축삭의 회복 시간을 지연시키게 되면, 신경의 종말부와 표적기관은 만성적으로 연결이 일어나지 않게 된다. 반면에 건강한 신경은 슈반세포가 신경내막을 따라 구획화된 구조를 따라 성장하게 되고, 신경내막을 보호하는 버그너 밴드를 만들어낸다. 또한 슈반세포는 재생장을 촉진, 강화시키는 신경영양인자(neurotrophic factor)를 방출한다(He & Jin, 2016; Heubner & Strittmatter, 2009; Svinnigsen & Dahlin, 2013). 이러한 일련의 과정을 통해서 신경손상으로 인해 야기된 표적조직과의 탈신경을 기능적이고 건강하게 재연접 할 수 있다.



<https://www.researchgate.net/figure/A-Schematic-representation-of-the-Wallerian-degeneration/>

Figure 1. Wallerian degeneration and regeneration process after peripheral nerve injury

2. 말초신경재생 관련 단백질 대사 경로

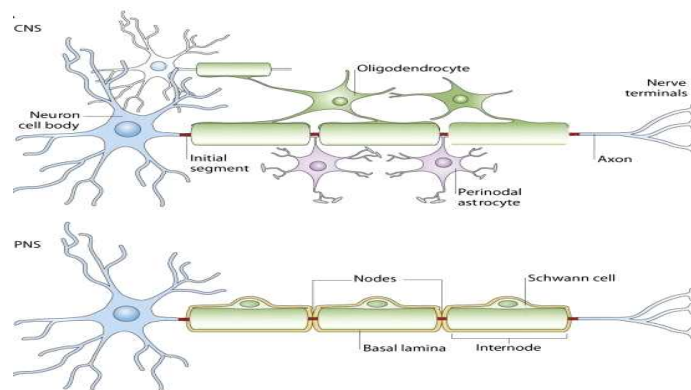
슈반세포는 수초화 세포와 탈수초화된 세포(리막세포)로 나뉜다. 탈수초화된 슈반세포는 전도 속도를 향상시키기 위한 수초가 감싸여져 있지 않지만 영양을 제공하고 완충작용을 통해 축삭을 보호한다. 수 겹의 수초로 감싸여진 슈반세포는 중추신경의 희소돌기세포와 다르게 기저막이 둘러싸고 있다. 슈반세포의 원형질막은 지방성분으로 이루어졌고 수초는 콜레스테롤로 형성되어 있어 절연체의 역할을 하며, 인접한 수초 사이는 랑비에르 결절이 약 $1\mu\text{m}$ 의 간격으로 있어 활동전위가 결절과 결절 사이를 뛰어넘는 도약전도를 가능하게 한다<Figure 2>. 축삭에서 neuregulin-type III 발현은 슈반세포 전구체의 성숙과 생존에 필요하고, 축삭 표면의 neuregulin 양은 수초화 정도(degree)를 결정하여 그 직경(diameter)을 좌우한다. 또한 슈반세포는 내막과 축삭표면에 존재하는 MCT(monocarboxylate transports)를 통해 에너지원 중 하나인 젖산(lactate)의 이동을 도와 축삭의 에너지 대사에 관여한다(Salzer, 2015).

신경손상이 발생하면, 대량의 활동전위가 손상부위에서 발생하고 축삭 이동의 제약을 가져와 손상 후 뉴런의 성장 능력을 촉발하는 중요한 요인이다. 손상부위에서 세포외에 있는 sodium과 calcium이 손상 부위 축삭 원형질(cytoplasm)로의 유입은 활동전위를 야기하고 이는 손상 받은 축삭의 세포체에 보내는 첫 번째 위험 신호이다. 세포체 염색질의 변화(chromatolytic changes in the cell body)는 세포내 칼슘과 cyclic adenosine monophosphate(cAMP)의 신속한 증가를 조정한다. 반면, 손상은 정상적으로 연결된 표적으로 이동하는 신호를 차단하고 세포체 단절을 알리는 부정적 신호(negative signal)를 보낸다. 그로 인해 적절한 연결 발달을 위한 회복을 기대할 수 있다. 예를 들어, 손상 부위에 내인성 신경성장인자(endogenous nerve growth factor; NGF)의 감소는 축삭이 표적기관과 연결이 끊어졌다는 정보를 뉴런에 알리는 중요한 부정적 신호이다. 이러한 이유로, 축삭손상을 입은 감각신경은 축삭 재생장을 지연시킨다(Knott et al., 2014). 마지막으로, 긍정적 신호가 역행 이동(retrograde transport)을 통해 세포체로 흐르고 몇몇 전사인자들이 축삭 손상을 식

별한다. 이 역행 이동은 importins과 vimentin을 포함한 단백질을 운반하여 합성을 유도하고, ATP를 분해하는 운동단백질 dynein과 상호작용한다. 그러므로 ciliary neurotrophic factor(CNTF), neurotrophin 3(NT3) 그리고 fibroblast growth factor(FGF)와 같은 손상된 환경으로 인해 발생한 이들 영양분자들이(trophic molecules) 뉴런에서 특이 반응을 일으킬 수 있다. 예를 들어, CNTF는 면역반응을 유도하는 전사인자인 signal transducer and activator of transcription3(STAT3) 인산화를 촉진한다(Lever et al., 2015).

축삭손상으로 인해 발생한 각기 다른 신호들은 신경에 변화를 이끌어낸다. 손상 후 cAMP 증가는 아무리 제한적인 환경일지라도 재생의 중요한 역할을 한다. 이는 cAMP의 감소가 NGF와 brain derived neurotrophic factor(BDNF)의 발현 억제를 초래하는 현상으로써 확인할 수 있다. 또한 성숙한 신경에서 cAMP의 감소는 재생에 대한 저하를 보였다(Knott et al., 2014).

신경손상 후 주목할 만한 변화는 MAPK 신호체계의 활성화와 동시에 c-Jun, activating transcription factor 3(ATF3), SRY-box containing gene 11(SOX11) 그리고 STAT3와 같은 전사인자들이 핵에서 발현되거나 인산화 된다. 이들 전사인자들의 활성화는 GAP-43의 증가와 같이 손상 받은 뉴런의 유전자 발현에 변화를 가져온다. 그 결과, 신경 손상 회복과 재생에 관여하는 단백질의 발현을 증가시켜 손상된 신경의 회복과 성숙된 신경으로의 재생을 촉진한다(Patodia & Raivich, 2012).



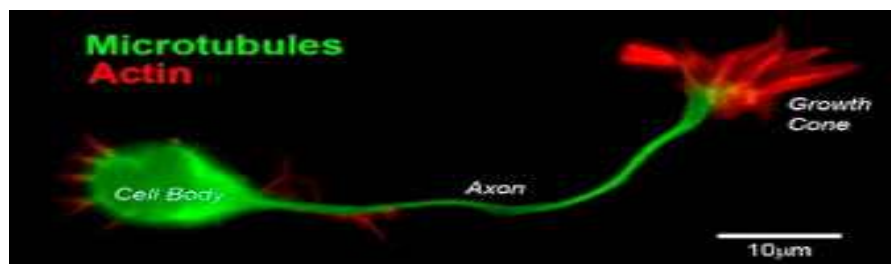
<https://www.nature.com/articles/nrn1253>

Figure 2. Oligodendrocyte and astrocyte in CNS and Schwann cell in PNS

3. 말초신경 재생 시 성장뿔(growth cone)의 역할

뉴런은 축삭돌기를 비교적 먼 거리까지 뻗어 도달하고자 하는 목표지점까지 다다라 연결한다. 이때 축삭의 끝부분은 매우 활동적이며(motile tip), 감각신경의 성장뿔(growth cone)을 형성하여 뻗어나가게 된다. <Figure 3>과 같이 성장뿔은 말초신경의 신경내막 관(endoneurial tube)을 따라 연장되며, 끊임없이 외부환경을 탐색하여 많은 세포들 사이의 신경분포를 형성하기도 하고 세포와 세포 사이에 가지를 쳐서 서로 연결될 수 있게 한다. 그들이 말단부까지 뻗어나가지 못하면, 신경중의 형태로 근위부에서 신경가지를 치기도 한다. 하지만 근위부의 신경가지가 수십 개씩 뻗어나간다 하여도 신경가지들이 말초 연결을 이루지 못하면, 조직의 위축이 일어나고 반면에, 표적기관에 연결이 적절히 이루어지면 기관의 크기는 비대해지고 성숙된다. 이는 근위부 신경가지들의 수와 비교해서 말단부 신경섬유 수의 밀도가 재생에 직접적인 영향을 미친다는 것을 알 수 있다(Hur et al., 2012).

성장뿔의 활동성과 연장(elongation)은 신경영양인자의 증감율에 좌우되는 주화성(chemotaxis)의 특징을 보인다. 즉, 분자변화의 신호가 성장뿔의 활동성을 인지할 수 있고 손상부위의 축삭재생을 예견할 수 있는 것이다. 다시 말해서, 다양한 분자 신호가 축삭성장에 적합한 환경을 제공할 수도, 축삭 연장을 방해할 수도 있다(Polleux & Snider, 2010).



<https://www.mechanobio.info/cytoskeleton-dynamics/what-is-axon-guidance-and-the-growth-cone/>

Figure 3. The growth cone: axonal elongation

말단 연접에 중요한 요인 중의 하나인 성장뿔의 안정성(stabilization)을 결정하는 인자들은 칼슘, cyclic nucleotide 그리고 세포내 미세관(microtubule)의 구성 단백질(tubulin)들로 세포돌기의 세포골격(cytoskeleton)과 상호작용을 한다. GAP-43가 성장뿔의 기능 활성화와 증가를 표식하는 대표적인 단백질이다. 또한 Rho family의 작은 GTPase는 성장뿔의 성장을 유도하는 신호를 통합하며 세포골격을 재배열하고 세포외 환경을 변화시킨다(Hur et al., 2012).

따라서 성숙된 성장뿔에 의한 신경 말단부와 표적 기관의 적절한 연접은 축삭재생에 중요한 역할을 한다.

4. 말초신경 재생 유도를 위한 신경영양인자(neurotrophic factors)

정상 뉴런은 신경영양인자의 항상성을 유지하는 것이 필요하다. 이는 감각, 운동 그리고 자율신경계의 유지 및 생존을 촉진한다. 신경손상 후, 신경영양인자들의 발현이 증가하여 탈신경된 표적기관의 재연접과 축삭 재성장을 지지한다. 다른 유형의 종말 신경의 변화는 다음과 같이 다른 신경영양인자들을 발현 한다: 초기 상향발현(upregulation) 인자는 BDNF와 glial cell-derived neurotrophic factor(GDNF)이고 반면에, NT-3와 CNTF는 하향발현(downregulation) 된다. 그들은 재생이 되면 다시 정상 발현으로 되돌아가고 탈신경이 만성일 경우, 계속적으로 발현을 유지한다(Gordon, 2009).

1) Neurotrophins

Neurotrophin family는 NGF, BDNF, NT-3 그리고 NT-4/5가 있다. NGF는 감각과 교감신경에서 활동하는 것으로 알려졌다. 신경 손상 후, NGF는 운동 배쪽 신경(motor ventral roots)보다 감각 등쪽 신경(dorsal root)에서 발현량이 높았다. 반면에 신경 손상 후, NGF 적용은 신경 반응의 감소로 재생 진행을 지연시킨다.

BDNF는 운동과 감각 신경에 다르게 발현되고 손상 후, 운동 배쪽 신경에서 보다 피부신경에 높은 발현량을 보인다. 내인성 BDNF의 부족은 축삭 성장과 수초화에 손상을 입힌다. 반면 BDNF 국소 투여는 신경 재생을 향상시킨다. NT-3은 운동신경보다 감각신경에서 높은 발현량을 보인다. NT-3은 골격근에 존재하고 근육과 연결하고 있는 운동신경과 감각신경에서 그 역할을 한다. Neurotrophins의 수용체는 Trks family이다. NGF의 친연적 수용체는 TrkA이고 BDNF와 NT-4/5 수용체는 TrkB 그리고 TrkC는 NT-3의 수용체이다(Huang & Reichardt, 2001).

2) GDNF

GDNF는 transforming growth factor alpha-1(TGF α -1) family이고 감각, 운동 그리고 자율신경의 영양공급을 한다. GDNF의 발현은 축삭 손상 후 신경재생에 긍정적인 영향을 미친다. GDNF는 손상받은 두 감각 등쪽 신경과 운동 배쪽 신경에 상향 발현되었고 이는 수용체 GDNF family receptor alpha-1(GFR α -1)의 발현을 촉진시켰다. GDNF는 슈반세포에 긍정적인 영향을 미치며 슈반세포의 증식과 축삭의 수초화를 촉진한다(Walker & Xu, 2018).

3) Fibroblast growth factor(FGF)

FGF-2는 신경재생을 위한 가장 중요한 기여자로서 중추신경과 말초신경에서 신경전도 역할을 한다. 신경 손상 후, FGF-2는 손상부위와 신경세포체에서 상향 발현되었고 이는 슈반세포 증식과 축삭 재생을 야기했다. FGF 수용체인 FGFR-1은 ERK와 Akt pathway에 의해 과 발현되고 신경돌기 성장을 강화한다(Santos et al, 2016).

4) Insulin-like growth factors

IGF-1과 IGF-2은 재생과 회복과 관련이 있다. 그들은 운동신경 발달뿐만 아니라 축삭손상 후 재생에도 관여한다. IGF의 외인성 적용은 축삭 재생의 속도를 높이고

기능적 회복을 향상시킨다. 또한 운동신경 발아(sprouting)를 강화한다. 손상된 신경은 IGF-1, IGF-2 그리고 IGF binding protein(IGFBP) 발현을 증가시켜 축삭재성장과 신경재생을 향상시킨다(Lewitt & Boyd, 2019).

5) Neuregulins

Neuregulin 유전자는 신경분화인자(neuronal differentiation factor; NDF), 헤레굴린(heregulin), acetylcholin receptor inducing activity(ARIA), 아교세포 성장인자(glial growth factor; GGF)를 활성화시킨다. NDF와 heregulin은 분화활동과 성장에 중요한 역할을 하며, ARIA와 GGF는 슈반세포의 발달이 이루어지는 신경근 연결부에서 감지되었다. GGF는 축삭재생에 의해 표적기관으로 재연접이 일어날 때, 슈반세포 증식과 성숙을 촉진한다(Meyer et al., 1997; Syed & Kim, 2010).

6) Pleiotrophin(PTN)

Heparin binding 신경영양인자로도 알려진 PTN은 운동 배쪽 신경에서 발현되고 신경손상 후 발현량이 증가한다. 척수에서 PTN의 적용은 운동신경돌기의 연장을 이끌어낸다. 또한 축삭 재생을 향상시킨다(Mi & Hoke, 2007).

7) Neuroactive cytokines

CNTF는 신경손상 후 아교세포에 의해 방출되며 말초신경에서 탐지되는 손상 인자(injury factor)이다. 슈반세포에서 CNTF의 과발현은 분화를 촉진하고 수초단백질 발현을 증가시킨다. 또한 CNTF는 운동신경의 생존을 강화한다. Neuroactive cytokine은 운동신경의 재연접과 축삭 발아에 중요한 역할을 담당한다. Leukemia inhibitory factor(LIF)는 CNTF와 비슷한 활동을 하며 CNTF와 같이 면역 단백질로써 활동한다. 신경 손상 후, 손상 부위에 LIF가 상향 발현된다.

Interleukin-6(IL-6)와 그 수용체는 신경세포에 상향 발현되고 신경재생을 강화한다(Magno et al., 2019).

5. 축삭재생에 관여하는 전사인자(transcription factors)

1) p53

p53은 종양억제인자 중 하나로 세포자멸(apoptosis), 세포주기과정 억제, DNA 재건 그리고 50% 이상의 종양 돌연변이를 일으키는 데 관여한다. 신경계에서는, 손상 후 세포 사멸의 기능을 한다(Boyd & Vlatkovic, 2016).

2) c-Jun

c-Jun은 신경 손상 후 발현되는 전사인자로 축삭 재생을 위해 상향 발현된다. 일부 중추신경에서는 c-Jun이 세포자멸에 관여하지만 말초신경에서는 축삭의 발아와 재생을 위해 발현을 증가시킨다.

3) ATF3

ATF3는 bZIP 전사인자 계열 중 하나인 cAMP-responsive element binding protein(CREB)의 일원이다. ATF3는 뇌손상, 말초신경손상, 시신경 손상 그리고 NGF의 고갈 현상이 발생하였을 때 발현된다. ATF3는 c-Jun과 비슷하게 축삭의 발아 및 성장과 깊은 관계가 있다. 또한 이 둘은 이질이량체(heterodimer)로써 신경 손상 후, 동시 발현되어 축삭성장에 동반 상승효과를 가져온다.

4) CREB

CREB은 DNA의 CRE에 결합되어 신체활동을 통한 학습과 기억에 관여하고 생리 기능주기와 신경보호기능에도 중요한 역할을 한다. CREB은 arginase I(Arg I) 효소 발현을 촉진시켜 축삭재생에 관여한다. 또한 하위분자인 BDNF 발현을 조절하는 역할을 한다. 이처럼 신경돌기 성장(neurite outgrowth)을 위해 CREB 본연의 주도적

역할보다 세포내 환경을 만드는 역할을 한다(Moore & Goldberg, 2011)

5) STAT3

STAT3는 세포성장 혹은 cytokine과 같은 세포의 신호가 전달이 될 때까지 원형질에서 대기하고 있다. 신호가 세포막에서 수용기에 결속되고 tyrosine kinase janus kinase(JAK)가 수용기에서 활성화되면 STAT3는 인산화되어 핵(nucleus)으로 이동한다(translocation). 이 전사인자는 바이러스 감염 억제 물질(interferon)을 발현하는데 그 역할을 한다. IL-6와 LIF는 STAT3의 상위분자로써 STAT3를 발현하여 면역반응에 관여하여 신경 손상 후 재생에 적절한 환경을 만든다(McLean et al., 2019).

6) nuclear factor of activated T cells(NFATc)

NFAT 전사인자는 NFATc1-4을 포함하여 총 5 종류로 이루어졌으며, 세포내 칼슘농도 증가에 의해 반응한다. 신경에서 NFAT는 시냅스 반응과 탈분극(depolarization)에 의해 활성화되어 DNA에 결속되는데 결속력이 약하여 STAT3, c-Jun, CREB 그리고 ATF3와 같은 전사인자와 동시 결속한다. NFATc2, c3 그리고 c4는 신경돌기 성장에 긍정적인 영향을 미친다.

7) nuclear factor kappa-light chain enhancer of activated B cells(NFkB)

NFkB는 다음 RelA/p65, c-Rel, RelB, p50 그리고 p52의 5가지 subunits과 동종 혹은 이종이량체(homo or heterodimers)의 형태를 취한다. p65, c-Rel 그리고 RelB는 전사역할을 하고 p50과 p52는 이합체(dimerzation)에 따라 전사를 조절한다. NFkB는 이량체의 형태로 원형질에 존재하는데 IKK 효소에 의해 NFkB의 이량체 형태가 분열되어 핵으로 이동하고 kB 서열(sequences)에 결속됨으로써 전사 유전자에 영향을 미친다. NFkB는 말초신경 손상 후, 감각신경절(dorsal root ganglion)과 척수(spinal cord)에 동시에 상향 발현되어 면역반응의 역할을 한다(Agbas & Moskovitz, 2009)

8) SOX11

Sox 6개의 염기서열에 결속한다. Sox 전사인자는 high mobility group(HMG)과 동종으로써 유전자 발현에 관여한다. 이는 DNA 결속뿐 아니라 다른 전사인자들과 상호작용을 한다. 신경에서, Sox11과 대표적으로 상호작용하는 전사인자는 ATF3이다.

Sox11 발현농도는 신경돌기의 성장과 비례하며 DRG 손상 후에는, 재생 초기에 높게 발현되는 반면 이는 말초신경에 한해서 발생한다(Patodia & Raivich, 2012).

9) sloan-kettering innstitute novel(SnoN) and E47

SnoN은 대부분 ski/sno/dac 영역을 가지고 있다. SnoN은 Smad-transforming growth factor beta(TGF β) 신호전달체계를 억제하는 기능을 한다. 신경에서의 SnoN 발현은 축삭 재생을 주도한다(Moore & Goldberg, 2011).

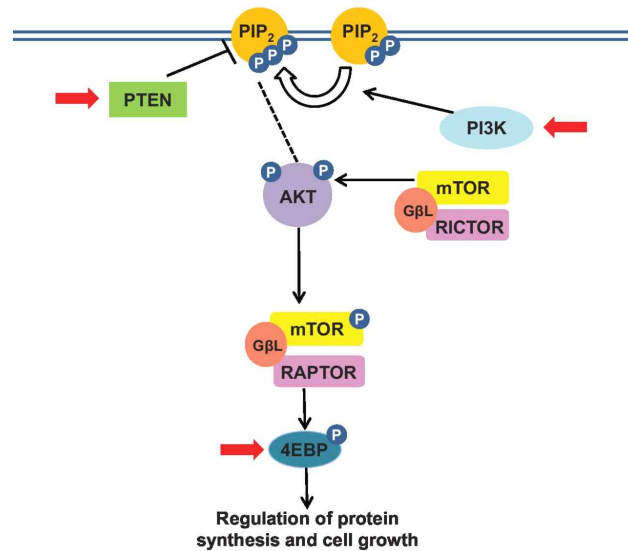
6. 근비대 및 근위축 유도 단백질 기전

1) 단백질 합성 경로: IGF-1 하위경로

골격근의 근비대를 일으키는 중재자인 IGF-1은 phosphatidylinositol-3 kinase(PI3K)/Akt/mTOR pathway를 활성화시킨다. 다시 말해 운동을 통한 근비대는 근육의 IGF-1 발현을 증진시켜 PI3K/Akt pathway 활성화를 이끌어낸다. 이는 IGF-1 과발현을 유도한 이식 쥐들(transgenic mice)에게서 Akt/mTOR 발현을 증가시키고 결과적으로 근 비대를 보였으며, 반면에 단백질 합성의 감소로 근 위축을 보인 대상에게선 Akt/mTOR pathway 활성화가 2배 정도 감소된 것을 확인할 수 있었다. 따라서 IGF-1은 PI3K/Akt/mTOR pathway의 활성화를 도와 근 비대를 촉진시키는 중요한 중재자이다(Barclay et al., 2019).

2) 근 비대를 조정하는 신경전달경로: PI3K/Akt./mTOR pathway<Figure 4>

IRS-1은, PI3K 물론 mTOR의 긍정적인 변화는 mTOR의 하위분자인 4E-BP1을 인산화 시켜 단백질 합성을 촉진시키고 세포의 크기를 증진시킨다. IGF-1이 mTOR를 활성화시킬 수 있다하여도 아미노산은 단독으로 mTOR를 활성화시켜 하위분자의 인산화에 기여하고 단백질을 합성한다. 그러므로 mTOR는 다양한 성장 시그널을 통합하고 조정하는 중요한 중간 매개분자이다(Saxton & Sabatini, 2017).



<https://clincancerres.aacrjournals.org/content/22/11/2675>

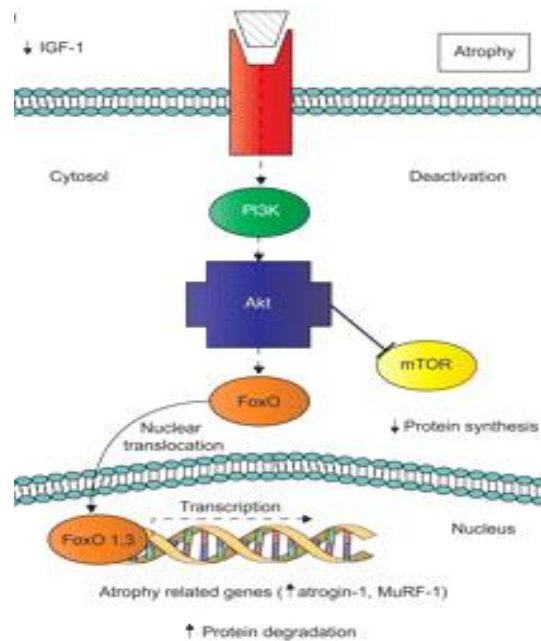
Figure 4. PI3K/Akt./mTOR pathway: cell growth

3) 다른 근 비대 조정 분자: GSK3β

GSK3β는 Akt의 하위 분자로 근 비대를 조절한다. 본래 GSK3β는 근골격세포의 근 비대를 억제하는 활성효소이다. 하지만 Akt의 활성화에 의해 GSK3β는 인산화되고, 이는 GSK3β에 의해 글리코겐 합성(glycogen synthase)을 비활성화 시켜 에너지 대사를 방해하는 것을 억제한다. 또한 GSK3β의 발현 억제는 근비대의 결과를 가져왔다. 따라서 인산화된 GSK3β 발현의 증가 혹은 GSK3β의 억제는 근 비대를 조정하는 또 다른 분자이다(Glass, 2003).

4) 근 위축을 유도하는 근 비대 관련 분자 억제 기능<Figure 5>

전사인자 중 하나인 Foxo(forkhead box O)의 발현은 IGF-1/PI3K/Akt pathway 활성화를 감소시키고 atrogen-1, MAFbx, muscle atrophy F-box(MAFbx), muscle RING finger 1(MuRF-1) 등의 단백질 분해효소가 이화작용을 증가시켜 근 위축을 초래한다. Akt 인산화는 Foxo의 활성화를 억제하지만 PI3K/Akt pathway 활동이 감소하게 되면, 세포질의 Foxo 인산화를 억제하고 Foxo 핵 단백질이 증가한다. 이는 atrogen-1/MAFbx 유전자를 발현시켜 근 위축을 촉진한다(Mckinnell & Rudnicki, 2004).



<https://erj.ersjournals.com/content/34/4/975.figures-only>

Figure 5. Foxo/atrogen-1, MuRF-1 pathway

III. 연구 I : 좌골신경 손상 후 트레드밀 운동이 Akt/mTOR 신호전달체계 활성화를 유도하여 축삭재생과 근 위축억제에 미치는 영향

1. 연구의 필요성

말초신경은 중추신경과 다르게 손상 후 축삭 재생과 표적기관과의 재연접(reinnervation) 기능을 갖추고 있다. 하지만 말초신경의 외상적 손상 후 감각과 운동 신경의 손상 회복률이 여전히 10% 미만이며, 이로 인한 신경학적, 조직학적 변화로 삶의 질에 영향을 미친다. 몇몇 선행연구에서도 좌골신경손상(sciatic nerve injury) 후 기능적으로 만족할 만한 회복에 도달하는데 시간이 많이 요구된다고 제안하였다(Park & Hoke, 2014). 따라서 손상 신경의 완전 회복은 중요한 공중 보건 과제이다(English et al., 2014).

좌골신경 손상 후, 손상 부위의 근위부에서 축삭이 재생, 말초부로 연장되어 표적 기관에 도달해야 하지만 이 과정이 지연된다면 감각과 운동 장애를 초래할 뿐만 아니라 표적기관의 위축이 발생한다. 그러므로 축삭재생의 촉진과 강화가 말초신경 손상 후 기능적 회복을 기대할 수 있는 치료적 목표이다(Han et al., 2019).

좌골신경 손상은 자가 회복기능 및 내인성 성장능력이 내재되어 있어 손상 후 NGF, BDNF, LIF, TGF β 등 성장 인자들의 분비 촉진으로 슈반세포의 재수초화와 혈액공급을 이끌어낸다. 동시에 대식세포의 침습으로 변성된 축삭과 수초가 제거된다. 즉, 성장인자의 분비로 인한 염증반응, 세포사멸 그리고 재생기능은 신경 손상 후 축삭 재수초화에 중요한 요인이다(Shiying et al., 2017). 이들 성장인자의 분비는 축삭 재생과 신경돌기 성장 관련 신호전달체계를 조절한다. 각각의 신호전달체계는 역방향 이동을 통해 신경 재생 단계에 따라 시기적으로 차이를 두어 활성화된다(Li et al., 2020).

우선적으로, MAPK 분자는 ERK의 threonine 202와 tyrosine 204에 결속하여 인산

화를 촉진한다. 인산화된 ERK1/2는 역방향인 핵으로 이동, 슈반세포의 증식을 유도한다(Hausott & Kimaschewski, 2019). 게다가, 손상된 신경의 세포체에서 발현되는 대표적인 전사인자 중 ATF3, c-Jun 혹은 CREB 등을 활성화하여 재생관련 유전자(regeneration associated genes)들을 상향 발현시킨다(Ma & Willis, 2015; Thong et al., 2014). 대표적인 재생관련 유전자 GAP-43는 ATF3에 의해 활성화되고 이는 축삭 재생을 촉진하여 손상 부위 말단부로의 증식세포 이동을 촉진하고 표적근육과의 재연접을 이끌어낸다(Gey et al., 2016; Fagoie et al., 2015; Ma et al., 2014). 관련 선행연구에 따르면 좌골신경손상 후, 신체활동이 축삭 재생을 강화하고 표적근육과의 재연접을 촉진한다고 하였다(Udina et al., 2011).

또한, 말초신경에 손상이 발생하면 운동과 감각 신경의 장애로 정보에 오류가 발생하여 골격근 대사 작용에 문제가 발생하고 단백질 퇴행이 일어나게 된다. 이는 골격근 크기의 감소와 근력의 감소를 초래하는 분자생물학적 변화가 발생한다(Menorca et al., 2015). 탈신경으로 인해 골격근에서는 근 위축을 촉진시키는 전사인자인 atrogen-1(MAFbx) 혹은 MuRF1 발현이 증가하고 근 재생에 관여하는 MyoD를 퇴행시키고 단백질 합성을 촉진하는 eIF3f 발현을 억제시킨다(Bodine & Baehr, 2014; Bonaldo & Sandri, 2013). 그 결과, 근감소증을 야기하여 일상생활 뿐 아니라 독립적인 생활에도 문제가 발생할 수 있다(Weng, et al., 2018). 이에 많은 선행 연구에서 신경 손상 후 근 위축을 최소화하기 위한 다양한 운동 방법들이 제시되어 왔다. 근 수축을 유도하는 신체활동은 손상된 신경에 우선적으로 신경영양인자를 방출하고 이는 재생을 좌우하는 슈반세포 증식과 분화에 중요한 MAPKs를 촉진시켜 전사인자 활성화에 기여하여 재생관련 단백질 발현을 유도한다. 결과적으로 증식된 세포는 말단부 쪽으로 이동하여 재수초화, 축삭 재성장이 이루어지고 이는 표적 근육에 재연접을 가능하게 하여 근 위축을 방지하게 된다(Kim et al., 2020; Seo et al., 2009).

Akt/mTOR는 근 단백질 합성을 좌우하는 대표적인 신호전달체계로써 임상에서는 Akt/mTOR 발현을 활성화시켜 4E-BP1을 인산화하여 근 단백질 합성에 관여하는 단백질 발현을 촉발, 근골격의 크기를 유지한다(Bodine et al., 2001; Fanxing et al., 2017; Zhang et al., 2016). Kim & Lee(2017)에 따르면, 저강도의 유산소성 운동이 mTOR를 상향 발현시켜 근골격 크기를 유지한다고 보고하였다.

앞서 언급한 좌골신경손상으로 인한 문제들을 예방하기 위한 세포 이식, 수술, 약물치료 그리고 신체활동과 같은 다양한 치료적 접근이 시도되었다(Modrak et al., 2020). 이 중 신체활동은 조직학적 변화와 기능적 회복을 강화시킬 수 있는 접근성이 용이한 치료적 처치로써 추천되어 왔다(Armada-da-Silva et al., 2013; Sabatier et al., 2008). 하지만, 트레드밀과 같은 대표적인 유산소성 운동을 통해 좌골신경 손상 초기에 ERK1/2 신호전달체계가 활성화되어 전사인자 ATF3 혹은 c-Jun 발현 농도를 증가시켜 축삭 재생장을 유도하는지, 또한 근육에서 근 골격 크기 유지를 위한 Akt/mTOR 신호전달체계에 영향을 미치는지에 대한 구체적인 연구가 미흡한 실정이다. 그러므로 본 연구 I에서는 좌골신경 후 7일과 14일간의 트레드밀 운동이 ATF3와 ERK1/2 하위분자의 활성화를 통한 축삭재생장을 살펴보고, 좌골신경 손상 후 근육에서 7일과 14일간의 트레드밀 운동을 통한 근비대 관련 Akt/mTOR 신호전달체계의 변화를 비교 분석하였다.

2. 연구 방법

1) 실험 동물

본 연구를 위해 <Figure 6>에서 제시하듯 Sprague-Dawley 계열 쥐(6 weeks old, male, 190~200g; N=50)를 사용하였다. 온도 22°C, 습도 60% 그리고 12시간 간격의 낮과 밤이 통제되는 동일한 환경에서 관리 되었다. 음수와 쥐 사료(commercial rat chow; Samyang Co., Korea)는 충분히 공급되었다. 실험에 앞서 쥐 관리와 모든 실험 과정은 동물실험을 위한 동물 사용 지침서를 따랐으며 제주대학교 동물 윤리 위원회의 승인(2020-0010)을 받았다. <Table 1>에서 제시하듯 본 실험을 위해 SD계열 쥐 총 50마리를 무작위로 control 그룹(n=10), 운동군 7일차(n=10)/14일차(n=10), 그리고 비운동군 7일차(n=10)/14일차(n=10) 각 세 집단으로 나누었다.



<https://www.taconic.com/rat-model/sprague-dawley>

Figure 6. The experimental animals in controlled environment

Table 1. Grouping of the experimental animals in Study I

Normal	7days		14days	
control	exercise	sedentary	exercise	sedentary
n=10	n=10	n=10	n=10	n=10

2) 실험 설계

본 연구의 실험 설계는 다음 <Figure 7>과 같다.

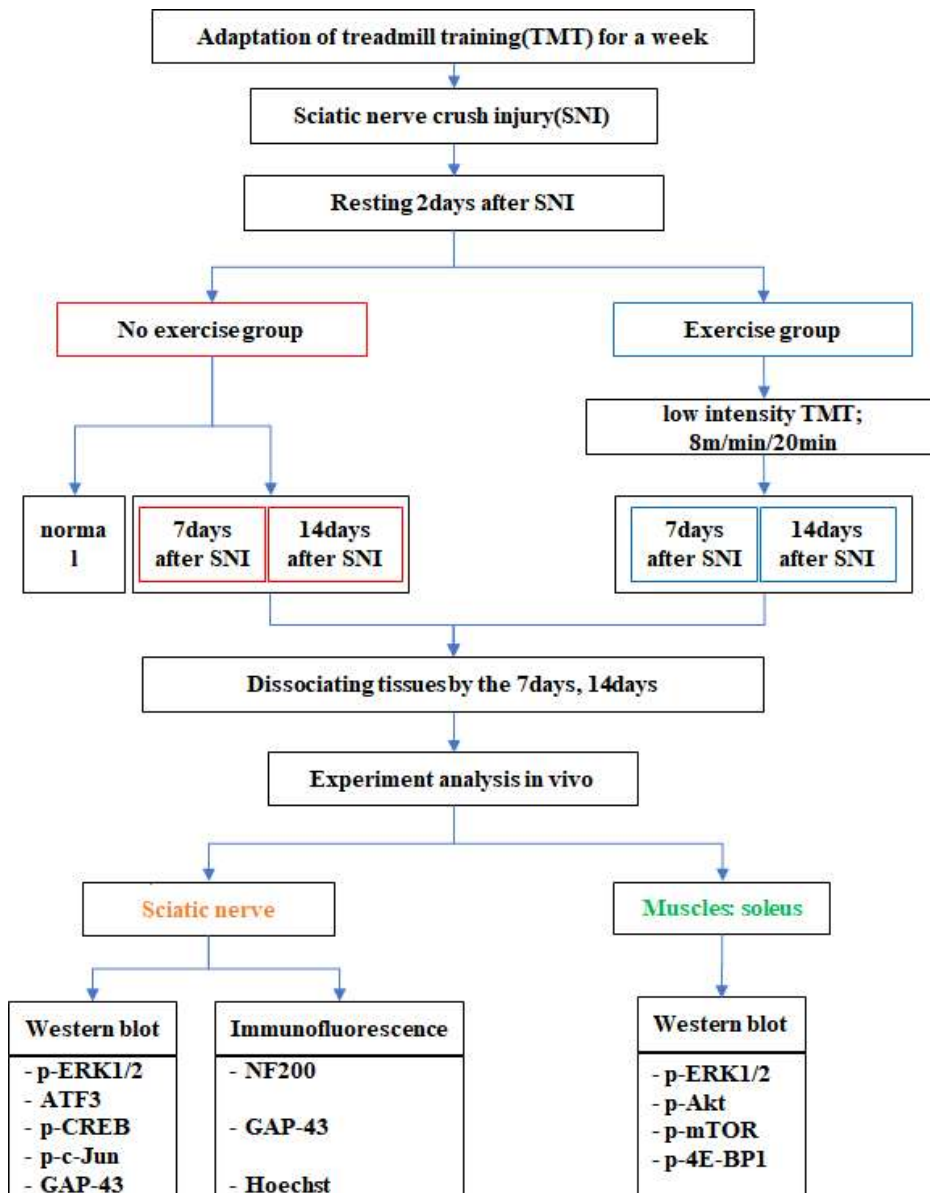


Figure 7. The experimental design for Study I

실험쥐들은 운동 적응을 위해 본 실험 돌입 전 일주일간의 운동적응기간을 가진 후, 마취상태에서 고통을 최소화하여 좌골신경 손상 수술을 받았다. 손상 후 이틀간의 휴식기를 갖고 운동군 쥐들은 운동 7일차, 운동 14일차 기간에 맞게 본 운동을 적용 하였다. 그 동안에 비운동군은 운동이 이루어지지 않았고 통제된 환경에서 지냈다. 운동기간에 맞게 끝낸 운동군과, 비운동군 쥐들 그리고 운동 및 신경압박수술을 행하지 않은 control 쥐들의 조직 분리 수술이 진행되었다. 적출한 조직들을 조직학적, 생화학적 실험 분석을 하여 트레드밀 운동이 손상 받은 좌골신경의 축삭재생과 가자미근 위축 억제 기전을 관찰하고 그 영향을 규명하였다.

3) 트레드밀 트레이닝(TMT) protocol

본 실험에 들어가기 전에 실험동물들은 일주일간의 운동적응 시간을 가졌다. <Figure 8>에서 제시하듯 트레드밀 기구는 쥐들이 자발적으로 뛸 수 있게 설계되었고, 트레드밀 운동은 하루 20분간 8meters/min, 저강도(low intensity)로 적용되었다.



Figure 8.. Treadmill apparatus for small animals

4) 좌골신경수술(sciatic nerve surgery)

실험동물들은 수술이 진행되는 동안 <Figure 9>에서 제시한 흡입마취장비 (Harvard Apparatus, USA) 내에 장착된 흡입마취제 이소플로렌(isoflurane)을 산소 내 흡입농도 2-2.5%로 적용하여 chamber안 실험동물의 마취를 유도하고 흡입농도 1.5-1.8% 사용하여 수술동안에 마취를 유지하였다. <Figure 10>에서는 좌골신경 수술 과정을 제시하였다. 우선 실험동물 대퇴의 대전자(greater trochanter) 축진 위치에서 절개를 최소화하여 근막을 자르고, 대둔근(gluteus maximus)을 들어 올려 신경을 노출시킨 후 포셉(a pair of forcep)으로 1분/30분간 interval로 압박하였다. 신경 압박 여부를 확인하고 절개 부위를 봉합하였다. 마지막으로 절개부위 감염이나 염증을 방지하기 위해 포비돈 요오드를 도포하여 소독하였다. 신경 압박 손상 후, 이틀간의 휴식을 취하고 운동군은 7일차/14일차 운동을 적용시키고 운동군과 비운동군, 정상군 쥐들을 7일과 14일 후에 희생시켰다. 분리 적출한 조직들의 변성을 방지하기 위해 즉시 -70°C 에서 동결시켰다.

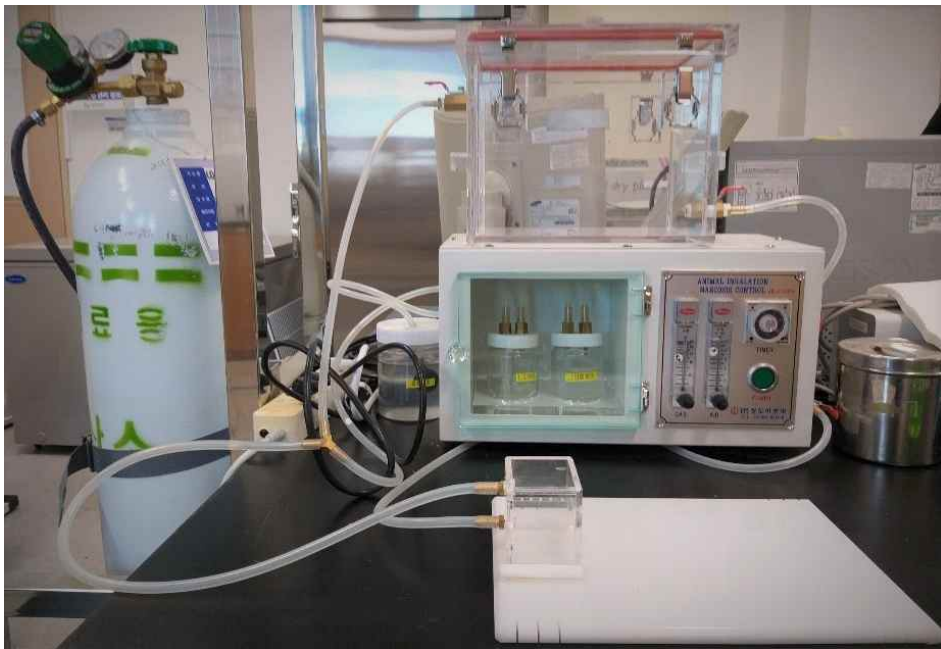


Figure 9. Animal inhalation narcosis control

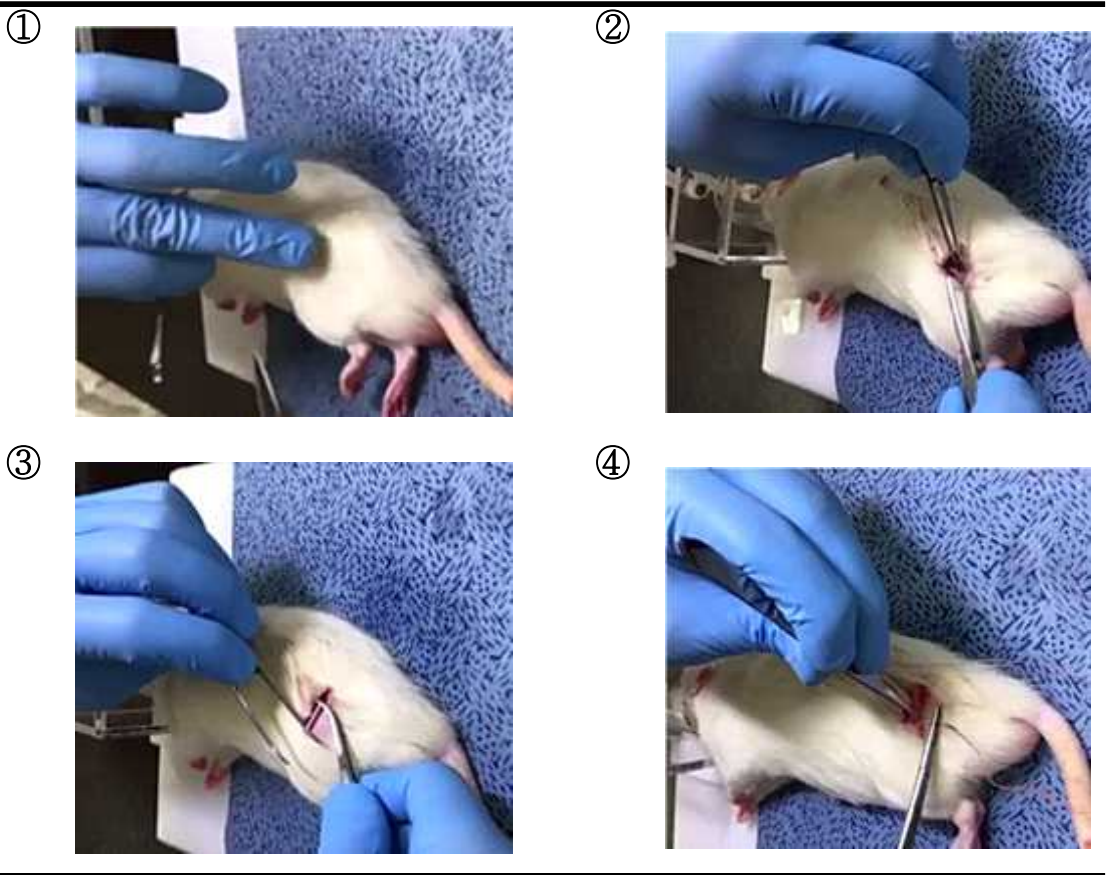


Figure 10. Sciatic nerve injury procedure

3. 측정항목 및 방법

1) 조직적출

통제군, 운동군과 비운동군의 7일차, 14일차에 맞추어 <Figure 11>과 같이 좌 골신경(SN), 감각신경절(DRG) 그리고 가자미근을 적출하였다. 적출한 조직들은 단백질 변성을 막기 위해 -70°C 에 냉동 보관하였다.

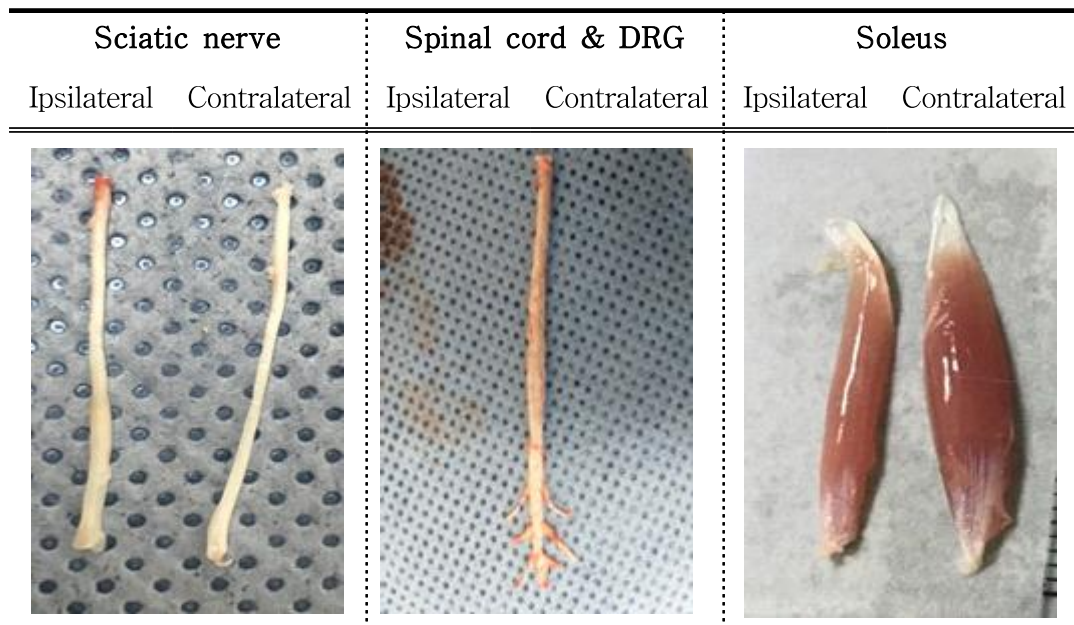


Figure 11. Dissected tissues

2) Western blot analysis

(1) Sample 준비

적출한 조직은 단백질 변성을 막는 proteasome inhibitor cocktail 1:100 수준으로 p300 lysis buffer에 혼합해 담가 초음파를 이용하여 분해하였다. 실험을 위해

단백질 20ug이 사용되었다. Western blot 실험을 실시하기 위해 각 sample들은 bradford assay를 이용해 단백질을 정량하였다.

Western blot 실험을 위한 장비 준비는 <Figure 12>와 같다.

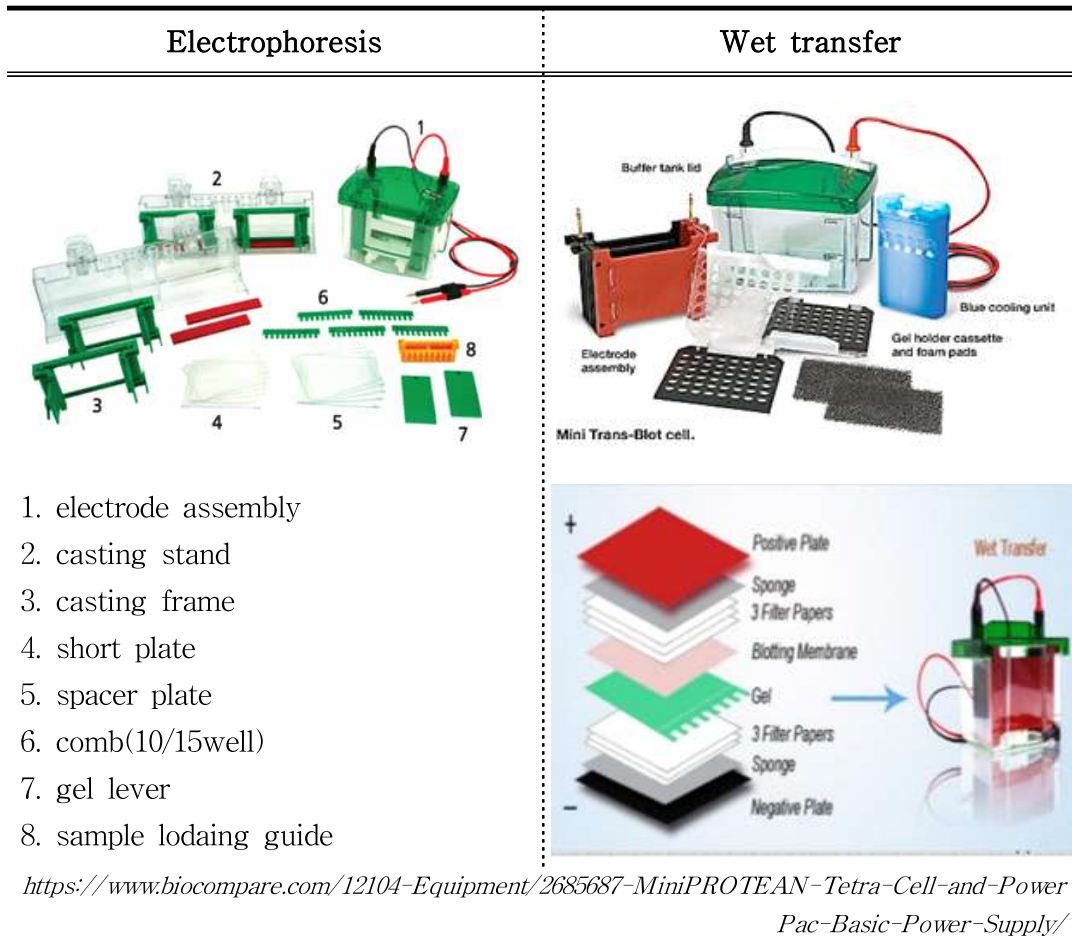


Figure 12. Apparatus for Western blot analysis

(2) sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) 만들기

Short plate와 spacer plate를 겹친 뒤 casting stand에 고정시켜 casting frame에 세워놓았다<Figure 13>. separating gel(running gel)과 stacking gel을 조성 비율에 따라 만들어 SDS-polyacrylamide gel을 완성하였다.

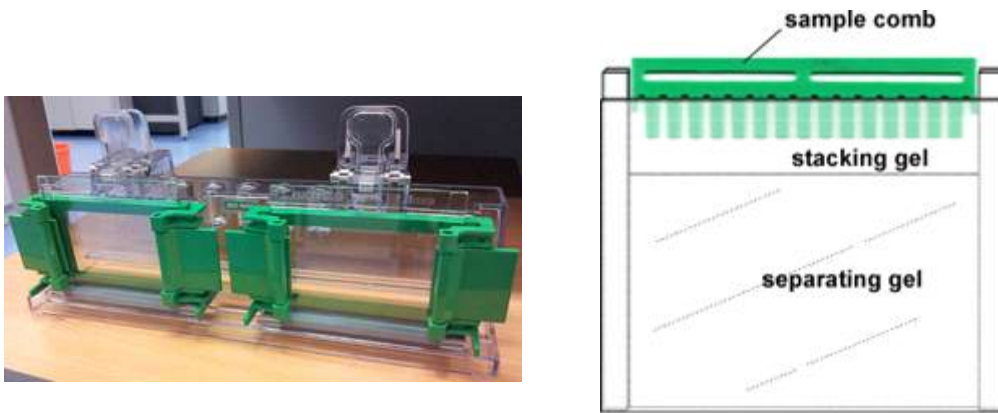
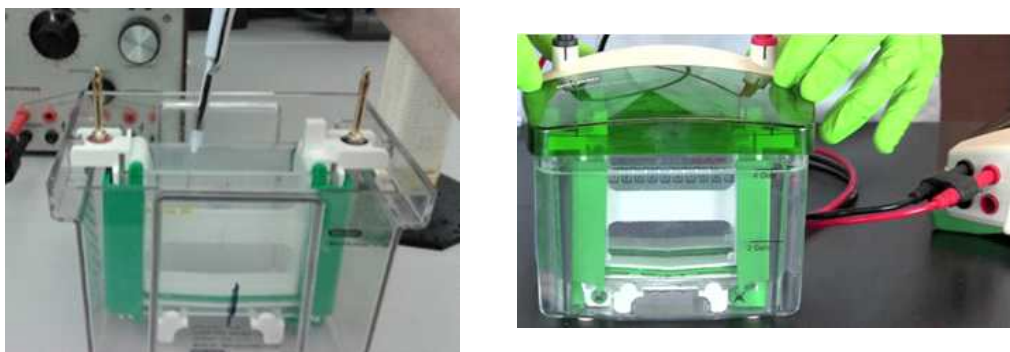


Figure 13. Apparatus used for SDS-PAGE

(3) 전기영동(electrophoresis)

<Figure 14>처럼 만들어진 gel을 electrode assembly에 넣고 running buffer(Tris 3g, glycine 14.4g, SDS 1g in DW 1L)를 채운 후 gel에 형성된 well에 단백질 marker와 정량한 시료를 pipette을 이용하여 loading양만큼 넣었다. 시료는 (-)전하에서 (+)전하로 이동하며 단백질이 통과하는 겔은 다공성이므로 일종의 체로써 작용하여 분자량이 작은 단백질부터 끌려 내려가게 된다. 따라서 적당한 시간동안 전류를 흘려보내면 분자량의 크기에 따라 분리된다.



http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_1658100.pdf

Figure 14. Electrophoresis

(4) Wet transfer

cassette에 앞서 제시한 검은 스폰지, 하얀천, filter paper, PVDF membrane(Pall Corporation, USA)의 순서로 놓고 영동한 gel을 안착시켰다. electrode assembly에 고정시킨 후 transfer buffer(Tris 6g, glycine 28.8g, MeOH 400ml in 1L)를 붓고 전기이동 시켰다. wet transfer 순서는 <Figure 15>와 같다.



https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4614-8794-4_14

Figure 15. Wet transfer

항체와의 비특이적 반응을 방지하기 위해 blocking buffer(1×TBS buffer, 3% BSA, 0.1% Tween 20)에 30분간 반응시키고 나서 1차 항체를 정해진 비율에 맞게 넣고 4°C에서 overnight동안 incubating 시켰다. 반응을 끝낸 membrane을 확인한 후 씻어내고, 관련 2차 항체를 1:2000의 비율로 희석하여 상온에서 40분 동안 처리하고 다시 한 번 씻어내었다. 마지막으로 membrane에 부착된 단백질이 빛에 감지되기 위해 <Figure 16>과 같은 Westar ECL(Cyanagen, Italy) 1:1 혼합액에 3~5분간 담가 두었다가, Fusion Solo(Vilber Lourmat chemi doc, Germany)에 감광한 후, Western blotting detection system으로 분석하였다 <Figure 17>. 일차항체 anti-GAP-43 mouse monoclonal antibody(1:1000, Santa Cruz, USA), anti-p-ERK1/2 rabbit polyclonal antibody(1:1000, Cell signaling, USA), anti-JNK rabbit polyclonal antibody(1:1000, Cell signaling),

anti-ATF3 rabbit polyclonal antibody(1:1000, Santa Cruz), anti-p-c-Jun rabbit polyclonal antibody(1:1000, Cell signaling), anti-p-CREB rabbit polyclonal antibody(1:1000, Cell signaling), anti-p-Akt rabbit polyclonal antibody(1:1000, Cell signaling), anti-p-mTOR polyclonal antibody(1:1000, Cell signaling), anti-p-4E-BP1 rabbit monoclonal antibody(1:1000, Cell signaling), anti- β -actin mouse monoclonal antibody(1:1000, Santa Cruz) 그리고 anti-GAPDH mouse monoclonal antibody(1:2000, Santa Cruz) 단백질을 산출하였다.

앞서 언급한 1차 항체 관련 이차항체는 anti-rabbit IgG 혹은 anti-mouse IgG 결합 되어 있는 horseradish peroxidase를 각 1:2000의 비율로 처리하였다.



Figure 16. Westar ECL substrates



Figure 17. Fusion Solo with Western blotting detection system

3) 등쪽감각신경절(Dorsal root ganglion)과 슈반세포의 일차 배양(primary culture)

면역형광염색법을 수행하기 위해, 요추 4-5번에서 분리된 DRG(dorsal root ganglion) 감각신경절과 좌골신경의 슈반세포를 준비하였다. 분리된 세포는 poly-L-ornithine과 laminin의 혼합액으로 pre-coating 된 coverslip위에 안착하고 PBS(phosphate buffered saline; 4% paraformaldehyde, 4% sucrose)에 45분 동안 넣어 고정시켰다. 이 세포는 12시간동안 배양되고, 중간에 DMEM(5% FBS, 5% horse serum, 200 mM glutamine, 그리고 1% penicillin/streptomycin)으로 바꿔주었다. DRG 뉴런의 신경돌기 성장을 관찰하기 위해 세포들은 48시간동안 배양되고, anti-neurofilament-200(NF-200) antibody(1:700, Sigma-Aldrich, Germany)가 면역형광염색을 위해 사용되었다. Hoechst(25ug/ml, Sigma-Aldrich) 핵 염색은 0.25% hoechst 염료가 함유된 PBS 용액으로 처리되었다.

4) 조직학적 면역형광염색법

분리된 조직은 -20°C 에서 냉동 보관되었다. <Figure 18>과 같은 저온저장장치 (Thermo fisher scientific, Loughborough, England)에서 $20\mu\text{m}$ 두께로 조직은 절편되고 슬라이드 위에 놓여졌다. 면역염색형광을 위해, 절편된 조직(section)은 4% paraformaldehyde와 4% sucrose 혼합한 PBS로 상온에서 40분간 고정하였다. 그리고 상온에서 4시간동안, 0.5% nonidet P-40이 들어간 PBS로 투과시키고, 2.5% horse serum과 2.5% bovin serum album으로 차단하였다.

본 연구의 면역형광염색법을 위해 사용된 일차 항체는 anti-GAP-43(1:1000, Santa Cruz)와 anti-NF-200 antibody이다. 그 후 그들을 rhodamine-goat anti rabbit secondary antibody(1:400, Molecular Probes, USA) 혹은 fluorescein-goat anti-mouse secondary antibody(1:500, Molecular Probes) 희석하여 1시간동안 상온에서 반응시켰다. 절편된 조직은 Nikon fluorescence microscope(Nikon, Kawasaki, Japan)으로 볼 수 있고 획득된 이미지는 Adobe Photoshop(Adobe CS6, CA, USA)으로 분석하였다.

4. 자료처리

본 연구에서 얻은 자료는 SPSS for windows(version 21.0) 통계프로그램을 이용하여 분석하였다. 실험 집단 간 수치 데이터의 평균(Mean)과 표준편차(Standard Deviation)를 산출하였다. 항목별 그룹간의 차이를 알아보기 위해 일원변량 분산분석(one-way ANOVA)을 이용하였으며, 유의차가 나타난 항목에 대한 사후검증은 Tukey 방법을 이용하였고 모든 분석의 통계적 유의수준 $P < .05$ 로 설정하였다.

5. 연구결과

1) 좌골신경 손상 후 DRG 신경돌기의 길이에 미치는 운동의 효과

본 연구에서는 좌골신경 손상 후 트레드밀 운동이 DRG 신경돌기의 변화에 미치는 영향을 분석하기 위해 면역형광 염색법을 수행하였다. NF-200 항체는 DRG 뉴런의 신경돌기를 염색하고, Hoechst는 세포의 핵을 확인하는 대표적인 물질로 알려져 있다. <Table 2>과 <Figure 18>에서 보는 것처럼, DRG의 신경돌기는 좌골신경 손상 후 유의하게 증가하였고, 이러한 변화는 손상된 말초신경의 축삭재생을 확인하는 간접적인 지표가 된다. 좌골신경 손상 후 트레드밀 운동은 비운동군보다 DRG 신경돌기 길이가 더욱 촉진되었다.

Table 2. Descriptive statistics of neurite outgrowth in DRG afer SNI

(unit: μm)

Normal	Sedentary	Exercise	<i>F</i>	<i>p</i>	post hoc
305.8±118.5	675.6±114.1	841.5±99.0	61.17	0.001	N<S<E

Values are mean±standard deviation; SNI, sciatic nerve injury; DRG, dorsal root ganglion; E, exercise; S, sedentary; N, normal

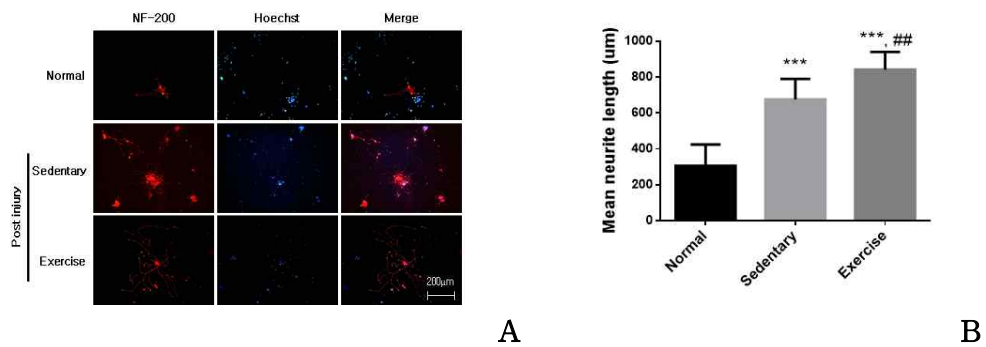


Figure 18. Immunofluorescence staining with NF-200 and hoechst substrates in DRG neurons after SNI (A) Second panels showed significant increases of neurite outgrowth of DRG in sedentary group than in normal group and exercise group significantly facilitated neurite outgrowth compared to those in other groups. (B) Right panels are quantitative comparison of mean neurite outgrowth among three groups. *** $p < 0.001$ vs. normal group, ## $p < 0.01$ vs. sedentary group; Scale bar: 200 μm .

2) 좌골신경 손상 후 GAP-43 발현에 미치는 운동의 효과

GAP-43는 손상된 말초신경의 슈반세포에서 발현되는 단백질로, 신경재생을 확인하는 중요한 인자이다. 본 연구에서는 좌골신경 손상 후 신경재생을 위한 대표적인 표식인자인 GAP-43 발현 농도에 미치는 운동의 효과를 분석하기 위해 Western blot을 수행하였다. <Table 3>와 <Figure 19>과 에서 보는 것처럼, GAP-43는 좌골신경 손상 후 control군에 비해 비운동군 7일과 14일에 발현이 이루어졌고, 트레드밀 운동을 적용한 운동군이 비운동군에 비해 7일과 14일에 GAP-43 발현이 유의하게 증가하였다.

Table 3. Descriptive statistics of GAP-43 expression levels after SNI
(unit: R.F.U)

Normal		7days		14days		<i>F</i>	<i>p</i>	post hoc
Cont	Ex	Sed	Ex	Sed	Sed			
0.533±0.08	2.71±0.21	1.42±0.10	2.96±0.14	1.78±0.16		88.99	.001	C<7S<7E, C<14S<14E

Values are mean±standard deviation; SNI, sciatic nerve injury; Cont, control; Ex, exercise; Sed, sedentary; 14E, 14days exercise; 7E, 7days exercise 14S, 14days sedentary; 7S, 7days sedentary; C, control; R.F.U, relative fluorescence units

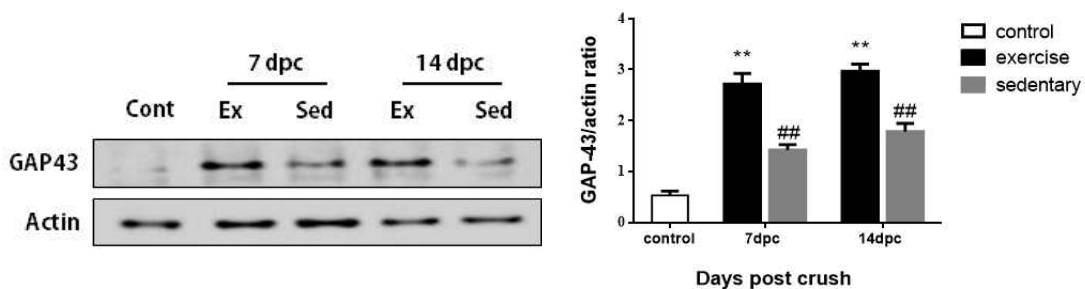


Figure 19. Expression level of GAP-43 by TMT after SNI. (A) GAP-43 was deeply induced in injured nerve at 7 and 14 days post crush(dpc) and was significantly increased in the treadmill group. Actin is performed as a role of loading control. (B) The right panels show quantitative comparison of GAP-43 protein level among groups. dpc, days post crush; Cont, control; Ex, treadmill exercise; Sed, sedentary; TMT, treadmill training; SNI, sciatic nerve injury; ***p*<0.01 vs. sedentary group; ##*p*<0.01 vs. control group

3) 좌골신경 손상 후, 손상 부위 원위부에 축삭 성장에 영향을 미치는 운동의 효과

본 연구에서는 좌골신경 손상 후 트레드밀 운동이 축삭 성장에 미치는 영향을 분석하기 위해 NF-200과 GAP-43를 이용해 면역형광 염색법을 수행하였다. NF-200과 GAP-43항체는 좌골신경 손상 부위 5mm 원위부를 염색하였다. <Table 4>와 <Figure 20>에서 보는 것처럼, 신경 손상 후 7일 운동군에서 비운동군에 비해 축삭 성장이 증가하였다. 또한 GAP-43 발현과 축삭 성장이 서로 공존하는 비율이 비운동보다 운동군에서 높게 나타났다.

Table 4. Descriptive statistics of immunofluorescence with NF-200 and GAP-43 in injured nerve after SNI (unit: R.F.U)

	Control	Exercise	Sedentary	<i>F</i>	<i>p</i>	post hoc
NF-200	123.67±13.85	66.17±12.02	39.67±7.92	83.17	.001	S<E<C
GAP-43	4.83±2.56	47.67±9.44	25.67±6.02	62.61	.001	C<S<E

Values are mean±standard deviation; SNI, sciatic nerve injury; C, control; E, exercise; S, sedentary; R.F.U, relative fluorescence units

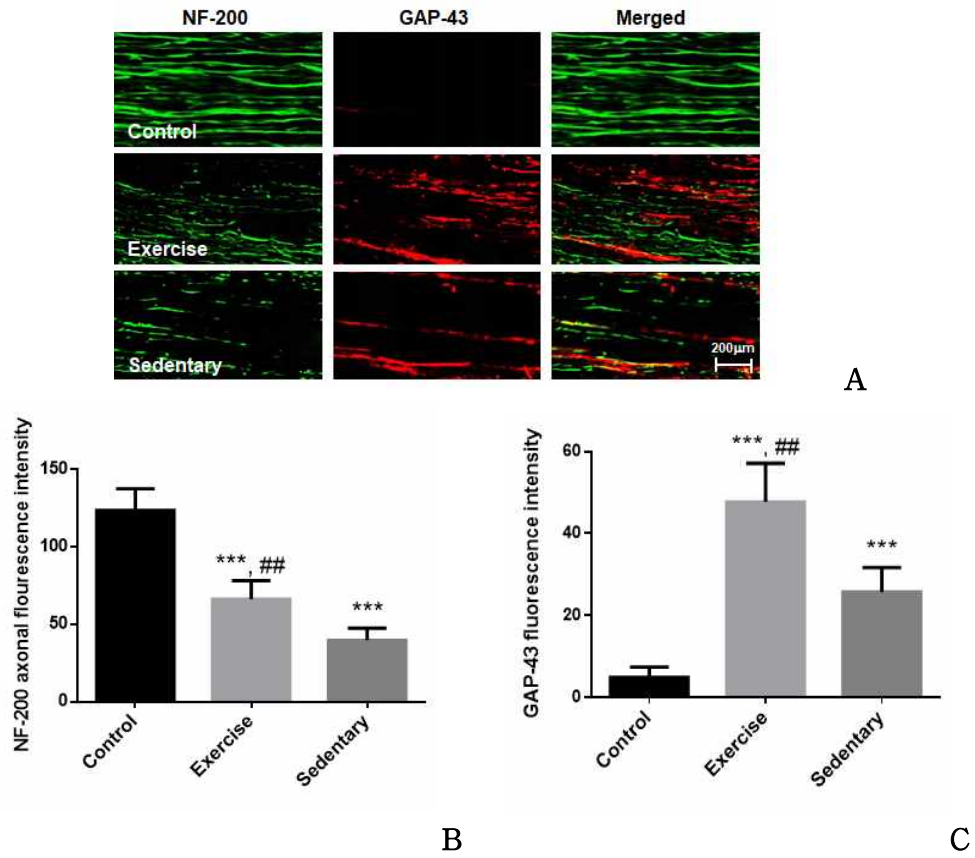


Figure 20. Immunofluorescence staining with NF-200 and GAP-43 proteins in 5mm distal to the injured nerve. (A) The GAP-43 signal with NF-200-labeled axons, co-localization of GAP-43 with NF-200 was higher in exercise group than other group. (B) NF-200 fluorescence intensity was more higher in treadmill exercise than sedentary group (C) GAP-43 expression was more induced in treadmill exercise than other group. $***p < 0.001$ vs normal group, $##p < 0.01$ vs sedentary group; Scale bar: 200 μ m.

4) 좌골신경 손상 후 신경 재생 초기 ERK1/2의 인산화 촉진에 미치는 운동의 효과

ERK1/2는 말초신경 손상 후 재생이 진행되는 초기에 슈반세포 증진을 위해 발현되는 MAPKs 계열 중 하나로써 축삭 재성장 관련 전사인자 발현을 촉진시킨다. 본 연구에서는 좌골신경 손상 후 손상 초기에 ERK1/2의 인산화 촉진에 미치는 운동의 효과를 확인하기 위해 Western blot을 수행하였다. <Table 5>과 <Figure 21>에서 보는 것처럼, 트레드밀 운동을 시작하고 7일차에 p-ERK1/2의 발현량이 비운동군과 비교해 유의하게 증가하였고 운동 14일차에 기저 수준으로 떨어졌다. 그리고 control군과 비운동군의 차이는 보이지 않았다.

Table 5. Descriptive statistics of p-ERK1/2 expression levels after SNI (unit: R.F.U)

Normal		7days		14days		<i>F</i>	<i>p</i>	post hoc
Cont	Ex	Sed	Ex	Sed	Sed			
0.17±0.05	1.24±0.09	0.38±0.06	0.20±0.04	0.19±0.03	169.2	.001	7S<7E	

Values are mean±standard deviation; SNI, sciatic nerve injury; Cont, control; Ex, exercise; Sed, sedentary; 14E, 14days exercise; 7E, 7days exercise; 14S, 14days sedentary; 7S, 7days sedentary; C, control; R.F.U, relative fluorescence units

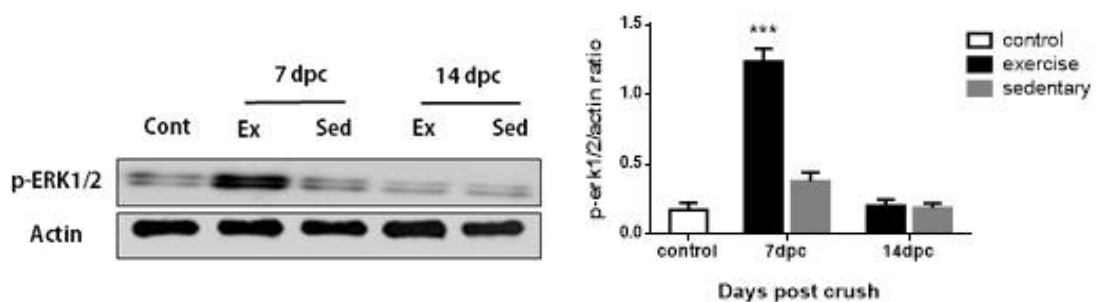


Figure 21. Expression level of p-ERK1/2 by TMT after SNI. (A) At an early stage of sciatic nerve regeneration, p-ERK1/2 level was significantly increased in injured nerve at 7 dpc and was dramatically dropped at 14 dpc in the treadmill exercise group. (B) The right panels show quantitative comparison of p-ERK1/2 protein level among groups. dpc, days post crush; Cont, control; Ex, treadmill exercise; Sed, sedentary; TMT, treadmill training; SNI, sciatic nerve injury; *** $p < 0.001$ vs. sedentary group.

5) 좌골신경 손상 후 신경 재생 초기 CREB의 인산화 촉진에 미치는 운동의 효과

CREB은 신경 재생 관련 단백질을 발현시키는 전사인자 중 하나로 ERK1/2에 의해 발현되며 인산화 되어 축삭 재성장 에 관여한다. 본 연구에서는 좌골신경 손상 후 초기에 CREB의 인산화 촉진에 미치는 운동의 효과를 확인하기 위해 Western blot을 수행하였다. <Table 6>과 <Figure 22>에서 보는 것처럼, 트레드밀 운동 7일차와 14일차 시기 모두에서 CREB 단백질의 발현 농도가 비운동군보다 유의하게 증가하였다. 또한 control군과 7일차 비운동군의 차이가 유의하게 증가하였다.

Table 6. Descriptive statistics of p-CREB expression levels after SNI (unit: R.F.U)

Normal		7days		14days		F	p	post hoc
Cont	Ex	Sed	Ex	Sed	Sed			
0.13±0.03	0.55±0.03	0.32±0.05	0.28±0.03	0.21±0.02	39.43	.001	C<7S, 7S<7E, 14S<14E	

Values are mean±standard deviation; SNI, sciatic nerve injury; Cont, control; Ex, exercise; Sed, sedentary; C, control; 7S, 7days sedentary; 7E, 7days exercise; 14S, 14days sedentary; 14E, 14days exercise; R.F.U, relative fluorescence units

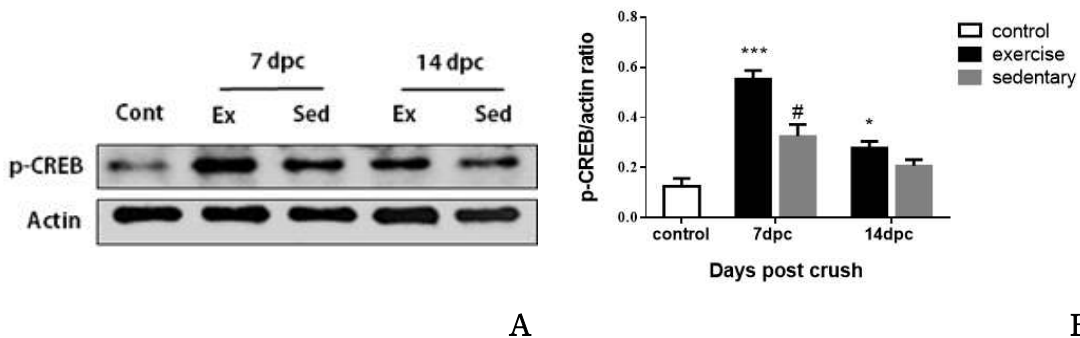


Figure 22. Expression level of p-CREB by TMT after SNI. (A) p-CREB level was significantly increased in injured nerve at 7 dpc and 14 dpc by treadmill exercise (B) The right panels show quantitative comparison of p-CREB protein level among groups. dpc, days post crush; Cont, control; Ex, treadmill exercise; Sed, sedentary; TMT, treadmill training; SNI, sciatic nerve injury; * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$ vs. sedentary group, # $p < 0.05$ vs. control group.

6) 좌골신경 손상 후 전사인자 활성화를 돕는 JNK 발현을 촉진에 미치는 트레드밀 운동의 효과

JNK는 MAPKs 계열 중의 하나로써 말초신경에 손상이 발생하면 세포 원형질에서 발현되어 세포핵에서 전사인자들을 발현시켜 축삭 재생장에 관여한다. 좌골신경 손상 후, JNK의 발현에 미치는 운동의 효과를 확인하기 위해 Western blot을 수행하였다. <Table 7>과 <Figure 23>에서 보는 것처럼, 손상 후 14일 운동군에서 비운동군에 비해 상향 발현하였다. 또한 control군과 14일차 비운동군에 발현 차이가 나타났다.

Table 7. Descriptive statistics of JNK expression levels after SNI (unit: R.F.U)

Normal	7days		14days		<i>F</i>	<i>p</i>	post hoc
Cont	Ex	Sed	Ex	Sed			
1.07±0.02	1.40±0.06	1.24±0.05	1.64±0.07	1.46±0.06	137.0	.04	C<14S<14E

Values are mean±standard deviation; SNI, sciatic nerve injury; Cont, control; Ex, exercise; Sed, sedentary; C, control; 14S, 14days sedentary; 14E, 14days exercise; R.F.U, relative fluorescence units

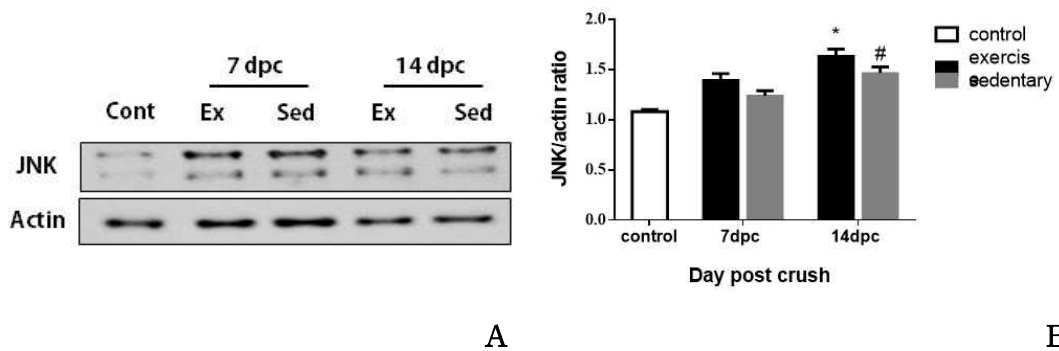


Figure 23. Expression level of JNK by TMT after SNI. (A) JNK level was significantly increased in injured nerve at 14 dpc by treadmill exercise. (B) The right panels show quantitative comparison of JNK protein level among groups. dpc, days post crush; Cont, control; Ex, treadmill exercise; Sed, sedentary; TMT, treadmill training; SNI, sciatic nerve injury; **p*<0.05 vs. sedentary group, #*p*<0.05 vs. control group.

7) 좌골신경 손상 후, 손상 초기에 발현되는 전사인자인 ATF3 그리고 c-Jun의 활성화에 미치는 운동의 효과

JNK에 의해 발현되는 ATF3와 c-Jun은 재생 관련 유전자를 발현시켜 신경 재생을 촉진시킨다. 좌골신경 손상 후, 축삭 재생을 확인하기 위해서 ATF3와 p-c-Jun의 시간대별 발현량에 영향을 미치는 운동의 효과를 알아보기 위하여 Western blot을 수행하였다. <Table 8>과 <Figure 24>에서 보는 것처럼, ATF3가 손상 후 7일에서는 control군 보다 증가 추세를 보이지 않다가 14일에는 명확한 증가를 보였다. 그리고 트레이드밀 운동군이 비운동군에 비해 유의한 상향발현을 보였다. 또한 트레이드밀 운동군 7일, 14일 운동군이 비운동군에 비해 p-c-Jun 발현량을 유의하게 증가시켰다.

Table 8. Descriptive statistics of ATF3 and p-c-Jun expression levels after SNI (unit: R.F.U)

	Normal		7days		14days		<i>F</i>	<i>p</i>	post hoc
	Cont	Ex	Sed	Ex	Sed	Sed			
ATF-3	0.75±0.02	0.48±0.04	0.15±0.04	1.66±0.18	1.04±0.08	116.5	.001	7S<7E<C, C<14S<14E	
p-c-Jun	0.71±0.06	0.96±0.15	0.68±0.07	1.23±0.08	0.86±0.08	6.412	.03	7S<7E, 14S<14E	

Values are mean±standard deviation; SNI, sciatic nerve injury; Cont, control; C, control; 7S, 7days sedentary; 7E, 7days exercise; 14S, 14days sedentary; 14E, 14days exercise; R.F.U, relative fluorescence units

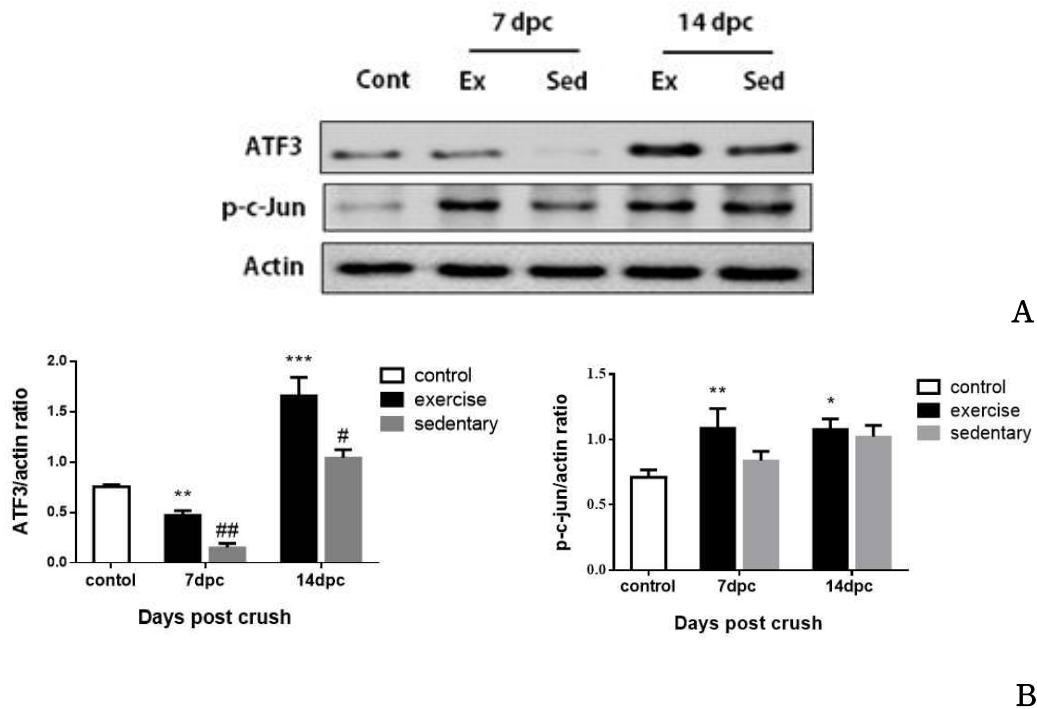


Figure 24. ATF3 and p-c-Jun were shown as exercise-dependent proteins at an early stage of nerve regeneration after SNI. (A) ATF3 expression level was significantly increased in injured nerve at 7 and 14 dpc in exercise groups compared to those in sedentary groups. In addition, treadmill exercise significantly increased p-c-Jun levels in injured nerve at both 7 and 14 dpc than those in sedentary group. (B) The lower panels show quantitative comparison of ATF3 and p-c-Jun expression level among three group. dpc, days post crush; Cont, control; Ex, treadmill exercise; Sed, sedentary; SNI, sciatic nerve injury; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. sedentary group; # $p < 0.5$, ## $p < 0.01$ vs. control group.

8) 좌골 신경 손상 후, 가자미근에서 ERK1/2 인산화 촉진에 미치는 운동의 효과

ERK1/2는 IRS 1의 발현에 의해 Ras/Raf/MEK 활성화를 유도하며 근육에서는 근육 성장 억제 인자인 TSC1/2를 억제시킨다. 본 연구에서는 좌골신경 손상 후 근육에서 ERK1/2의 인산화 촉진에 미치는 운동의 효과를 확인하기 위해 Western blot을 수행하였다. <Table 9>과 <Figure 25>에서 보는 것처럼, 손상 후 운동 7일차에 가자미근에서 인산화된 ERK1/2 발현량이 비운동군과 비교해 유의하게 상향 발현된 것을 확인하였다. 그리고 운동 14일차에 기저 수준으로 떨어졌으며 control군과 비운동군 간의 차이는 보이지 않았다.

Table 9. Descriptive statistics of p-ERK1/2 expression levels in ipsilateral soleus after SNI (unit: R.F.U)

Normal	7days		14days		<i>F</i>	<i>p</i>	post hoc
Cont	Ex	Sed	Ex	Sed	7960	.001	7S<7E
0.78±0.02	4.34±0.02	0.57±0.04	0.81±0.04	0.72±0.03			

Values are mean±standard deviation; SNI, sciatic nerve injury; Cont, control; Ex, exercise; Sed, sedentary; 7S, 7days sedentary; 7E, 7days exercise; R.F.U, relative fluorescence units

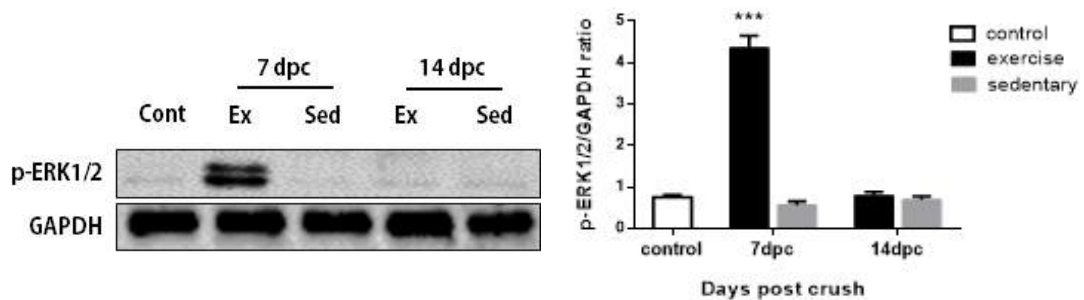


Figure 25. Expression level of p-ERK1/2 by TMT in ipsilateral soleus after SNI (A) p-ERK1/2 level was significantly increased in ipsilateral soleus at 7 dpc by treadmill exercise, and was significantly dropped at 14 dpc. GAPDH is performed as a role of loading control. (B) The right panels show quantitative comparison of p-ERK1/2 protein level among groups. dpc, days post crush; Cont, control; Ex, treadmill exercise; Sed, sedentary; TMT, treadmill training SNI, sciatic nerve injury; ****p*<0.001 vs. sedentary group.

9) 좌골신경 손상 후, 가자미근에서 성장인자인 p-Akt의 발현 촉진에 미치는 운동의 효과

p-Akt는 대표적인 성장인자인 IGF-1의 하위인자로서 세포 성장에 관여하며 단백질 합성과 관련된다. 본 연구에서는 신경 손상 후 근육에서 인산화된 Akt의 상향 발현에 영향을 미치는 운동의 효과를 확인하기 위해 Western blot을 수행하였다. <Table 10>과 <Figure 26>에서 보는 것처럼, 좌골신경 손상 후 트레드밀 운동 14일차에 가자미근에서 인산화된 Akt의 발현량이 비운동군에 비해 유의하게 증가하였다. 또한 14일차 비운동군이 control군과 비교하여 유의하게 증가하였다

Table 10. Descriptive statistics of p-Akt expression levels in ipsilateral soleus after SNI (unit: R.F.U)

Normal	7days		14days		<i>F</i>	<i>p</i>	post hoc
Cont	Ex	Sed	Ex	Sed	20.55	.001	C<14S<14E
0.68±0.09	0.72±0.11	0.78±0.03	1.15±0.5	0.88±0.05			

Values are mean±standard deviation; SNI, sciatic nerve injury; Cont, control; Ex, exercise; Sed, sedentary; C, control; 14S, 14days sedentary; 14E, 14days exercise; R.F.U, relative fluorescence units

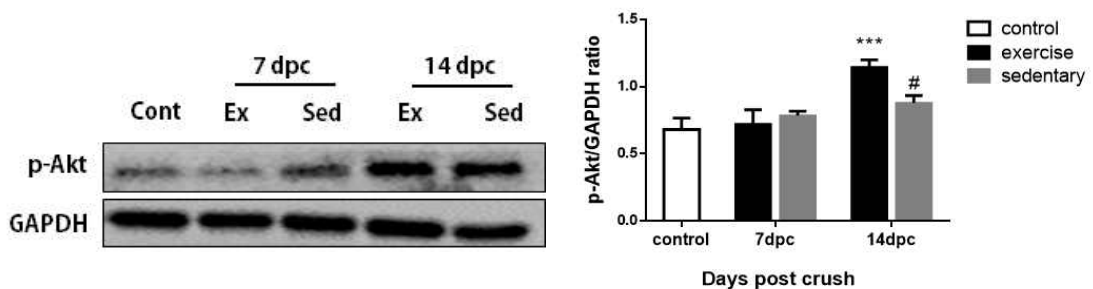


Figure 26. Expression level of p-Akt by TMT in ipsilateral soleus after SNI (A) p-Akt expression level was significantly increased at 14 dpc in ipsilateral soleus of exercise group than that in sedentary group. (B) The right panels show quantitative comparison of p-Akt protein level among groups. dpc, days post crush; Cont, control; Ex, treadmill exercise; Sed, sedentary; SNI, sciatic nerve injury; *** $p < 0.001$ vs. sedentary group, # $p < 0.05$ vs. control group.

10) 좌골신경 손상 후, 가자미근에서 성장인자인 p-mTOR의 발현 촉진에 미치는 운동의 효과

mTOR는 Akt의 하위인자이며 단백질 합성 인자 발현을 촉진시키는 4E-BP1 인산화를 촉진시킨다. 본 연구에서는 신경 손상 후 근육에서 p-mTOR의 상향 발현에 미치는 운동의 효과를 확인하기 위해 Western blot을 수행하였다. <Table 11>와<Figure 27>에서 보는 것처럼, 좌골신경 손상 후 트레드밀 운동 7일차와 14일차에 가자미근에서 p-mTOR의 발현량이 비운동군에 비해 유의하게 증가하였다. 또한 control군과 비운동군 간의 차이는 보이지 않았다.

Table 11. Descriptive statistics of p-mTOR expression levels in ipsilateral soleus after SNI (unit: R.F.U)

Normal	7days		14days		<i>F</i>	<i>p</i>	post hoc
Cont	Ex	Sed	Ex	Sed	25.85	.001	7S<7E, 14S<14E
0.48±0.04	0.74±0.05	0.55±0.05	0.49±0.05	0.37±0.04			

Values are mean±standard deviation; SNI, sciatic nerve injury; Cont, control; Ex, exercise; Sed, sedentary; Cont, control; 14S, 14days sedentary; 14E, 14days exercise; R.F.U, relative fluorescence units

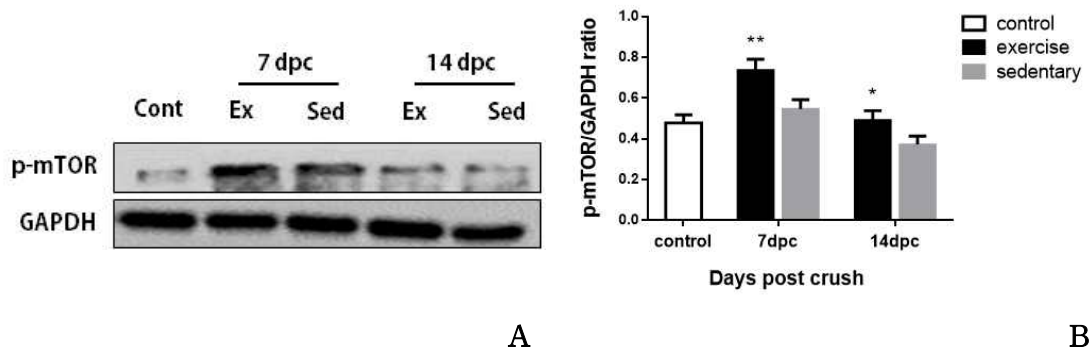


Figure 27. Expression level of p-mTOR in ipsilateral soleus after SNI. (A) p-mTOR expression level was significantly increased at 7 and 14 dpc in ipsilateral soleus of exercise group than that in sedentary group. (B) The right panels show quantitative comparison of p-mTOR protein level among groups. dpc, days post crush; Cont, control; Ex, treadmill exercise; Sed, sedentary; SNI, sciatic nerve injury; **p*<0.05, ***p*<0.01 vs. sedentary group.

11) 좌골신경 손상 후, 가자미근에서 단백질 합성 인자인 p-4E-BP1의 발현 촉진에 미치는 운동의 효과

p-4E-BP1은 단백질 합성 인자 발현을 유도하며 산화적 대사 작용에 의해 발생하는 미토콘드리아 대사 인자인 PGC 1 α 에 의해서도 발현이 촉진된다. 본 연구에서는 신경 손상 후 가자미근에서 인산화된 4E-BP1의 발현에 영향을 미치는 운동의 효과를 확인하기 위해 Western blot을 수행하였다. <Table 12>과 <Figure 28>에서 보는 것처럼, 좌골신경 손상 후 트레드밀 운동 7일차 그리고 14일차에 가자미근에서 p-4E-BP1의 발현량이 비운동군과 비교해 유의하게 증가하였음을 알 수 있었다. 또한 7일차 비운동군이 control군과 비교하여 유의하게 증가하였다.

Table 12. Descriptive statistics of p-4E-BP1 expression levels in ipsilateral soleus after SNI (unit: R.F.U)

Normal	7days		14days		<i>F</i>	<i>p</i>	post hoc
Cont	Ex	Sed	Ex	Sed	80.32	.001	C<7S<7E, 14S<14E
0.68±0.09	0.72±0.11	0.78±0.03	1.15±0.5	0.88±0.05			

Values are mean±standard deviation; SNI, sciatic nerve injury; Cont, control; Ex, exercise; Sed, sedentary; C, control; 14S, 14days sedentary; 14E, 14days exercise; R.F.U, relative fluorescence units

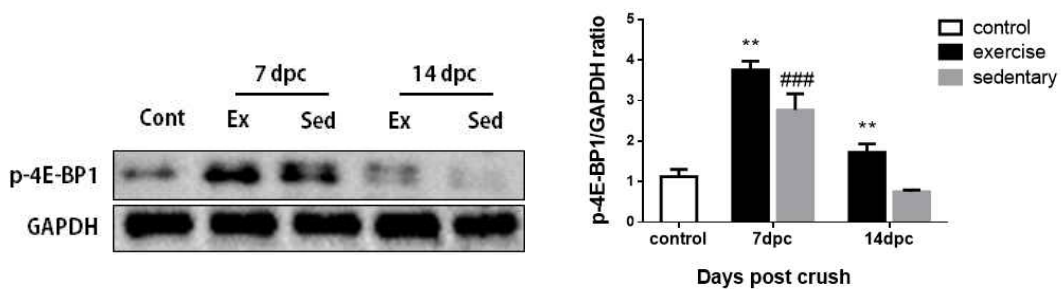


Figure 28. Expression level p-4E-BP1 in ipsilateral soleus after SNI. (A) p-4E-BP1 expression level was significantly upregulated at 7 and 14 dpc in ipsilateral soleus of exercise group than that in sedentary group. (B) The right panels show quantitative comparison of p-4E-BP1 protein levels among three groups. dpc, days post crush; SNI, sciatic nerve injury; Cont, control; Ex, treadmill exercise; Sed, sedentary; ***p*<0.01 vs. sedentary group, ###*p*<0.001 vs. control group.

IV. 연구 II: 좌골신경 손상 전, 후 트레드밀 운동이 비복근과 가자미근 위축억제 기전에 미치는 영향

1. 연구의 필요성

골격근은 외부자극에 의해서 유전형질(genotype)의 변형 없이 본연의 표준형질(phenotype)에 가변성을 띠는 유연한 기관이다. 다시 말해서, 식이요법, 신경계의 변화 그리고 산소이용능력 등에 따라 근 섬유질의 생리학적 능력, 대사능력 그리고 조직학적 크기가 달라질 수 있다. 특히, 수축 작용에 따른 골격근의 적응(adaptation)과 가소성(plasticity)은 탁월하다. 따라서 말초신경 손상 후, 가장 만성적 후유증의 원인 중 하나인 근 위축을 방지하기 위해서 다양한 수축 형태의 중재가 제안되었다 (Frontera & Ochala, 2015; Lieber et al., 2017). 더욱이, 골격근은 물리력, 수축지속 시간 그리고 수축 속도 등의 특성에 따라 근섬유들의 특징과 기능이 각기 다르다 (Ferraro et al., 2014).

근섬유는 일반적으로 수축 속도에 의해 저근(slow-twitch)와 속근(fast twitch)으로 분류되고 생리학적으로는 actin과 myosin의 결합 속도에 의해 분류된다 (Okumura et al., 2005). 휴식기의 근육은 actin이 troponin과 tropomyosin과 결합되어 있어 myosin과의 결합 기회가 제공되지 않는다. 하지만 근 수축을 위하여 근형질세망에서 칼슘이 방출되고 actin에 결합된 troponin과 tropomyosin이 해리된다 (Franzini-Armstrong, 1999). 동시에 myosin의 머리에 결합된 아데노신 이인산 (ADP, adenosine diphosphate) + 무기인산(Pi)이 해리되어 myosin의 머리가 actin에 결합 후 thick filament 방향으로 끌어당겨 power stroke을 일으킨다(Sengen et al., 2006). 에너지를 소모하고 ATP가 다시 myosin의 머리에 부착되면 actin과 myosin의 결합력은 약해지고 power stroke 현상도 소멸된다. 이때 ATPase에 의해 myosin 머리의 ATP가 ADP + Pi로 가수 분해되어 부착하는 형태가 바뀌고 다음

actin과의 결속을 준비한다(Arata, 2020). 일련의 과정 중 칼슘의 방출과 흡수속도, myosin 머리에 결속된 ADP + Pi의 해리 그리고 ATPase에 의하여 ATP가 ADP + Pi로 가수 분해되는 속도 차이가 근 수축 속도를 결정한다(Karatzafieri et al., 2017; Sweeney & Hammers, 2018). 또한 myosin heavy chain(MyHC) 근 수축 단백질 발현에 의한 조직학적 기반으로 다음과 같이 근섬유가 type I fibers, type IIa fibers 그리고 type IIB/IIx fibers로 분류된다(Boyer et al., 2019).

우선적으로 Type I 섬유는 지구성 섬유로써 산화적 대사 작용(oxidative metabolism)에 의해 우선적으로 작용한다. 이들은 에너지 대사의 대표 기관인 미토콘드리아 함유량, 혈관 밀도가 높고 에너지 대사를 위한 포도당과 지방산 산화 효소 발현량이 높아 유산소성 지구성 운동에 탁월하다(Pette & Spamer, 1986). Type I 근 섬유는 근육 색소인 미오글로빈(myoglobin) 함유량이 높아 붉은색을 띠며 myosin과 actin의 결합 속도와 결합범위에 따라 힘의 발현이 달라진다. Type IIa 섬유는 당 대사(glycolytic metabolism)와 산화적 대사를 모두 포함하고 있다. 그러므로 빠른 수축을 유도하는 속근과 지속적인 수축을 유지하는 지구성 섬유의 능력을 갖추고 있다. 마지막으로 Type IIB/IIx는 당 분해를 통한 대사 작용에 월등한 근 섬유로 빠른 수축 능력을 보이는 반면 미토콘드리아 동원 능력이나 혈관 밀도는 type I 섬유에 비해 다소 떨어지는 특징이 있다. 또한 low glucose transporter 4(GLUT4) 동원력과 인슐린 감수성(insuline sensitivity)도 type I 섬유보다 떨어진다고(Bourdeau et al., 2018; Fitts & Widrick, 1996; Reyes et al., 2015).

일반적으로 저항운동은 근 성장 인자 Akt/mTOR 신호전달체계를 자극하여 근육의 크기 증가에 관여하고 지구성 운동은 serine/threonine 효소인 AMPK로 인해 peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha(PGC-1α) 발현을 촉진하여 미토콘드리아의 동원력을 강화한다(Cantó & Auwerx, 2009). 따라서 근육의 크기보다는 산화적 대사 작용에 탁월하다고 알려져 있다. 하지만 지구성 운동을 통한 미오글로빈, 혈관 밀도와 적혈구 용적의 증가는 산소의 이동 능력을 강화하고 이는 미토콘드리아 밀도에도 긍정적인 영향을 가져와 근 섬유의 단면적에 관여함으로써 근 비대를 가져올 수 있다(Solaini et al., 2010; Wessel et al., 2010). 그러나 산화 능력에 차이를 보이는 근섬유의 유형에 따른 지구성 운동의 적용이 근 성장인자 발현에 미치는 영향에 대해 비교 분석한 연구는 미흡한 실정이다.

게다가 신경 손상이 발생 후 월러변성이 바로 일어나고 신경 재생 과정은 그 이후에 천천히 이루어지기 때문에 탈신경으로 인한 표적근육의 단면적 감소와 근 위축 그리고 탄력성의 소실은 만성적 후유증을 초래하기 때문에 수축 활동을 통한 신경영양인자를 방출하여 근 섬유의 생존을 유지하는 것은 중요한 과제이다(Kunihiro & Akihiko, 2011). 하지만 좌골신경 손상 전, 후 운동시점에 따라 신경 재생을 촉진하여 표적기관의 조직학적 강화에 미치는 영향에 대해 비교 분석한 연구 또한 제한적이다. 그러므로 본 연구 II에서는 좌골신경 손상 전, 후 그리고 전, 후 복합운동 수행이 비복근과 가자미근 위축억제 기전에 미치는 영향을 비교 분석하였다.

2. 연구방법

1) 실험 동물

본 연구를 위해 Sprague-Dawley 계열 쥐(6 weeks old, male, 190~200g; N=80)가 사용되었다. 온도 22°C, 습도 60% 그리고 12시간 간격의 낮과 밤이 통제되는 동일한 환경에서 관리되었으며 음수와 쥐 사료(commercial rat chow; Samyang Co., Korea)는 충분히 공급되었다. 쥐 관리와 모든 실험 과정은 동물실험을 위한 동물 사용 지침서를 따를 것이며 제주대학교 동물 윤리 위원회의 승인(2020-0010)을 받은 후 진행되었다. 본 실험을 위한 실험쥐에 아무런 처치도 적용하지 않은 Normal 그룹(Norm, n=10), 수술은 적용하고 운동은 하지 않은 sedentary 그룹(SAI, n=10), 좌골신경 손상 전 운동군(EBI, n=10), 좌골신경 후 운동군(EAI, n=10) 그리고 좌골신경 손상 전·후 운동군(EBAI, n=10) 5그룹을 무작위로 분류하였다<Table 13>.

Table 13. Grouping of the experimental animals in Study II

Norm	SAI	EBI	EAI	EBAI
n=10	n=10	n=10	n=10	n=10

Norm, normal; SAI, sedentary after injury; EBI, exercise before injury; EAI, exercise after injury; EBAI, exercise before and after injury.

2) 실험 설계

본 실험 돌입 전 실험쥐들은 일주일간의 운동 적응기간을 가졌다. EBI 운동군과 EBAI 운동군은 좌골신경수술을 실시하기 2주전부터 본 운동을 실시하였다. 좌골신경손상 수술을 실시한 후, 이틀간의 휴식기를 갖고 EAI 운동군과 EBAI 운동군은 2주간의 운동이 실시되었다. 운동기간에 맞게 끝낸 운동군과 비운동군 쥐들 그리고 수술과 운동을 적용하지 않은 Norm군의 조직 분리 수술이 진행되었다. 적출한 조직들은 조직학적, 생화학적 실험 분석에 들어갔다.

본 실험의 연구 설계는 <Figure 29>와 같다.

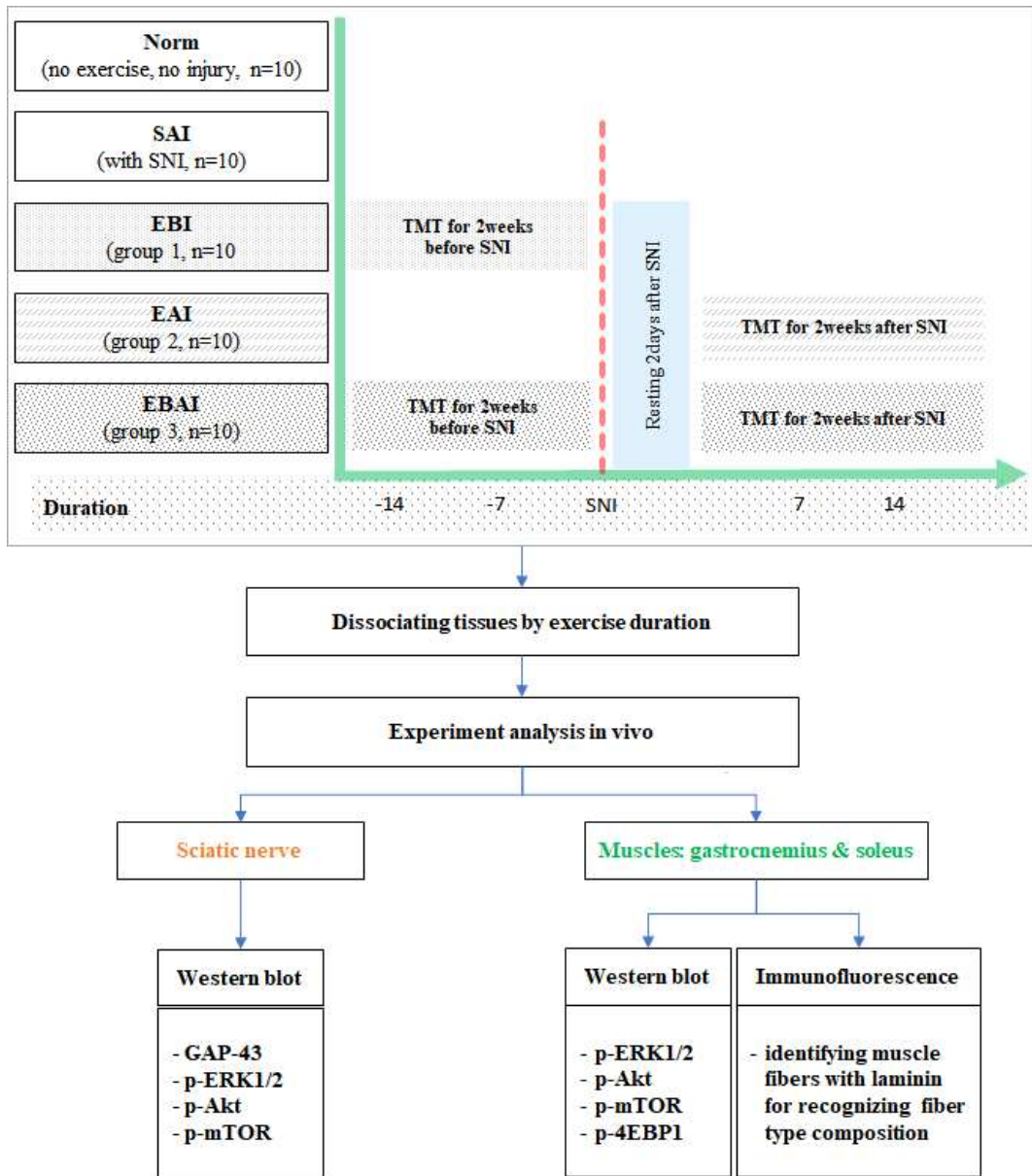


Figure 29. The experimental design for Study II

3) 트레드밀 트레이닝(TMT) protocol

본 실험에 들어가기 전에 실험동물들은 일주일간의 운동적응 시간을 가졌다. 연구 I에서 사용된 것과 동일한 트레드밀 기구로 사용되었다. 트레드밀 운동은 하루 20분 간 15m/min, 저강도(low intensity)로 진행되었다.

3. 측정항목 및 방법

1) 조직적출

본 연구 II의 실험을 위해 Norm군, SAI군, EBI군, EAI군 그리고 EBAI군의 좌골신경, 비복근 그리고 가자미근을 적출하였다<Figure 30>. 적출한 조직들은 변성을 막기 위해 -70°C 에 냉동 보관하였다.

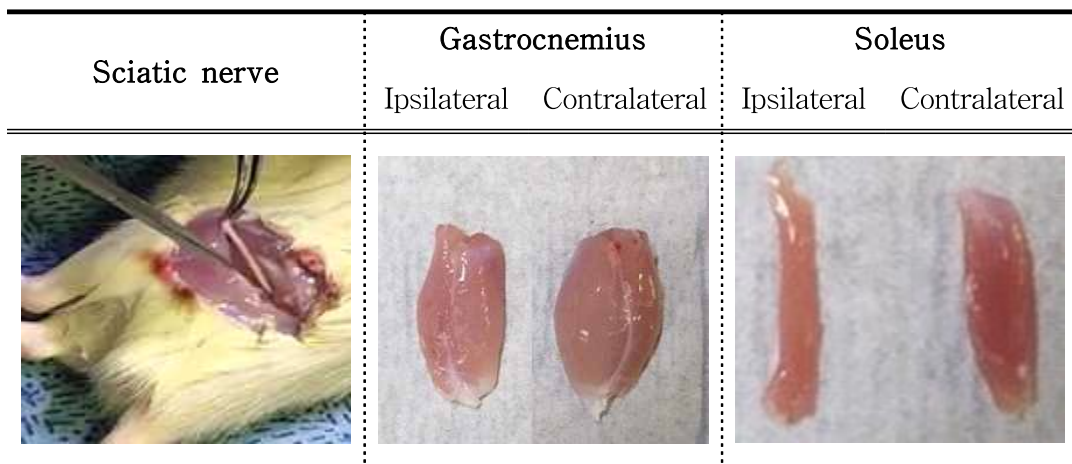


Figure 30. Dissected tissues

2) Western blot analysis

적출한 조직은 단백질 변성을 막는 proteasome inhibitor cocktail 1:100 수준으로 p300 lysis buffer에 혼합해 담가 초음파를 이용하여 분해하였다. 실험을 위해 단백질 20ug이 사용되었다. 각 sample들은 Bradford assay를 이용해 단백질 정량을 한 후, western blot 분석을 실시하였다. 정량한 단백질은 12% SDS-polyacrylamide gel 상에서 전기영동 후, PVDF membrane(Pall Corporation, USA)에 전기이동 시켰다.

항체와의 비특이적 반응을 방지하기 위해 blocking buffer(1×TBS buffer, 3% BSA, 0.1% Tween 20)에 30분간 반응시키고 나서 1차 항체를 정해진 비율에 맞게 넣고 4°C에서 overnight동안 incubating 시켰다. 반응을 끝낸 membrane을 확인한 후 씻어내고, 관련 2차 항체를 1:2000의 비율로 희석하여 상온에서 40분 동안 처리하고 다시 한 번 씻어냈다. 마지막으로 membrane에 부착된 단백질이 빛에 감지되기 위해 Westar ECL(Cyanagen, Italy) 1:1 혼합액에 3~5분간 담가 두었다가, Fusion Solo(Vilber Lourmat chemi doc, Germany)에 감광한 후, Western blotting detection system으로 분석하였다. anti-p-ERK1/2 rabbit polyclonal antibody(1:1000, Cell signaling, USA), anti-GAP43 mouse monoclonal antibody(1:1000, Santa Cruz, USA) anti-p-Akt rabbit polyclonal antibody(1:1000, Cell signaling), anti-p-mTOR rabbit polyclonal antibody(1:1000, Cell signaling), anti-p-4E-BP1 rabbit monoclonal antibody(1:1000, Cell signaling), anti-β-actin mouse monoclonal antibody(1:1000, Santa Cruz) 그리고 anti-GAPDH mouse monoclonal antibody(1:2000, Santa Cruz) 단백질 양을 산출하였다.

앞서 언급한 1차 항체 관련 이차항체는 anti-rabbit IgG 혹은 anti-mouse IgG 결합 되어 있는 horseradish peroxidase를 각 1:2000의 비율로 처리하였다.

3) 조직학적 면역형광염색법

근육 조직을 Tissue-Tek Optimal Cutting Temperature compound를 이용해 부착

해서 냉동 보관 후, 저온저장장치에서 20 μ m 두께로 조직을 절편하고 슬라이드 위에 고정시켰다. 절편된 조직은 5% bovine serum, albumin, donkey serum이 들어간 PBS로 block시킨다. 그리고나서 일차 항체를 넣고 상온에서 incubate 하였다.

본 연구의 면역형광염색법을 위해 사용된 일차 항체는 다음과 같다: anti-laminin antibody(1:500, rabbit polyclonal, Sigma-Aldrich), anti-MyHC-1 antibody(1:5, mouse monoclonal, Developmental studies hybridoma bank) 그리고 핵 염색은 0.25% hoechst 염료가 함유된 PBS 용액으로 처리되었다. 그 후 그들을 rhodamine-goat anti rabbit secondary antibody(1:400, Molecular Probes, USA) 혹은 fluorescein-goat anti-mouse secondary antibody(1:500, Molecular Probes) 희석하여 1시간동안 상온에서 반응시켰다. 절편된 조직은 Nikon fluorescence microscope(Nikon, Kawasaki, Japan)으로 볼 수 있고 획득된 이미지는 Adobe Photoshop(Adobe CS6, CA, USA)으로 분석하였다.

4. 자료처리

본 연구에서 얻은 실험 집단 간 데이터의 mean \pm standard deviation를 산출하였다. 실험집단 간 조직학적 그리고 생화학적 차이를 알아보기 위해서 일원변량 분산 분석(one-way ANOVA)을 이용하였으며, 유의차가 나타난 항목에 대한 사후검증은 Tukey 방법을 이용하였고, 모든 분석의 통계적 유의수준은 $P < .05$ 로 설정하였다.

5. 연구결과

1) 좌골신경 손상 전, 후 운동 시점에 따른 GAP-43 발현 농도의 차이

GAP-43는 손상된 말초신경의 슈반세포에서 발현되는 단백질로, 신경재생을 확인하는 중요한 인자이다. 본 연구에서는 좌골신경 전, 후 트레드밀 운동이 GAP-43 발현농도 변화 비교 분석하기 위해 Western blot을 수행하였다. <Table 14>와 <Figure 31>에서 보는 것처럼, 좌골신경 손상이 GAP-43 발현을 유도하였다. 특히 좌골신경 손상 후 운동이 GAP-43 발현을 유의하게 촉진시켰다. 하지만 EBAI에서는 비운동군과 비교해 유의한 차이가 일어나지 않았다.

Table 14. Descriptive statistics of GAP-43 expression level by TMT performed pre and post SNI (unit: R.F.U)

Norm	SAI	EBI	EAI	EBAI	<i>F</i>	<i>p</i>	post hoc
0.49±0.01	1.65±0.11	2.06±0.1	3.03±0.11	1.53±0.16	144.6	.001	EBI<EAI

Values are mean±standard deviation; TMT, treadmill training; SNI, sciatic nerve injury; Norm, normal; SAI, sedentary after injury; EBI, exercise before injury; EAI, exercise after injury; EBAI, exercise before and after injury; R.F.U, relative fluorescence units

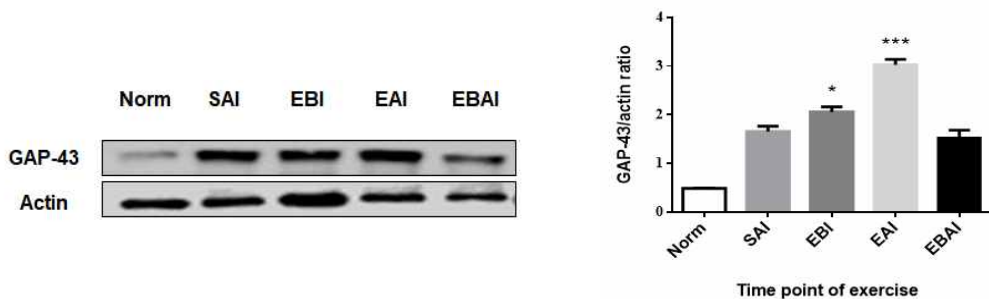


Figure 31. Expression level of GAP-43 by TMT performed pre and post SNI (A) GAP-43 expression level was further elevated in EBI group and was the highest in EAI group. Actin shows as a role of loading control. (B) The right panels show quantitative comparison of GAP-43 protein level among groups. TMT, treadmill training; SNI, sciatic nerve injury; Norm, normal; SAI, sedentary after injury; EBI, exercise before injury; EAI, exercise after injury; EBAI, exercise before and after injury; **p*<0.05, ****p*<0.001 vs. sedentary group

2) 좌골 신경 손상 전, 후 운동 시점에 따른 ERK1/2 인산화의 차이

ERK1/2는 말초신경 손상 후 재생이 진행되는 초기에 슈만세포 증진을 위해 발현되는 MAPKs 계열 중 하나로써 축삭 재성장 관련 전사인자 발현을 촉진시킨다. 본 연구에서는 좌골신경 손상 전, 후 손상된 신경에서 트레드밀 운동 시점에 따른 ERK1/2 인산화의 변화를 비교 분석하기 위해 Western blot을 수행하였다. <Table 15>와 <Figure 32>에서 보는 것처럼, 인산화된 ERK1/2 발현량이 EAI과 EBAI군에서 유의하게 상향 발현된 것을 확인 할 수 있었다.

Table 15. Descriptive statistics of p-ERK1/2 expression level by TMT performed pre and post SNI (unit: R.F.U)

Norm	SAI	EBI	EAI	EBAI	<i>F</i>	<i>p</i>	post hoc
0.18±0.18	0.24±0.26	0.22±0.01	0.34±0.01	0.36±0.01	128.7	.001	EAI<EBAI

Values are mean±standard deviation; TMT, treadmill training; SNI, sciatic nerve injury; Norm, normal; SAI, sedentary after injury; EBI, exercise before injury; EAI, exercise after injury; EBAI, exercise before and after injury; R.F.U, relative fluorescence units

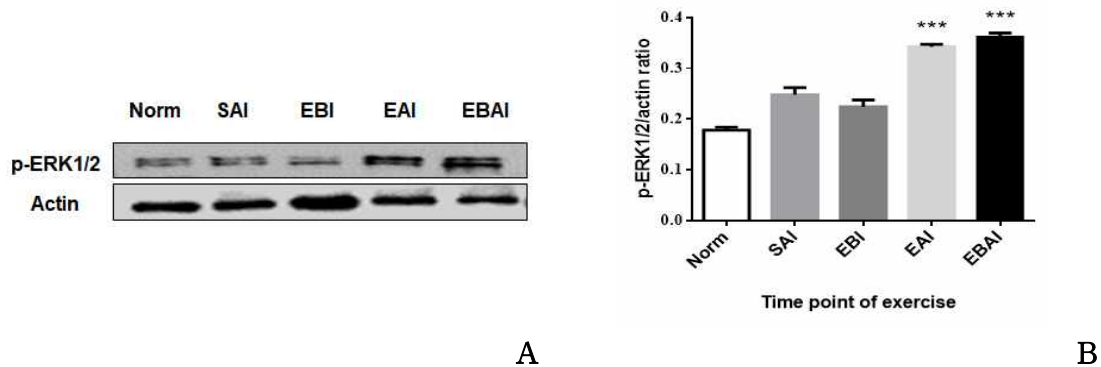


Figure 32. Expression level of p-ERK1/2 by TMT performed pre and post SNI (A) p-ERK1/2 level was significantly increased in EAI and EBAI groups. (B) The right panels show quantitative comparison of p-ERK1/2 protein level among groups. TMT, treadmill training; SNI, sciatic nerve injury; Norm, normal; SAI, sedentary after injury; EBI, exercise before injury; EAI, exercise after injury; EBAI, exercise before and after injury; *** $p < 0.001$ vs. sedentary group.

3) 좌골신경 손상 전, 후 운동 시점에 따른 p-Akt 발현 농도의 차이

p-Akt는 대표적인 성장인자인 IGF1의 하위인자로써 세포 성장에 관여하며 단백질 합성과 관련된다. 본 연구에서는 좌골 신경 손상 전, 후 트레드밀 운동 시점에 따른 p-Akt의 발현 농도의 변화를 비교 분석하기 위해 Western blot을 수행하였다. <Table 16>과 <Figure 33>에서 보는 것처럼, EBI군에서 p-Akt 발현량이 증가하였고 EBAI군에서 가장 발현량이 높았다.

Table 16. Descriptive statistics of p-Akt expression level by TMT performed pre and post SNI (unit: R.F.U)

Norm	SAI	EBI	EAI	EBAI	<i>F</i>	<i>p</i>	post hoc
0.47±0.03	0.52±0.03	0.71±0.04	0.54±0.04	1.18±0.16	41.48	.001	EBI<EBAI

Values are mean±standard deviation; TMT, treadmill training; SNI, sciatic nerve injury; Norm, normal; SAI, sedentary after injury; EBI, exercise before injury; EAI, exercise after injury; EBAI, exercise before and after injury; R.F.U, relative fluorescence units

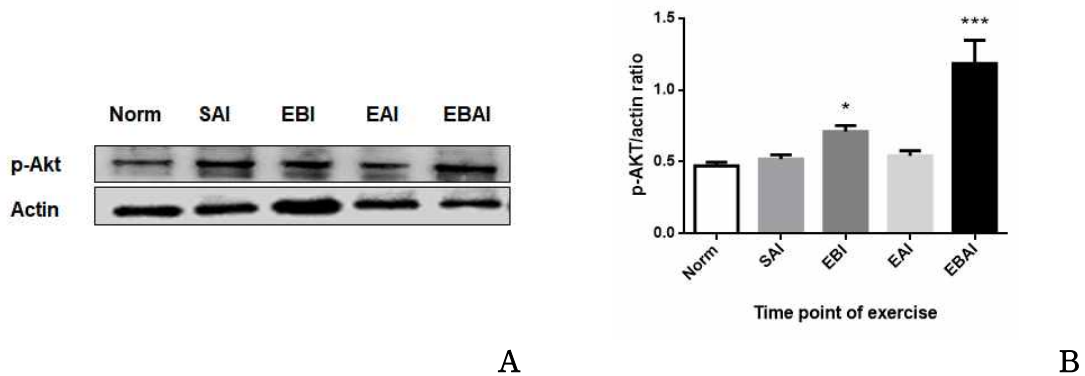


Figure 33. Expression level of p-Akt by TMT performed pre and post SNI (A) p-Akt expression level was upregulated in EBI group and was highest in EBAI group compared to those in sedentary group. (B) The right panels show quantitative comparison of p-Akt protein level among groups. TMT, treadmill training; SNI, sciatic nerve injury; Norm, normal; SAI, sedentary after injury; EBI, exercise before injury; EAI, exercise after injury; EBAI, exercise before and after injury; **p*<0.05, ****p*<0.001 vs. sedentary group.

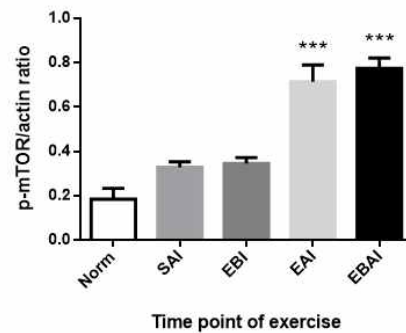
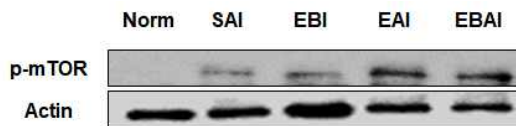
4) 좌골신경 손상 전, 후 트레드밀 운동 시점에 따른 p-mTOR의 발현 농도의 차이

mTOR는 Akt의 하위인자이며 단백질 합성 인자 발현을 촉진시키는 4E-BP1 인산화를 촉진시킨다. 본 연구에서는 좌골 신경 손상 전, 후 트레드밀 운동 시점에 따른 p-mTOR의 발현 농도의 변화를 비교 분석하기 위해서 Western blot을 수행하였다. <Table 17>과 <Figure 34>에서 보는 것처럼, EAI와 EBAI군에서 p-mTOR 발현량이 유의하게 증가하였다.

Table 17. Descriptive statistics of p-mTOR expression level by TMT performed pre and post SNI (unit: R.F.U)

Norm	SAI	EBI	EAI	EBAI	<i>F</i>	<i>p</i>	post hoc
0.18±0.05	0.33±0.02	0.35±0.03	0.71±0.08	0.77±0.05	86.09	.001	EAI<EBAI

Values are mean±standard deviation; TMT, treadmill training; SNI, sciatic nerve injury; Norm, normal; SAI, sedentary after injury; EBI, exercise before injury; EAI, exercise after injury; EBAI, exercise before and after injury; R.F.U, relative fluorescence units



A

B

Figure 34. Expression level of p-mTOR by TMT performed pre and post SNI (A) p-mTOR expression level was upregulated in EAI and EBAI groups. (B) The right panels show quantitative comparison of p-mTOR protein level among groups. SNI, sciatic nerve injury; TMT, treadmill training; Norm, normal; SAI, sedentary after injury; EBI, exercise before injury; EAI, exercise after injury; EBAI, exercise before and after injury; ****p*<0.001 vs. sedentary group

5) 좌골 신경 손상 전, 후 트레드밀 운동 시점에 따른 가자미근에서 ERK1/2 인산화의 차이

ERK1/2는 IRS 1의 발현에 의해 Ras/Raf/MEK 활성화를 유도하며 근육에서는 근 성장 억제 인자인 TSC1/2를 억제시킨다. 본 연구에서는 좌골신경 손상 전, 후 트레드밀 운동 시점에 따라 가자미근에서 ERK1/2의 인산화 축진을 비교 분석하기 위해서 Western blot을 수행하였다. <Table 18>과 <Figure 35>에서 보는 것처럼, EBI군에서 ERK1/2가 SAI군에 비해 유의하게 증가하였으며 EBAI 군에서 다른 그룹과 비교하여 ERK1/2가 뚜렷하게 증가하였다.

Table 18. Descriptive statistics of p-ERK1/2 expression level by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral soleus (unit: R.F.U)

Norm	SAI	EBI	EAI	EBAI	<i>F</i>	<i>p</i>	post hoc
0.27±0.01	1.03±0.09	1.4±0.21	0.91±0.08	4.44±0.18	430.6	.001	EBI<EBAI

Values are mean±standard deviation; TMT, treadmill training; SNI, sciatic nerve injury; Norm, normal; SAI, sedentary after injury; EBI, exercise after before injury; EAI, exercise after injury; EBAI, exercise before and after injury; R.F.U, relative fluorescence units

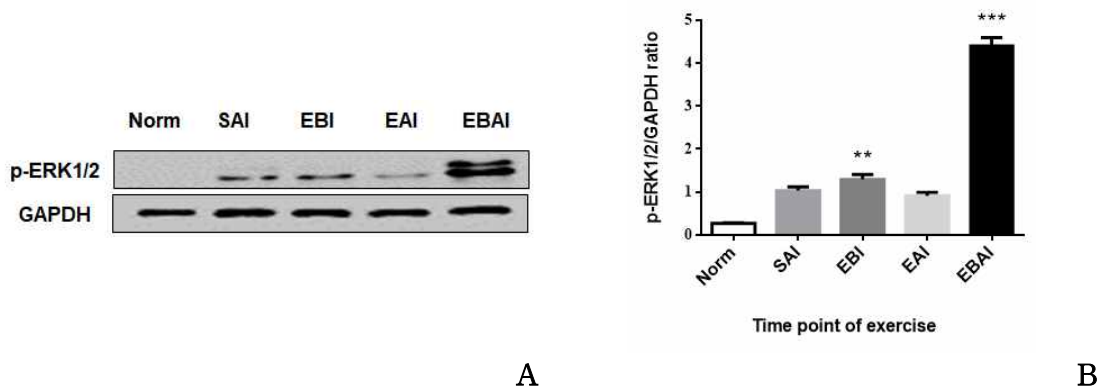


Figure 35. Expression level of p-ERK1/2 by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral soleus (A) p-ERK1/2 level was further increased in EBI group, and was significantly increased in exercise group performed pre and post injury than any other groups. GAPDH is performed as a role of loading control. (B) The right panels show quantitative result of p-ERK1/2 expression level among groups. TMT, treadmill training; SNI, sciatic nerve injury; Norm, normal; SAI, sedentary after injury; EBI, exercise after before injury; EAI, exercise after injury; EBAI, exercise before and after injury; ***p*<0.01, ****p*<0.001 vs. sedentary group

6) 좌골신경 손상 전, 후 트레드밀 운동 시점에 따른 가자미근에서 p-Akt 발현 농도의 차이

p-Akt는 대표적인 성장인자인 IGF1의 하위인자로서 세포 성장에 관여하며 단백질 합성과 관련된다. 본 연구에서는 좌골 신경 손상 전, 후 트레드밀 운동 시점에 따라 가자미근에서 p-Akt의 발현 농도를 비교 분석하기 위해 Western blot을 수행하였다. <Table 19>와 <Figure 36>에서 보는 것처럼, EBAI군이 다른 그룹군에 비해 p-Akt 발현 농도가 유의하게 증가하였다.

Table 19. Descriptive statistics of p-Akt expression level by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral soleus (unit: R.F.U)

Norm	SAI	EBI	EAI	EBAI	<i>F</i>	<i>p</i>	post hoc
2.13±0.28	3.32±0.56	3.76±0.2	4.59±0.2	6.4±0.51	34.37	.008	EBI<EBAI

Values are mean±standard deviation; TMT, treadmill training; SNI, sciatic nerve injury; Norm, normal; SAI, sedentary after injury; EBI, exercise after before injury; EAI, exercise after injury; EBAI, exercise before and after injury; R.F.U, relative fluorescence units

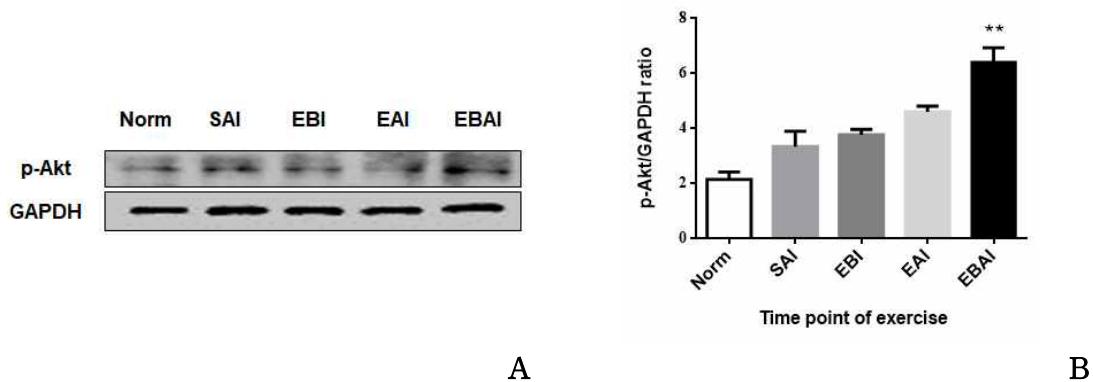


Figure 36. Expression level of p-Akt by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral soleus (A) p-Akt expression level was upregulated in EBI group and was highest in EBAI group. (B) The right panels show quantitative comparison of p-Akt protein level among groups. TMT, treadmill training; SNI, sciatic nerve injury; Norm, normal; SAI, sedentary after injury; EBI, exercise after before injury; EAI, exercise after injury; EBAI, exercise before and after injury; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. sedentary group.

7) 좌골신경 손상 전, 후 트레드밀 운동 시점에 따른 가자미근에서 p-mTOR 발현 농도의 차이

mTOR는 Akt의 하위인자이며 단백질 합성 인자 발현을 촉진시키는 4E-BP1 인산화를 촉진시킨다. 본 연구에서는 좌골 신경 손상 전, 후 트레드밀 운동 시점에 따라 가자미근에서 m-TOR 발현 농도를 비교 분석하기 위해 Western blot을 수행하였다. <Table 20>과 <Figure 37>에서 보는 것처럼, EBI와 EAI군이 다른 그룹군에 비해 p-mTOR 발현량이 유의하게 증가하였다. 또한 EBAI군에서 SAI군에 비해 유의하게 상향발현 되었다.

Table 20. Descriptive statistics of p-mTOR expression level by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral soleus (unit: R.F.U)

Norm	SAI	EBI	EAI	EBAI	F	p	post hoc
0.59±0.03	0.86±0.09	2.13±0.09	2.44±0.16	1.3±0.07	130.6	.001	EBAI<EBI<EAI

Values are mean±standard deviation; TMT, treadmill training; SNI, sciatic nerve injury; Norm, normal; SAI, sedentary after injury; EBI, exercise after before injury; EAI, exercise after injury; EBAI, exercise before and after injury; R.F.U, relative fluorescence units

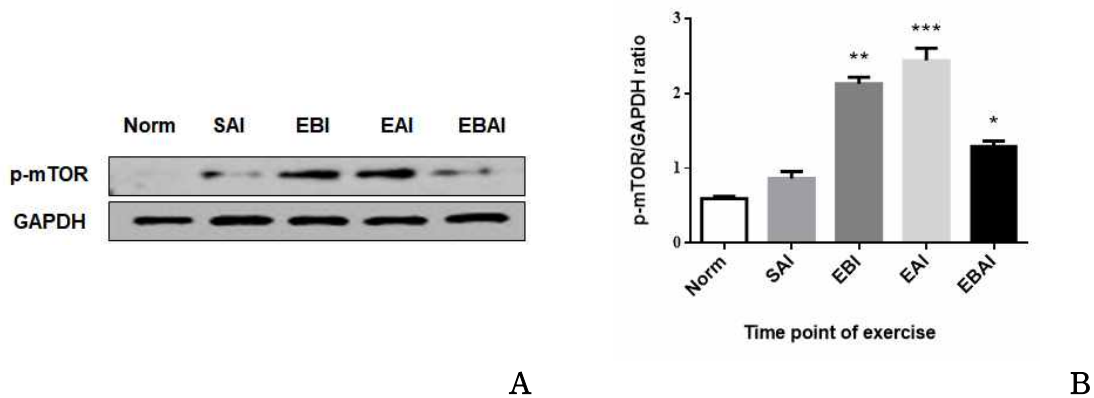


Figure 37. Expression level of p-mTOR by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral soleus (A) p-mTOR expression level was significantly upregulated in EBI and EAI groups. Also, EBAI group further increased p-mTOR protein level. (B) The lower panels show quantitative comparison of p-mTOR protein level among groups. TMT, treadmill training; SNI, sciatic nerve injury; Norm, normal; EBI, exercise before injury; EAI, exercise after injury; EBAI, exercise before and after injury; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ vs. sedentary group.

8) 좌골신경 손상 전, 후 트레드밀 운동 시점에 따른 가자미근에서 p-4E-BP1 인산화의 차이

p-4E-BP1은 단백질 합성 인자 발현을 유도하며 미토콘드리아 대사 인자인 PGC 1 α 에 의해서도 발현이 촉진된다. 본 연구에서는 좌골신경 손상 전, 후 트레드밀 운동 시점에 따른 가자미근에서 4E-BP1의 인산화의 차이를 비교 분석하기 위해 Western blot을 수행하였다. <Table 21>과 <Figure 38>에서 보는 것처럼, EAI와 EBAI군에서 p-4E-BP1의 발현농도가 다른 그룹들과 비교해 유의하게 증가하였다.

Table 21. Descriptive statistics of p-4E-BP1 expression level by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral soleus (unit: R.F.U)

Norm	SAI	EBI	EAI	EBAI	F	p	post hoc
0.12±0.01	0.1±0.01	0.11±0.02	0.15±0.01	0.21±0.01	48.23	.003	EAI<EBAI

Values are mean±standard deviation; TMT, treadmill training; SNI, sciatic nerve injury; Norm, normal; SAI, sedentary after injury; EBI, exercise after before injury; EAI, exercise after injury; EBAI, exercise before and after injury; R.F.U, relative fluorescence units

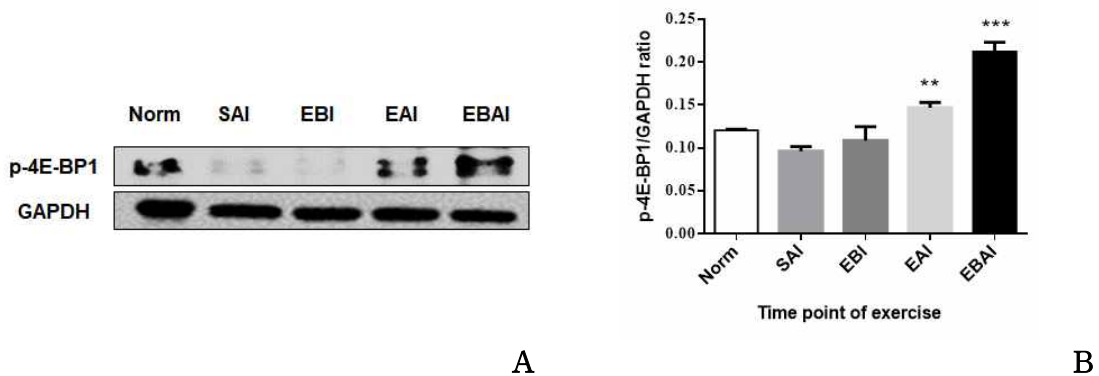


Figure 38. Expression level of p-4E-BP1 by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral soleus (A) p-4E-BP1 expression level was further upregulated in EAI group. In addition, regular treadmill exercise performed pre and post injury significantly increased p-4E-BP1 protein level. (B) The right panels show quantitative comparison of p-4E-BP1 protein levels among groups. TMT, treadmill training; SNI, sciatic nerve injury; Norm, normal; SAI, sedentary after injury; EBI, exercise after before injury; EAI, exercise after injury; EBAI, exercise before and after injury; ** p <0.01, *** p <0.001 vs. sedentary group.

9) 좌골 신경 손상 전, 후 트레드밀 운동 시점에 따라 비복근에서 ERK1/2 인산화의 차이

ERK1/2는 IRS 1의 발현을 통해 Ras/Raf/MEK 활성화를 유도하여 근육에서는 근 성장 억제 인자인 TSC1/2를 억제시킨다. 본 연구에서는 좌골신경 손상 전, 후 트레드밀 운동 시점에 따라 비복근에서 ERK1/2의 인산화를 비교 분석하기 위해 Western blot을 수행하였다. <Table 22>와 <Figure 39>에서 보는 것처럼, EBI군에서 p-ERK1/2가 SAI에 비해 유의하게 증가하였으며 EBAI군에서 다른 그룹과 비교하여 ERK1/2가 뚜렷하게 증가하였다.

Table 22. Descriptive statistics of p-ERK1/2 expression level by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral gastrocnemius (unit: R.F.U)

Norm	SAI	EBI	EAI	EBAI	F	p	post hoc
0.82±0.03	0.43±0.03	0.49±0.02	0.57±0.03	0.57±0.02	58.88	.002	EBAI<EAI<Norm

Values are mean±standard deviation; TMT, treadmill training; SNI, sciatic nerve injury; Norm, normal; SAI, sedentary after injury; EBI, exercise after before injury; EAI, exercise after injury; EBAI, exercise before and after injury; R.F.U, relative fluorescence units

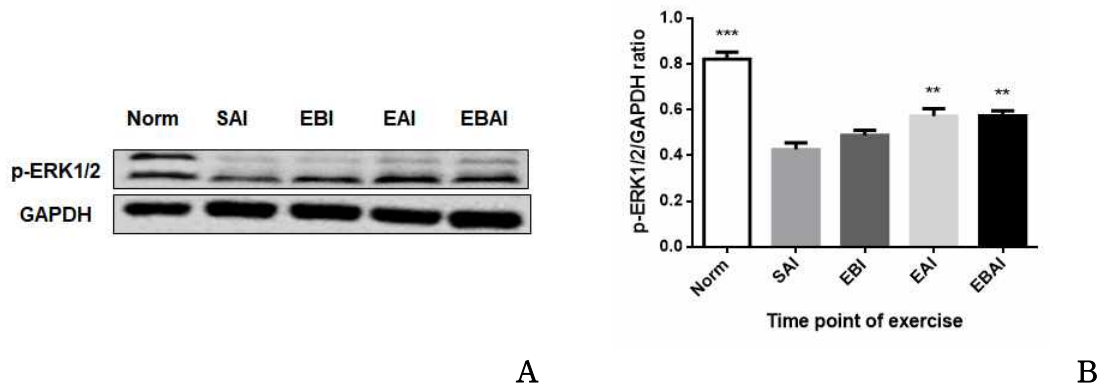


Figure 39. Expression level of p-ERK1/2 by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral gastrocnemius (A) p-ERK1/2 level was further increased in EAI and EBAI exercise group. (B) The right panels show quantitative comparison of p-ERK1/2 protein level among groups.. SNI, sciatic nerve injury; TMT, treadmill training; SNI, sciatic nerve injury; Norm, normal; SAI, sedentary after injury; EBI, exercise after before injury; EAI, exercise after injury; EBAI, exercise before and after injury; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. sedentary group.

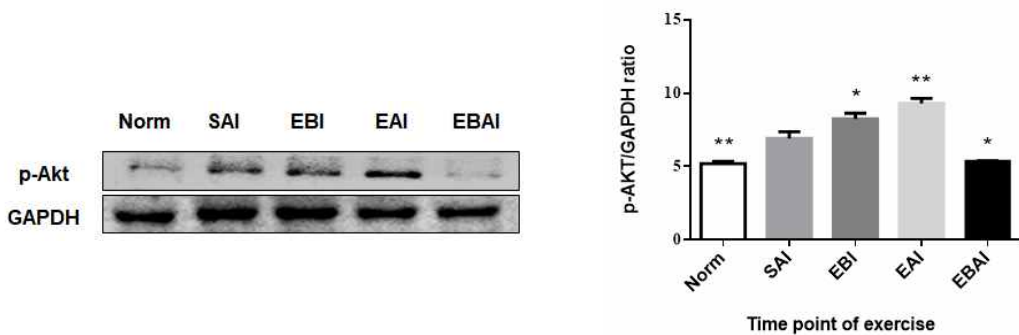
10) 좌골신경 손상 전, 후 트레드밀 운동 시점에 따른 비복근에서 p-Akt의 발현 농도의 차이

p-Akt는 대표적인 성장인자인 IGF1의 하위인자로서 세포 성장에 관여하며 단백질 합성과 관련된다. 본 연구에서는 좌골신경 전, 후 트레드밀 운동 시점에 따라 비복근에서 p-Akt의 발현 농도를 비교 분석하기 위해 Western blot을 수행하였다. <Table 23>과 <Figure 40>에서 보는 것처럼, p-Akt 단백질 발현농도는 EAI군에서 유의하게 상향발현 되었고 EBI군에서 증가하였다. 하지만 EBAI군에서 감소 현상을 보였다.

Table 23. Descriptive statistics of p-Akt expression level by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral gastrocnemius (unit: R.F.U)

Norm	SAI	EBI	EAI	EBAI	<i>F</i>	<i>p</i>	post hoc
5.19±0.17	6.92±0.45	8.24±0.39	9.31±0.33	5.64±0.34	48.54	.003	EAI<EBI<EAI

Values are mean±standard deviation; TMT, treadmill training; SNI, sciatic nerve injury; Norm, normal; SAI, sedentary after injury; EBI, exercise after before injury; EAI, exercise after injury; EBAI, exercise before and after injury; R.F.U, relative fluorescence units



A

B

Figure 40. Expression level of p-Akt by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral gastrocnemius (A) p-Akt expression level was upregulated in EBI and EAI group, but was decreased in EBAI group. (B) The right panels show quantitative comparison of p-Akt protein level among groups. TMT, treadmill training; SNI, sciatic nerve injury; Norm, normal; SAI, sedentary after injury; EBI, exercise after before injury; EAI, exercise after injury; EBAI, exercise before and after injury; **p*<0.05, ***p*<0.01 vs. sedentary group.

11) 좌골신경 손상 전, 후 트레드밀 운동 시점에 따라 비복근에서 p-mTOR 발현 농도의 차이

mTOR는 Akt의 하위인자이며 단백질 합성 인자 발현을 촉진시키는 4E-BP1 인산화를 촉진시킨다. 본 연구에서는 좌골신경 전, 후 트레드밀 운동 시점에 따라 비복근에서 p-mTOR의 발현 농도를 비교 분석하기 위해 Western blot을 수행하였다. <Table 24>와 <Figure 41>에서 보는 것처럼, p-mTOR 단백질 발현농도는 EBI군과 EBAI군에서 유의하게 상향발현 되었다. 하지만 EAI에서 SAI군에 비해 감소 현상을 보였다.

Table 24. Descriptive statistics of p-mTOR expression level by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral gastrocnemius (unit: R.F.U)

Norm	SAI	EBI	EAI	EBAI	<i>F</i>	<i>p</i>	post hoc
0.86±0.05	1.26±0.07	1.71±0.05	0.88±0.02	1.73±0.06	136.9	.001	EAI<SAI<EBI <EBAI

Values are mean±standard deviation; TMT, treadmill training; SNI, sciatic nerve injury; Norm, normal; SAI, sedentary after injury; EBI, exercise after before injury; EAI, exercise after injury; EBAI, exercise before and after injury; R.F.U, relative fluorescence units

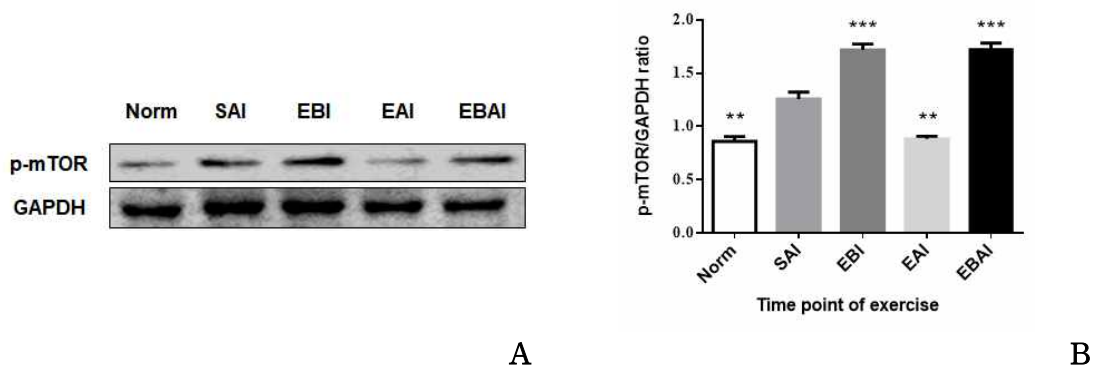


Figure 41. Expression level of p-mTOR by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral gastrocnemius (A) p-mTOR expression level was upregulated in EBI and EBAI group, but was decreased in EAI group. (B) The right panels show quantitative comparison of p-mTOR protein level among groups. TMT, treadmill training; SNI, sciatic nerve injury; Norm, normal; SAI, sedentary after injury; EBI, exercise after before injury; EAI, exercise after injury; EBAI, exercise before and after injury; ***p*<0.01, ****p*<0.001 vs. sedentary group.

12) 좌골신경 손상 전, 후 트레드밀 운동 시점에 따라 비복근에서 p-4E-BP1 발현 농도의 차이

p-4E-BP1은 단백질 합성 인자 발현을 유도하며 미토콘드리아 대사 인자인 PGC 1 α 에 의해서도 발현이 촉진된다. 본 연구에서는 좌골신경 손상 전, 후 트레드밀 운동 시점에 따라 비복근에서 p-4E-BP1 단백질의 발현 농도를 비교 분석하기 위해 Western blot을 수행하였다. <Table 25>와 <Figure 42>에서 보는 것처럼, EAI와 EBAI 그룹에서 p-4E-BP1 발현량이 유의미하게 증가하였다. 비록 앞서 두 그룹만큼의 향상에 미치지 않았지만 EBI에서도 유의한 증가를 보였다.

Table 25. Descriptive statistics of p-4E-BP1 expression level by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral gastrocnemius (unit: R.F.U)

Norm	SAI	EBI	EAI	EBAI	<i>F</i>	<i>p</i>	post hoc
4.32±0.05	2.06±0.17	2.75±0.16	3.71±0.09	5.78±0.15	94.20	.001	EBI<EAI<EBAI

Values are mean±standard deviation; TMT, treadmill training; SNI, sciatic nerve injury; Norm, normal; SAI, sedentary after injury; EBI, exercise after before injury; EAI, exercise after injury; EBAI, exercise before and after injury; R.F.U, relative fluorescence units

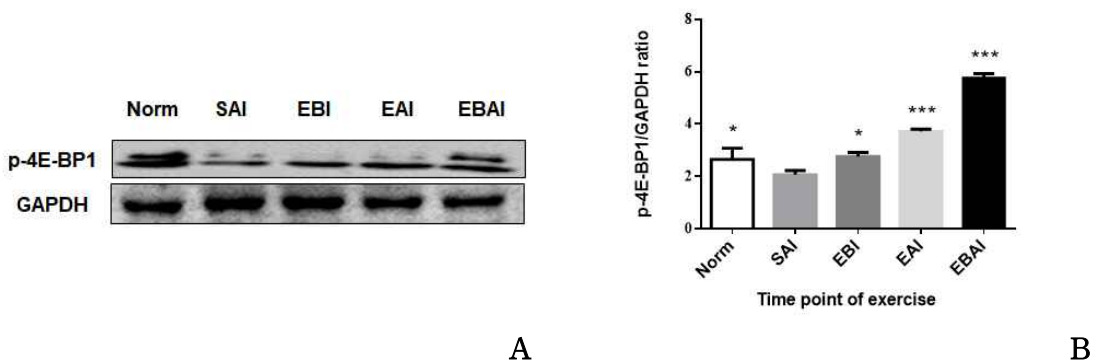


Figure 42. Expression level of p-4E-BP1 by TMT performed pre and post SNI in ipsilateral gastrocnemius (A) p-4E-BP1 expression level was significantly upregulated in EAI and EBAI groups. Also EBI group further increased expression level of p-4E-BP1. (B) The right panels show quantitative comparison of p-4E-BP1 protein levels among groups. TMT, treadmill training; SNI, sciatic nerve injury; Norm, normal; SAI, sedentary after injury; EBI, exercise after before injury; EAI, exercise after injury; EBAI, exercise before and after injury; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. sedentary group.

13) 좌골신경 손상 후, 가자미근의 지근 섬유 밀도와 위성 세포 형성에 미치는 운동의 효과

본 연구에서는 좌골신경 손상 후 지근 섬유인 가자미근에 근섬유 크기와 위성세포 밀도에 미치는 운동의 효과를 분석하기 위해 면역형광 염색법을 수행하였다. Laminin 항체는 가자미근의 근 섬유 가장자리를 염색하고 MyHC 1은 type I 섬유를 염색하는 항체이며 Hoechst는 세포의 핵을 확인하는 대표적인 물질이다. <Table 26>과 <Figure 43>에서 보는 것처럼, 운동군은 정상세포의 근 섬유 크기에 미치지 못하지만 비운동군에 비해 위성세포 핵 주위를 중심으로 근 섬유 밀도가 유의하게 증가하였다.

Table 26. Descriptive statistics of muscle fiber size in ipsilateral soleus after SNI (unit: μm)

Norm	Sedentary	Exercise	<i>F</i>	<i>p</i>	post hoc
418.17±11.55	197.13±9.73	268.44±14.05	5400	.008	Sed<Ex<Norm

Values are mean±standard deviation; SNI, sciatic nerve injury; Norm, normal; Sed, sedentary; Ex, exercise

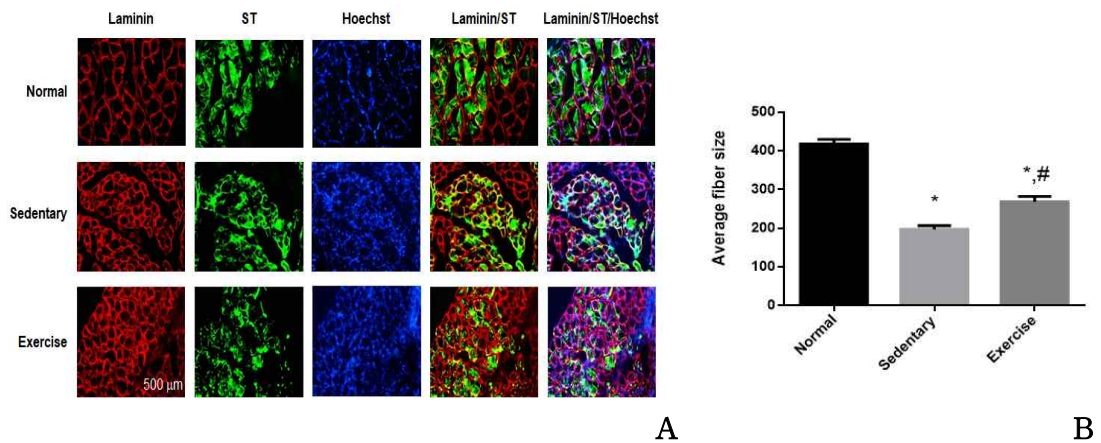


Figure 43. Immunofluorescence staining with Laminin and MyHC-1 staining in ipsilateral soleus. (A) Exercise group significantly increased muscle fiber density around satellite cell nucleus than sedentary group (B) The right panels show quantitative comparison of average muscle fiber size among three groups. ST, slow twitch muscle fiber; * $p < 0.05$ vs. normal group, # $p < 0.05$ vs sedentary group.

V. 논의

말초신경은 중추신경과 다르게 재생에 특화된 기능을 가지고 있다. 말초신경손상이 발생하면 말초신경에 대표적인 특징인 월러변성이 발생하여 축삭과 수초에 퇴행이 생기고 이로 인해 발생한 부산물들을 제거하기 위해 대식세포가 침윤한다(Gaudet et al., 2011; Stoll & Müller, 1999). 손상된 신경에서 우선적으로 신경영양인자가 방출되어 슈반세포의 증식을 촉진하고 증식된 세포의 이동과 수초화 그리고 표적근육으로의 연결 기능에 관여하는 생화학적 변화로 인해 최종적으로 기능적 회복을 가져온다(Goulart et al., 2014; Yang et al., 2008). 하지만 일련의 과정을 통해 만족할 만한 기능적 회복을 위해서는 적절한 치료적 중재가 요구되어 다양한 연구가 이루어지고 있다.

최근 선행 연구에서 저항도 트레이드밀 운동은 축삭 재생장에 불가피하게 선행되는

슈반세포 증식을 촉진시키고(English et al., 2009; Wilhelm et al., 2012), 좌골 신경 손상 후 신경 재생 표식 인자인 GAP-43 발현을 통해 축삭 재생장을 촉진시켰다고 언급하였다(Cobianchi et al., 2010; Snider et al., 2002). 또한 본 연구를 포함 많은 선행 연구에서 골격근 수축 작용을 유도하는 신체활동이 신경 손상 후 감각과 운동 신경 회복을 향상시킬 수 있음을 증명하였다(Arbat-Plana et al., 2014; Cobianchi et al., 2013; Dunlop, 2008). 구체적으로, 좌골신경 손상 후, 골격근의 수축 활동으로 인해 슈반세포의 증식을 유도하는 NGF, BDNF 그리고 GDNF와 같은 신경영양인자를 방출한다(Hsu et al., 2019; Park & Höke, 2014; Wan et al., 2010). 하지만 여전히 많은 선행 연구에서 좌골신경 손상 후 운동에 의해 야기되는 생화학적 구조 변화에 대한 정확한 인식에 제약을 보였다.

따라서 본 연구에서는 좌골신경 손상 후 규칙적인 트레이드밀 운동이 손상 초기에 ERK1/2 및 JNK 발현을 유도하여 슈반세포의 증식을 이끌어냄으로써 축삭 재생장과, 감각과 운동 신경의 기능 회복을 향상시켜 탈 신경으로 인한 표적근육의 근 위축 억제 물질 유도에 대하여 생화학적 변화를 규명해보았다.

(1) 좌골신경 손상 후, 운동이 DRG neurite outgrowth와 축삭 재생관련 단백질 발현에 미치는 효과

트레드밀 운동에 의한 GAP-43 발현은 손상된 신경의 축삭 성장에 긍정적인 영향을 미친다. 본 실험 결과에서 좌골신경 손상 후 트레드밀 운동 7일차와 14일차에 GAP-43의 유의미한 발현량은 손상된 DRG의 신경돌기 성장 축진을 유도하는 것으로 알 수 있었다. 본 실험 결과에서 제시하듯, GAP-43 발현량과 신경돌기 성장과 비례하다는 것은 운동이 그 축진제임을 시사한다. Molteni 등은(2004) 신경 손상 후 운동은 신경영양인자 및 GAP-43를 많이 함유하게 되어 신경돌기 길이의 성장을 유도한다고 보고하여 본 실험 결과를 뒷받침한다.

GAP-43의 활성화는 ERK1/2, JNK와 p38MAPK 같은 MAPKs의 발현과도 연관되어 있어 세포의 활성화는 물론 변성 세포의 사멸에도 관여하여 신경 재생에 영향을 미친다. Cañón 등에 의하면(2004) 신경 재생 과정 중, 손상 초기 ERK1/2 발현으로 세포 원형질의 CREB을 인산화 시켜 핵으로 이동, 유전자의 촉매 구간 CREs에 결합하여 신경돌기 성장과 세포 생존에 기여한다고 보고하였다. 본 연구 study I 결과에서 보듯, 좌골신경 손상 후 운동 7일차에 p-ERK1/2 강화되었고 운동 14일에 기저 수준으로 떨어졌으나 그 하위분자인 p-CREB의 발현량이 운동 7일차와 14일차에 유의하게 증가한 것을 보아 신경 손상 초기의 운동을 통한 ERK1/2 상향 발현은 그 후 발현이 떨어지더라도 전사인자인 CREB을 꾸준히 발현시켜 슈반세포증식에 지속적으로 관여함으로써 선행 연구의 결과를 뒷받침한다. 게다가 많은 연구에서 GAP-43 발현과 연관된 다른 MAPKs 인자 중 하나인 JNK가 규칙적인 트레드밀 운동을 통해 그 발현량이 증가함을 보여주었다. 여러 선행연구에서 언급하듯 손상된 신경에서 JNK의 발현은 핵에서의 전사인자인 ATF3와 c-Jun의 활성화에 축진제 역할을 한다고 보고하였으며(Blom et al., 2014; Ruff et al., 2012), 이는 GAP-43와 같은 재생관련유전자를 발현시켜 축삭 재성장에 관여하는 단백질 발현에 기여한다.

본 연구 결과에서 좌골신경 손상 후 운동이 JNK 발현을 촉진시키고 이로 인해 ATF3와 c-Jun의 발현이 증진되었다. 이는 손상 신경에 JNK 억제 인자 SP600125로 인한 JNK 유도 억제로 인하여 ATF-3와 c-Jun 하향 발현을 보여주었듯(Lindwall

et al., 2004), 이들 ATF3와 c-Jun은 JNK 발현에 의존하는 핵에서 발현되는 전사인자 인 것을 본 연구를 통해 확인하였다. 선행 연구들에 따르면, 앞서 언급된 전사인자 CREB, ATF3 그리고 c-Jun 등은 좌골신경 손상 후 재생 중인 손상 신경에서 활성화를 보인다고 보고하였다(Lindwall & Kanje, 2005; Ma & Quirion, 2001; Seiffers et al., 2006).

(2) 좌골신경 손상 후 탈신경되어 위축된 가자미근에 미치는 운동의 효과

좌골신경 손상 후 표적 근육인 가자미근의 위축은 독립 보행에 영향을 미칠 만큼 적지 않은 후유증을 초래한다. 따라서 운동을 통한 근육의 성장 인자들을 촉진하여 근 위축을 방지하려는 많은 연구가 진행되어왔다(Falduto et al., 1992; Tam et al., 2001). 특히, Akt/mTOR 신호전달체계의 활성화는 가장 대표적인 근 성장인자 중 하나이다(Bodine et al., 2001). 운동을 통한 근 수축 작용이 일어나면 근육 세포의 세포막에서 IGF1 수용기에 IGF1 영양인자가 결합되어 IRS1이 활성화되고 이는 한편에서는 Akt/mTOR인산화를 촉진시켜 단백질 합성 인자인 4E-BP1을 인산화를 이끌어 근 비대와 관련된 단백질 발현을 촉진시킨다(Schiaffino & Mammucari, 2011). 그리고 다른 한편으로는 RAS/RAF/MEK 신호전달체계를 순차적으로 활성화 시키고 이는 ERK1/2 상향 발현으로 유도하여 mTOR 발현을 억제하는 인자인 TSC1/2(tuberous sclerosis1/2)의 활성화를 억제시켜 mTOR의 역할을 다할 수 있도록 지지해준다(Miyazaki & Takemasa, 2017).

본 연구 I 결과에서는 좌골신경 손상 후 저강도 트레드밀 운동이 가자미근에서 ERK1/2 발현이 신경에서의 발현 양상과 같이 7일차에 유의하게 상향 발현되었고 14일차에 기저 수준으로 떨어졌다. 반면에 p-Akt의 발현은 운동 7일차까지는 차이를 보이지 않다가 운동 14일차에 유의미한 발현 증진을 보였다. 이는 선행연구들에서 보고하였듯, p-Akt의 다른 역할 중 근 수축 활동을 유지하기 위해 당 분해를 유도하는 GSK3 β 인산화를 위해 우선으로 작용하였고 이 후 mTOR 발현에 집중한 것으로 사료된다(Case et al., 2011; Sakamoto et al., 2004). p-Akt의 발현 양상과는 다르게 p-mTOR는 운동 7일차와 14일차 모두에서 유의미하게 상향 발현되었다. 이는 앞서 선행연구에서 언급하였듯, mTOR는 손상 초기 운동 7일차에 ERK1/2 발현이

집중되었고 이로 인해 mTOR 발현을 억제하는 TSC1/2를 하향 발현시켜 mTOR 발현 촉진에 영향을 미쳤다고 사료된다. 그리고 상향 발현된 mTOR는 하위분자인 4E-BP1을 운동 7일차와 14일차에 유의미하게 인산화를 촉진시켰다. 이는 운동을 통한 mTOR 발현이 phospho-4E-BP1을 촉진, 근 단백질 합성을 유도하여 근 비대를 가져온다는 Ogasaware & Suginoara(2018) 연구를 뒷받침한다.

연구 I의 결과를 종합해보면 좌골신경 손상 후 트레드밀 운동은 신경 재생이 이루어지는 동안에 손상된 신경에서 MAPKs를 활성화 시켜 축삭 재성장을 촉진하고 표적 근육에서의 Akt/mTOR pathway의 생화학적 변화를 통해 근 위축 억제를 시키는 것을 알 수 있었다. 그러므로 손상 받은 신경에 축삭 재성장을 촉진하기 위해서 신경 재생 동안에 수축 작용을 유도하는 신체활동은 치료적 전략으로써 중요하다.

연구 I에 대한 이해를 돕기 위해 생화학적 과정을 도식화 하였다<Figure 44>.

연구 I의 결과를 토대로 좌골신경 손상 전, 후 그리고 복합운동과 같이 시점을 달리하여 축삭 재성장을 비교 분석하고 그에 따른 유산소성 운동이 근육의 유형에 따라 조직학적, 생화학적 변화 과정에 대한 차이가 있을 것이라 판단하여 후속 연구를 지속하였다.

골격근은 저장도로 장시간동안 수축 운동에 적합한 지근 섬유와 단시간 고강도의 수축에 특화된 속근으로 나뉜다. 유산소성 운동에 있어서 에너지 대사를 위한 대표적인 대사 기관인 미토콘드리아의 밀도는 운동 능력에 중요한 요인이다. 일반적으로 지근섬유가 속근 섬유보다 2-3배의 미토콘드리아 밀도를 차지한다(Jingting et al., 2017; Osório et al., 2020). 미토콘드리아 수도 중요하지만 미토콘드리아 고유의 기능 또한 조직학적, 생화학적으로 직접적인 영향을 미친다.

장시간의 유산소성 운동은 지방산의 대사과정이 요구되는데 이때 중요한 에너지 원인 fatty acid는 세포막을 단독으로 관통하기 어렵기 때문에 carnitine-acylcarnitine translocase의 도움을 받아 이중 막의 형태를 띤 미토콘드리아의 안쪽 막으로 이동한다. 이 후 β -oxidation이 시작, Acetyl-CoA로 전환되어 TCA cycle에서 에너지 대사에 관여, 운동 능력을 결정한다(Hoppel, 1982; Violante et al., 2013). 미토콘드리아 세포 내로 정상적인 칼슘 유입은 TCA cycle을 자극시켜 ATP 생성을 촉진시키지만, 비정상적 칼슘 유입의 증가는 1.5kDa 이상의 물질은 통

과될 수 없는 촘촘한 형태의 세포막이 직경 2-3nm 크기의 구멍으로 변형된다. 이를 mPTP(mitochondrial permeability transition pore)라 하며 세포막 간 공간에 있는 물질들은 세포 외로 빠져나가 미토콘드리아의 형태를 붕괴시켜 ATP 형성을 불가능하게 하고 ROS(reactive oxygen species)를 발생시켜 세포 사멸에 이르게 된다 (Sullivan et al., 2005).

본 연구 II를 위해 좌골신경의 통제를 받는 대표적인 가자미근과 비복근을 이용하였다. 가자미근은 type I 근 섬유 유형을 보이며 비복근은 type IIa와 type IIb 근 섬유 유형을 보인다(Osório et al., 2020). 따라서 운동 시점에 따른 신경 재생 양상을 확인하고 그에 따른 가자미근과 비복근에 Akt/mTOR signaling 생화학적 변화를 비교 분석하였다.

(3) 운동 시점에 따른 신경재생 관련 단백질 발현의 차이

좌골신경 손상 전, 후에 시행된 트레드밀 운동으로 GAP-43 발현 양상을 비교해 본 결과, 좌골신경 손상 전 운동이 GAP-43 발현을 촉진, 손상 전 운동에서 유의미한 상향 발현을 보이다가 손상 전, 후 복합운동에서 발현이 떨어지는 양상을 보였다. 이는 신경 손상 후 운동이 신경 재생을 위해 필요한 유전인자 GAP-43 발현에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 보인다. 하지만 신경 손상 전, 후 규칙적인 운동은 재생 속도를 활성화시켜 정상 세포 수준으로 빠르게 회복하여 더 이상의 GAP-43 발현은 무의미 할 뿐만 아니라 오히려 재생이 지연되거나 기능적 회복에 제약이 있다는 반증일 것이다. 이는 Holahan 등의(2007) 실험결과에서 신경재생을 위해 GAP-43 발현이 필요하지만 지속적인 발현은 오히려 신경 퇴행의 결과라고 보고한 선행연구와 그 의미를 같이한다.

손상 초기 슈반세포의 성장에 영향을 미치는 ERK1/2의 발현은 축삭재성장을 촉진시킨다고 연구 I에서 언급되었듯 EAI군과 EBAI군의 유의미한 상향 발현은 슈반 세포 성장의 활성화를 의미하며 이는 축삭 재성장에 긍정적인 영향을 미치는 것임을 시사한다.

좌골신경 손상 전, 후 규칙적인 운동은 신경 가소성 관련 인자 p-Akt 발현을 촉진하였고 mTOR는 ERK1/2의 발현 양상과 비슷하게 증진하였다. 이는 많은 선행연구

에서 보여준 좌골신경 손상 후 운동 및 규칙적인 운동이 좌골신경의 재생에 영향을 미친다는 결과를 뒷받침한다(Li, et al., 2020; Wang et al., 2019; Wei et al., 2019).

(4) 유산소성 운동 시점에 따른 가자미근과 비복근에서 근 성장 발현 양상 비교

앞선 결과를 통해 좌골신경 손상 후 운동을 통한 신경 재생을 확인할 수 있었다. 따라서 그에 따른 가자미근과 비복근의 생화학적 변화 양상을 비교해보았다. 그 결과 산화적 대사작용을 요구하는 유산소성 운동은 type I 근 섬유인 가자미근에서 ERK1/2가 규칙적인 운동에 반응하여 상향 발현되었다. 또한 신경 손상 전, 후 규칙적인 운동은 serine/threonine kinase인 p-Akt 발현을 촉진하여 세포 대사, 성장 등에 작용하는 중요한 신호 전달 인자로서 작용한다는 Ziaaldini 등의(2017) 연구와 관련이 깊다. 하지만 Akt의 하위 분자인 p-mTOR의 발현이 EBI 운동군과 EAI 운동군에서는 유의하게 증가하였으나 EBAI 운동군에서 발현량이 두 그룹과 비교해 조금 감소한 것을 확인 할 수 있었다. 이는 이전 연구에서도 보고하였듯이, 유산소성 운동을 통한 산화적 대사 작용으로 인해 발현되는 AMPK(adenosine monophosphate-activated protein kinase)가 mTOR 발현 억제를 유도한 결과라고 볼 수 있다(Woo et al., 2016). mTOR의 발현의 감소에도 불구하고 하위분자인 p-4E-BP1은 EAI와 EBAI군에서 유의하게 상향 발현하였다. 4E-BP1이 mTOR의 의존적으로 발현되는 하위분자이지만 유산소성 운동을 통한 미토콘드리아 대사 기능에 중요한 인자인 PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 α) 발현 촉진을 통하여 4E-BP1이 특정 골격근의 대사에 직접 관여하기 위해 발현 유지를 이어가는 것이라 생각된다(Tsai et al., 2015).

type I 근 섬유인 가자미근과 비교하여 glycolytic fast twitch muscle type 비율이 높은 비복근에서의 단백질 발현을 살펴보면 유산소성 운동을 통한 ERK1/2 발현이 EAI와 EBAI군에서 유의하게 증가하였다. 이는 산화적 대사 작용임에도 type II 근 섬유의 성장에 관여함을 시사한다. 또한 G1에서 S로 이어지는 세포주기는 세포 증식이 이루어지는 시기이므로 그에 관여하는 ERK1/2의 발현이 촉진된다고 선행연구를 통해 보고되었다(Bertoli et al., 2013; Tapinos & Rambukkana; 2005). 이에 Norm군에서 ERK1/2의 상향발현은 세포 증식 시기에 놓여 있었다고 사료된다. 그리

고 p-Akt는 SAI군과 비교하여 EBI와 EAI군에서 유의하게 발현이 증가한데 반하여 EBAI군은 유의하게 하향 발현을 보였다. 이는 산화적 대사 작용보다 당 대사에 특화된 근 섬유에 혈관 밀도가 떨어지므로 운동 시에 저산소증을 유발하여 에너지 대사에 문제가 발생, 우선적으로 에너지를 자급하기 위해 p-Akt는 GSK3 β 를 인산화하는데 집중하였다고 볼 수 있다(Robey & Hay, 2009). Kakihata 등에 의하면(2016) type II 근 섬유 유형은 신경 손상 후 운동 경력이 없는 상태에서 갑작스런 운동은 ROS의 발현과 허혈성 손상으로 인해 세포에 손상을 입을 수 있다고 하였다. 그러한 이유로 mTOR 발현은 SAI군과 비교하여 EBI군에서 유의미하게 상향 발현한데 반해 EAI군에서 유의미하게 감소한 결과를 가져왔다고 볼 수 있다. 하지만 EBAI에서 mTOR 발현 증가는 규칙적인 운동은 type II 근 섬유에 미토콘드리아 동원력과 혈액 공급에 긍정적인 영향을 미쳐 mTOR 발현을 증가시켰다고 볼 수 있다. 게다가, p-4E-BP1은 EBI군, EAI군과 EBAI군에서 발현이 촉진되었다. 이는 앞서 언급한 미토콘드리아 대사 인자 PGC1 α 발현 여파인 것으로 생각된다. 앞선 결과를 통해 가자미근의 산화적 대사 작용은 비복근에 비해 뛰어남을 시사한다. 그러므로 유산소성 운동을 통한 근 성장 인자의 촉진은 가자미근이 비복근에 비해 훨씬 큰 영향을 받을 것이다. 본 연구에서는 운동군이 비운동군에 비해 손상쪽 가자미근의 근 섬유의 크기가 위성세포의 핵을 중심으로 유의하게 증가하였다. 선행연구에서 근 섬유 크기의 증가는 미토콘드리아의 대사 증가로 인한 ATP 생성 능력의 향상과 혈관 밀도의 증가로 인한 혈액 공급의 촉진으로 단백질 합성을 유리하게 하여 근 비대를 가져온다고 하였다. 이러한 대사과정을 통한 조직학적 변화는 산화 능력이 좋은 근 섬유가 훨씬 뛰어나다고 보고하여 본 연구 결과를 지지한다(Wessel et al., 2010).

연구 II 결과를 보면 유산소성 운동 시점에 따라 비복근과 가자미근의 단백질 발현 양상에 차이를 보였다. 특히 비복근이 가자미근에 비해 미토콘드리아 밀도가 떨어지기 때문에 산화적 대사 능력을 요구하는 유산소성 운동이 이루어지는 동안 에너지 대사를 위한 p-Akt의 역할이 필요하며 혈관 밀도가 떨어져 저산소증을 야기할 수 있어 세포 손상에 노출되고 이는 세포 성장 인자 mTOR의 발현을 떨어뜨릴 수 있다. 또한 가자미근과 다르게 비복근에서 p-4E-BP1이 손상 전 운동군을 포함해 모든 운동군에 발현이 증가하는 이유는 미토콘드리아 밀도가 떨어지므로 그 발생을 유지해야 하기 때문이라고 생각된다. 게다가 유산소성 운동은 type I 근 섬유의 크

기를 증가시켜 미토콘드리아와 혈관 재생의 촉진을 유도, 산화적 대사 작용의 능력을 증가시켜 운동 수행 능력 또한 향상된다. 그러나 결과적으로 규칙적인 유산소성 운동은 type II 근 섬유질의 미토콘드리아 대사 능력을 증진시켜 산화적 스트레스를 경감시켜 주었다.

이러한 생화학적 연구 결과를 바탕으로 신경 손상 후 운동을 통한 type I 근 섬유의 조직학적 변화를 살펴본 결과, 산화적 대사 근육의 대표적인 가자미근의 근 섬유 밀도가 증가, 산화적 대사능력 및 혈관 밀집도의 상승으로 근 위축 억제를 유도한다는 Wessel 등의(2010) 연구 결과를 지지한다.

본 연구 II를 통해서 근 섬유의 유형에 따라 운동 형태와 운동 시점이 달리 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다. 그러므로 신경 손상으로 인해 발생하는 근 위축 시, 근 섬유 유형을 파악하여 운동 형태를 결정하는 것은 중요하다. 더욱이 본 연구를 통해서 규칙적인 운동이 신경 손상 후 조직학적, 생화학적 악화를 최소화 할 수 있는 가장 합리적인 치료 전략임을 알 수 있다.

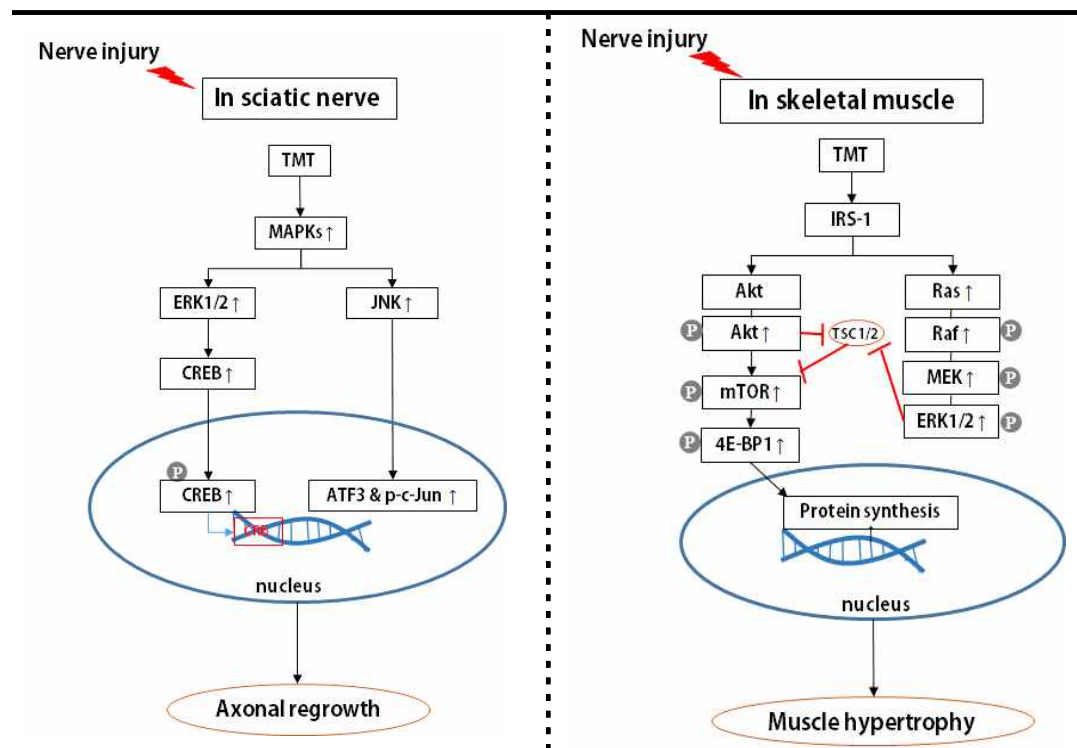


Figure 44. Schematic presentation of effect of treadmill exercise on axonal regrowth and muscle hypertrophy after sciatic nerve injury.

VI. 결론 및 제언

1. 결론

본 연구는 트레드밀 운동이 Akt/mTOR 신호전달체계를 유도하여 좌골신경 손상으로 인한 표적근육의 근 위축을 억제하는데 미치는 영향을 분석하기 위해 실시하였다. 이에 따라 연구 I에서는 좌골신경 손상 후 트레드밀 운동을 통한 그룹 간 축삭 재생장 유무를 확인한 후 표적근육의 Akt/mTOR 신호전달체계 활성 여부를 비교 분석하였고, 연구 II는 신경 손상 전, 후 그리고 복합적으로 좀 더 다양한 운동 시점을 설계하여 근 위축 억제 인자 발현 유무를 확인하였고 또한 트레드밀 운동이 근섬유 유형에 따른 성장인자의 축진을 비교 분석하였다.

우선적으로 좌골신경 손상 후 운동이 신경 재생에 미치는 영향을 확인하기 위해 DRG에서의 neurite outgrowth 길이 변화 그리고 신경재생 표식인자인 GAP-43의 발현 양상과 축삭 재생과의 연관성을 확인하기 위해 면역형광염색법을 이용하여 분석하였다. 또한 표적근육에서의 근 성장인자를 비교 분석하기 위해 Western blot analysis을 이용해 각 변인을 산출하였다. Graphpad prism version 6(GraphPad, USA)를 이용하여 연구 I과 연구 II에서 산출된 변인 간 일원변량 분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였다.

실험 결과를 분석한 후, 다음과 같은 결론을 얻었다.

연구 I: 축삭 재생장과 근 성장인자 축진

좌골신경 손상 후 트레드밀 운동으로 인해 GAP-43 발현 축진으로 재생에 중요한 신경돌기 성장을 확인할 수 있었다. 재생 초기 MAPKs의 활성화로 인해 ERK1/2와 JNK가 상향발현 되어 전사인자 p-CREB, ATF3 그리고 p-c-Jun의 축진되어 축삭 재생장에 긍정적인 영향을 미쳤다.

또한 근육에서는 운동이 IRS-1의 하위분자인 Akt와 p-ERK1/2 촉진으로 인해 p-mTOR와 p-4E-BP1의 상향발현을 유도하여 단백질 합성에 관여, 근 비대에 유의한 영향을 미쳤다.

연구 II: 축삭재성장, 가자미근과 비복근에서 근 성장인자 촉진

좌골신경 손상 전, 후 규칙적인 운동이 GAP-43, ERK1/2, Akt, mTOR와 같은 축삭 재성장 관련 인자들의 상향 발현을 유도, 신경 재생에 긍정적인 결과를 가져왔다.

산화적 대사과정인 유산소성 운동은 근 섬유 크기 촉진을 유도, 미토콘드리아 동원력과 혈관 밀집도를 증진시켜 근 비대를 유도하지만 산화적 대사 유형인 가자미근(type I)과 당 대사 유형인 비복근(type II)의 근 성장인자가 운동 시점에 따라 다르게 발현되었다. 하지만 결과적으로 규칙적인 운동이 근 비대 성장인자를 촉진시켰다.

2. 제 언

인체의 골격근은 대략 640개 이상이며, 체내 단백질의 50-75%가 골격근과 연관되어 있다. 그러므로 말초신경손상으로 인한 표적근육의 위축은 일상생활에서 기능적 부재를 야기한다. 따라서 말초신경손상 후 축삭재성장과 표적근육의 위축 억제제를 위한 치료적 중재가 활발하게 이루어지고 있다. 그 중 신경 손상 후 재생에 선행되어야 할 신경영양인자 발현을 촉진할 수 있는 근 수축 활동에 대한 연구가 활발하게 이루어져야 하겠다.

특히 유산소성 운동이 성장인자 발현과 대조되는 위축인자 단백질에 미치는 영향을 비교 분석할 필요성이 요구된다. 또한 근 섬유 유형에 따른 운동 형태, 운동 시점 및 운동 기간 등 다양한 접근을 통해 신경손상 후 근 위축을 억제할 수 있는 체계적인 운동 프로그램 개발이 이루어지길 제언한다.

<Abstract>

Effect of regular exercise on axonal regrowth, and soleus and gastrocnemius hypertrophy

Ji-Eun, Kim

Department of Kinesiology

General graduate school of Jeju National University

Jeju, Korea

(Supervised by professor Young-Pyo, Kim)

The purpose of the study was to identify the effect of regular exercise on axonal regrowth, soleus and gastrocnemius hypertrophy via inducing Akt/mTOR signaling pathway (study I: axonal regrowth and muscle hypertrophy proteins activation, study II: differences of axonal regrowth and muscle hypertrophy between muscle types by time point of exercise.) The experiment animals recruited in study I and study II were divided into 3 groups and 5 groups that is, the experimental groups were classified into control (n=10), sedentary 7 days (n=10) and 14 days (n=10) after SNI, and by exercise for 7 days (n=10) and 14 days (n=10) after SNI of study I respectively. Also study II was classified into normal group (Norm, n=10),

sedentary after SNI (SAI, n=10), exercise before SNI (EBI, n=10), exercise after SNI (EAI, n=10), exercise before & after SNI (EBAI, n=10) respectively. The rats in exercise group were forced to run on treadmill device (study I: 8m/min, study II: 15m/min) for 20min once a day for 2 weeks. Identification of GAP-43 expression level and DRG neurite outgrowth length around nucleus, and muscle fiber size in ipsilateral soleus were analyzed by immunofluorescence method. Also, expression level of proteins for axonal regrowth and muscle hypertrophy was analyzed with a Western blot.

The results obtained in this study were as follows;

Study I: axonal regrowth and muscle hypertrophy activation

1) Axonal regrowth

- ① Neurite outgrowth length around nuclei in DRG showed more significant differences in exercise than sedentary group.
- ② Expression level of GAP-43 showed significant difference in injured sciatic nerve of exercise than sedentary group.
- ③ Axonal regrowth involved GAP-43 expression showed significant increase at nerve distal to damaged site in exercise when compared to that in sedentary group.
- ④ Expression level of ERK1/2 in exercise group showed significant difference at an early stage of regeneration after nerve injury.
- ⑤ Expression level of CREB in exercise group showed significant difference at an early stage of regeneration after nerve injury.
- ⑥ Expression level of ATF3 and c-Jun as transcription factors in exercise group showed significant difference at an early stage of regeneration after nerve injury.

2) Activation of muscle hypertrophy

- ① Expression level of ERK1/2 showed significant difference in ipsilateral soleus of exercise than that of sedentary group.
- ② Expression level of Akt showed significant difference in ipsilateral soleus of exercise than that of sedentary group.
- ③ Expression level of mTOR showed significant difference in ipsilateral soleus of exercise than that of sedentary group.
- ④ Phosphorylation level of 4E-BP1 showed significant difference in ipsilateral soleus of exercise than that of sedentary group.

Study II: axonal regrowth and muscle hypertrophy between soleus and gastrocnemius

1) Axonal regrowth

- ① Expression level of GAP-43 showed significant differences by time point of exercise at pre and post sciatic nerve injury.
- ② Expression level of ERK1/2 showed significant differences by time point of exercise at pre and post sciatic nerve injury.
- ③ Expression level of Akt showed significant differences by time point of exercise at pre and post sciatic nerve injury.
- ④ Expression level of mTOR showed significant differences by time point of exercise at pre and post sciatic nerve injury.

2) Activation of muscle hypertrophy in type I muscle

- ① Expression level of ERK1/2 by time point of exercise at pre and post SNI showed significant difference in ipsilateral soleus.
- ② Expression level of Akt by time point of exercise at pre and post SNI showed significant difference in ipsilateral soleus.
- ③ Expression level of mTOR by time point of exercise at pre and post SNI showed significant difference in ipsilateral soleus.

- ④ Expression level of 4E-BP1 by time point of exercise at pre and post SNI showed significant differences in ipsilateral soleus.

3) Activation of muscle hypertrophy in type II muscle

- ① Expression level of ERK1/2 by time point of exercise at pre and post SNI showed significant difference in ipsilateral gastrocnemius.
- ② Expression level of Akt by time point of exercise at pre and post SNI showed significant difference in ipsilateral gastrocnemius.
- ③ Expression level of mTOR by time point of exercise at pre and post SNI showed significant difference in ipsilateral gastrocnemius.
- ④ Expression level of 4E-BP1 by time point of exercise at pre and post SNI showed significant difference in ipsilateral gastrocnemius.

4) Differences in activation of muscle hypertrophy between type I and type II muscles

- ① ERK1/2 expression showed significant difference between type I and type II muscles.
- ② Akt expression showed significant difference between type I and type II muscles.
- ③ mTOR expression showed significant difference between type I and type II muscles.
- ④ p-4E-BP1 expression showed significant difference between type I and type II muscles.

참고문헌

- Agbas, A., & Moskovitz, J. (2009). The role of methionine oxidation/reduction in the regulation of immune response. *Curr Signal Transduct Ther*, 4(1), 46-50.
- Allodi, I., Udina, E., & Navarro, X. (2012). Specificity of peripheral nerve regeneration: Interactions at the axon level. *Prog Neurobiol*, 98(1), 16-37.
- Arata, T. (2020). Myosin and other energy-transducing ATPases: structural dynamics studied by electron paramagnetic resonance. *Int Mol Sci*, 21(2), 672.
- Arbat-Plana, A., Torres-Espin, A., Navarro, X., & Udina, E. (2014). Activity dependent therapies modulate the spinal changes that motoneurons suffer after a peripheral nerve injury. *Exp Neurol*, 263, 293-305.
- Armada-da-Silva, P.A., Pereira, C., & Veloso, A.P. (2013). Role of physical exercise for improving posttraumatic nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol*, 109, 125-149.
- Barclay, R.D., Burd, N.A., Tyler, C., Tillin, N.A., & Mackenzie, R.W. (2019). The role of the IGF-1 signaling cascade in muscle protein synthesis and anabolic resistance in ageing skeletal muscle. *Front Nutr*, 146(6), 1-9.
- Bertoli, C., Skotheim, J.M., & Bruin, R.A.M. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(8), 518-528.
- Blom, C.L., Mårtensson, L.B., & Dahlin, L.B. (2014). Nerve injury-induced c-Jun activation in Schwann cells is JNK independent. *Biomed Res Int*, 2014, 392971.
- Bodine, S.C., & Baehr, L.M. (2014). Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*,

307(6), 469-484.

- Bodine, S.C., Stitt, T.N., Gonzalez, M., Kline, W.O., Stover, G.L., Bauerlein, R., Zlotchenko, E., Scrimgeour, A., Lawrence, J.C., Glass, D.J., & Yancopoulos, G.D. (2001). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol*, 3(11), 1014-1019.
- Boerboom, A., Dion, V., Chariot, A., & Franzen, R. (2017). Molecular mechanisms involved in Schwann cell plasticity. *Front Mol Neurosci*, 38(10), 1-18.
- Bonaldo, P., & Sandri, M. (2013). Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech*, 6(1), 25-39.
- Bourdeau, J.I., Sephton, C.F., & Dutchak, P.A. (2018). Metabolic networks influencing skeletal muscle fiber composition. *Front Cell Dev Biol*, 6, 125.
- Boyd, M.T., & Vlatkovic, N. (2016). p53: a molecular marker for the detection of cancer. *Expert Opin Med Diagn*, 2(9), 1013-1024.
- Boyer, J.G., Prasad, V., Song, T., Lee, D., Fu, X., Grimes, K.M., Sargent, M.A., Sadayappan, S., & Molkenin, J.D. (2019). ERK1/2 signaling induces skeletal muscle slow fiber-type switching and reduces muscular dystrophy disease severity. *JCI Insight*, 4(10), e127356.
- Cañón, E., Cosgaya, J. M., Scsucova, S., & Aranda, A. (2004). Rapid effects of retinoic acid on CREB and ERK phosphorylation in neuronal cells. *Mol Biol Cell*, 15(12), 5583-5592.
- Cantó, C., & Auwerx, J. (2009). PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol*, 20(2), 98-105.
- Carroll, S.L. (2017). The molecular and morphologic structures saltatory conduction possible in peripheral nerve. *J Neuropathol Exp Neurol*, 76(4), 255-257.
- Case, N., Thomas, J., Sen, B., Styner, M., Xie, Z., Galior, K., & Rubin, J. (2011). Mechanical regulation of glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) in

- mesenchymal stem cells is dependent on Akt protein serine 473 phosphorylation via mTORC2 protein. *J Biol Chem*, 286(45), 39450–39456.
- Ceci, M.L., Mardones–Krsulovic, C., Sanchez, M., Valdivia, L.E., & Allende, M.L. (2014). Axon–Schwann cell interactions during peripheral nerve regeneration in zebrafish larvae. *Neural Dev*, 9(22), 1–21.
- Cobianchi, S., Casals–Diaz, L., Jaramillo, J., & Navarro, X. (2013). Differential effects of activity dependent treatments on axonal regeneration and neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Exp Neurol*, 240, 157–167.
- Cobianchi, S., Marinelli, S., Florenzano, F., Pavone, F., & Luvisetto, S. (2010). Short-but not long lasting treadmill running reduces allodynia and improves functional recovery after peripheral nerve injury. *Neuroscience*, 168(1), 273–287.
- Curtis, R., Stewart, H.J.S., Hall, S.M., Wilkin, G.P., & Mirsky, R. (1992). Gap-43 is expressed by nonmyelin forming Schwann cells of the peripheral nervous system. *J Cell Biol*, 116(6), 1455–1464.
- Dunlop, S.A. (2008). Activity-dependent plasticity: implications for recovery after spinal cord injury. *Trends Neurosci*, 31(8), 410–418.
- English, A.W., Cucoranu, D., Mulligan, A., & Sabatier, M. (2009). Treadmill training enhances axon regeneration in injured mouse peripheral nerves without increased loss of topographic specificity. *J Comp Neurol*, 517(2), 245–255.
- English, A.W., Willhelm, J.C., & Patricia, P.J. (2014). Exercise, nerotrophins and Axon regeneration in the PNS. *Physiology(Bethesda)*, 29(6), 437–445.
- Fagoie, N.D, Attwell, C.L., Kouwenhoven, D., Verhaagen, J., & Mason, M.R. (2015). Overexpression of ATF3 or the combination of ATF3, c-Jun, STAT3 and Smad1 promotes regeneration of the central axon branch of sensory neurons but without synergistic effects. *Hum Mol Genet*, 24(23), 6788–6800.
- Falduto, M.T., Young, A.P., & Hickson, R.C. (1992). Exercise inhibits

- glucocorticoid-induced glutamine synthetase expression in red skeletal muscles. *Am J Physiol*, 262(1), 214-220.
- Fanxing, Z., Zhao, H., & Liao, J. (2017). Androgen interacts with exercise through the mTOR pathway to induce skeletal muscle hypertrophy. *Biol Sport*, 34(4), 313-321.
- Ferraro, E., Giammarioli, A.M., Chiandotto, S., Spoletini, I., & Rosano, G. (2014). Exercise-induced skeletal muscle remodeling and metabolic adaptation: redox signaling and role of autophagy. *Antioxid Redox Signal*, 21(1), 154-76.
- Fitts, R.H., & Widrick, J.J. (1996). Muscle mechanics: adaptations with exercise-training. *Exerc Sport Sci Rev*, 24, 427-473.
- Fitzgerald, M.F., & McKelvey, M. (2016). Nerve injury and neuropathic pain-A question of age. *Exp Neurol*, 275, 296-302.
- Franzini-Armstrong, C. (1999). The sarcoplasmic reticulum and the control of muscle contraction. *FASEB J* 2, 266-270.
- Frontera, W.R., & Ochala, J. (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int*, 96(3), 183-195.
- Gaudet, A.D., Popovich, P.G., & Ramer, M.S. (2011). Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation*, 8, 110.
- George, R., & Griffin J.W. (1994). Delayed macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration in the central nervous system: The dorsal radicotomy model. *Exp Neurol*, 129(2), 225-236.
- Gey, M., Wanner, R., Schilling, C., Pedro, M.T., Sinske, D., & Knöll, B. (2016). ATF3 mutant mice show reduced axon regeneration and impaired regeneration-associated gene induction after peripheral nerve injury. *Open Biol*, 6(8), 160091.
- Glass, D.J. (2003). Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(10), 1974-1984.
- Gomez-Sanchez, J.A., Pilch, K.S., Lans, M., Fazal, S.V., Benito, C., Wagstaff, L.J.,

- Mirsky, R., & Jessen, K.R. (2017). After nerve injury, lineage tracing shows that myelin and remak Schwann cells elongate extensively and branch to form repair Schwann cells, which shorten radically on remyelination. *J Neurosci*, 37(37), 9086-9099.
- Gordon, T. (2016). Nerve regeneration in the peripheral and central nervous system. *J Physiol*, 594(13), 3517-3520.
- Gordon, T. (2009). The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. *Neurosurg Focus*, 26(2), E3.
- Goulart, C.O., Jürgensen, S., Souto, A., Oliveira, J.T., Lima, S., Tonda-turo, C., Marques, S.A., Almeida, F.M., & Martinez, A.M.B. (2014). A combination of Schwann cell grafts and aerobic exercise enhances Sciatic nerve regeneration. *PLoS One*, 9(10), e110090.
- Han, G.H., Peng, J., Liu, P., Ding, X., Wei, S., Lu, S., & Wang, Y. (2019). Therapeutic strategies for peripheral nerve injury: decellularized nerve conduits and Schwann cell transplantation. *Neural Regen Res*, 14(8), 1343-1351.
- Hausott, B., & Klimaschewski, L. (2019). Promotion of peripheral nerve regeneration by stimulation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway. *Anat Rec(Hoboken)*, 302(8), 1261-1267.
- He, Z., & Jin, Y. (2016). Intrinsic control of axon regeneration. *Neuron*, 90(3), 437-451.
- Holahan, M. R., Honegger, K. S., Tabatadze, N., & Routtenberg, A. (2007). Gap-43 gene expression regulates information storage. *Learn Mem*, 14(6), 407-415.
- Hoppel, C.L. (1982). Carnitine and carnitine palmitoyltransferase in fatty acid oxidation and ketosis. *Fed Proc*, 41(12), 2853-2857.
- Hsu, M.N., Liao, H.T., Truong, V.A., Huang, K.L., Yu, F.J., Chen, H.H., Nguyen, T.K.N., Makarevich, P., Parfyonova, Y., & Hu, Y.C. (2019). CRISPR-based activation of endogenous neurotrophic genes in adipose stem cell sheets to

- stimulate peripheral nerve regeneration. *Theranostics*, 9(21), 6099–6111.
- Huang, E.J., & Reichardt, L.F. (2001). Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. *Ann Rev Neurosci*, 24, 677–736.
- Huebner, E.A., & Strittmatter, S.M. (2009). Axon regeneration in the peripheral and central nervous systems. *Results Probl Cell Differ*, 48, 339–351.
- Hur, E.M., Saijilafu., & Zhou, F.Q. (2012). Growing the growth cone: Remodeling the cytoskeleton to promote axon regeneration. *Trends Neurosci*, 35(3), 164–174.
- Ito, N., Ruegg, U.T., & Takeda, S. (2018). ATP-induced increase in intracellular calcium levels and subsequent activation of mTOR as regulators of skeletal muscle hypertrophy. *Int J Mol Sci*, 19(9), 2804–2817.
- Jessen, K.R., & Farraj, P.A. (2018). Repair Schwann cell update: Adaptive reprogramming, EMT, and stemness in regenerating nerves. *Glia*, 67(3), 421–437.
- Jessen, K.R., & Mirsky R. (2016). The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *J Physiol*, 594(13), 3521–3531.
- Jin, Y., Sui, H.J., Dong, Y., Ding, Q., Qu, W.H., Yu S.X., & Jin Y.X. (2012). Atorvastatin enhances neurite outgrowth in cortical neuro in vitro via up-regulating the Akt/mTOR and Akt/GSK-3 β signaling pathways. *Acta pharmacol Sin*, 33(7), 861–872.
- Jingting, S., Qin X., Yanju, S., Ming, Z., Yunjie, T., Gaige, J., Zhongwei, S., & Jianmin, Z. (2017). Oxidative and glycolytic skeletal muscles show marked differences in gene expression profile in Chinese Qingyuan partiridge chickens. *PLoS One*, 12(8), e0183118.
- Kakahata, C.M.M., Malanotte, J.A., Karvat, J., Brancalhão, R.M.C., Ribeiro, L.F.C., & Bertolini, G.R.F. (2016). The morphological and functional effects of exercise in the aquatic environment, performed before and/or after sciatic nerve compression in Wistar rats. *J Exercise Rehabil*, 12(5), 393–400.
- Karatzafiri, C., Adamek, N., & Geeves, M.A. (2017). Modulators of actin-myosin

- dissociation: basis for muscle type functional differences during fatigue. *Am J Physiol Cell Physiol*, 313(6), C644-C654.
- Kim, H.J., & Lee, W.J. (2017). Low-intensity aerobic exercise training: inhibition of skeletal muscle atrophy in high-fat-diet-induced ovariectomized rats. *J Exerc Nutrition Biochem*, 21(3), 19-25
- Kim, J.E., Cho, Y.H., & Seo, T.B. (2020). Treadmill exercise activates ATF3 and ERK1/2 downstream molecules to facilitate axonal regrowth after sciatic nerve injury. *J Exerc Rehabil*, 16(2), 141-147.
- Knott, E.P., Assi, M., & Pearce, D.D. (2014). Cyclic AMP signaling: A molecular determinant of peripheral nerve regeneration. *Biomed Res Int*, 2014, 651625-651631
- Konopka, A.R., Douglass, M.D., Kaminsky, L.A., Jemiolo, B., Trappe, S.T., & Harber, M.P. (2010). Molecular adaptations to aerobic exercise training in skeletal muscle of older women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 65(11), 1201-1207.
- Konopka, A.R., & Harber, M.P. (2014). Skeletal muscle hypertrophy after aerobic exercise training. *Exerc Sport Sci Rev*, 42(2), 53-61.
- Kunihiro, S., & Akihiko, Y. (2011). The recent understanding of the neurotrophin's role in skeletal muscle adaptation. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 201696.
- Langer, H.T., Senden, J.M.G., Gijsen, A.P., Kampa, S., Van Loon, L.J.C., & Spuler, S. (2018). Muscle atrophy due to nerve damage is accompanied by elevated myofibrillar protein synthesis rates. *Front Physiol*, 12(9), 1-10.
- Lever, M.B., Karpova, A., & Kreutz, M.R. (2015). An importin code in neuronal transport from synapse-to-nucleus? *Front Mol Neurosci*, 33(5), 1-5.
- Lewitt, M.S., & Boyd, G.W. (2019). The role of insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding proteins in the nervous system. *Biochem Insights*, 12, 1-18.
- Li, R., Li, D.H., Zhang, H.Y., Wang, J., Li, X.K., & Xiao, J. (2020). Growth

- factors-based therapeutic strategies and their underlying signaling mechanisms for peripheral nerve regeneration. *Acta Pharmacol Sin*, 0, 1-12.
- Lieber, R.L., Roberts, T.J., Blemker, S.S., Lee, S.S.M., & Herzog, W. (2017). Skeletal muscle mechanics, energetics and plasticity. *J Neuroeng Rehabil*, 14(1), 108.
- Lindwall, C., Dahlin, L., Lundborg, G., & Kanje, M. (2004). Inhibition of c-Jun phosphorylation reduces axonal outgrowth of adult rat nodose ganglia and dorsal root ganglia sensory neurons. *Mol Cell Neurosci*, 27(3), 267-279.
- Lindwall, C., & Kanje, M. (2005). Retrograde axonal transport of JNK signaling molecules influence injury induced nuclear changes in p-c-Jun and ATF3 in adult rat sensory neurons. *Mol Cell Neurosci*, 29(2), 269-282.
- Liu, B., Xin, W., Tan, J.R., Zhu, R.P., Li, T., Wang, D., Kan, S.S., Xiong, D.K., Li, H.H., Zhang, M.M., Sun, H.H., Wagstaff, W., Zhou, C., Wang, Z.J., Zhang, Y. G., & He, T.C. (2019). Myelin sheath structure and regeneration in peripheral nerve injury repair. *Proc Natl Acad Sci USA*, 116(44), 22347-22352.
- Maltzahn, J.V., Bentzinger, C.F., & Rudnicki, M.A. (2012). Wnta/Fzd7 signalling directly activates the Akt/mTOR anabolic growth pathway in skeletal muscle. *Nat Cell Biol*, 14(2), 186-191.
- Ma, T.C., Barco, A., Ratan, R.R., & Willis, D.E. (2014). cAMP-responsive element-binding protein(CREB) and cAMP co-regulate activator protein 1(AP1)-dependent regeneration associated gene expression and neurite growth. *J Biol Chem*, 289(47), 32914-3292.
- Ma, T.C., & Willis, D.E. (2015). What makes a RAG regeneration associated? *Front Mol Neurosci*, 8, 43.
- Ma, W., & Quirion, R. (2001). Increased phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein(CREB) in the superficial dorsal horn neurons following partial sciatic nerve ligation. *Pain*, 93(3), 295-301.
- Mango, A.L., Herat, L.Y., Carnagarin, R., Schlaich, M.P., & Matthews, V.B. (2019).

- Current knowledge of IL-6 cytokine family members in acute and chronic kidney disease. *Biomedicines*, 7(1), 19-33.
- McKinnell, I.W., & Rudnicki, M.A. (2004). Molecular mechanisms of muscle atrophy. *Cell*, 119, 907-910.
- McLean, K., Tan, L., Bolland, D.E., Coffman, L.G., Peterson, L.F., Talpaz, M., Neamati, N., & Buckanovich, R.J. (2019). Leukemia inhibitory factor functions in parallel with interleukin-6 to promote ovarian cancer growth. *Oncogene*, 38(9), 10.
- Menorca, R.M., Fussell, T.S., & Elfar, J.C. (2015). Peripheral nerve trauma: mechanisms of injury and recovery. *Hand Clin*, 29(3), 317-330.
- Meyer, D., Ymaai, T., Garratt, A., Sonnenberg, E.R., Kane, D., Theill, L.E., & Birchmeier, C. (1997). Isoform-specific expression and function of neuregulin. *Development*, 124(18), 3575-3586.
- Mi, R., Chen, W., & Hoke, A. (2007) Pleiotrophin is a neurotrophic factor for spinal motor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(11), 4664-4669.
- Mietto, B.S., Mostacada, K., & Martinez, M.B. (2015). Neurotrauma and inflammation: CNS and PNS responses. *Mediators Inflamm*, 2015(2015), 251204.
- Miyazaki, M., & Takemasa, T. (2017). TSC2/Rheb signaling mediates ERK-dependent regulation of mTORC1 activity in C2C12 myoblasts. *FEBS Open Bio*, 7(3), 424-433.
- Modrak, M., Talukder, M.A.H., Gurgenshvili, K., Noble, M., & Elfar, J.C. (2020). Peripheral nerve injury and myelination: potential therapeutic strategies. *J Neurosci Res*, 98(5), 780-795.
- Molteni, R., Zheng, J.Q., Ying, Z., Gómez-Pinilla, F., & Twiss, J.L. (2004). Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(22), 8473-8478.
- Moore, D.L., & Goldberg, J.L. (2011). Multiple transcription factor families

- regulate axon growth and regeneration. *Dev Neurobiol*, 71(12), 1186-1211.
- Ogasawara, R., & Suginozawa, T. (2018). Rapamycin-insensitive mechanistic target of rapamycin regulates basal and resistance exercise-induced muscle protein synthesis. *FASEB J*, 32, 5824-5834.
- Okumura, N., Hashida-Okumura, A., Kita, K., Matsubae, M., Matsubara, T., & Nagai, K. (2005). Proteomic analysis of slow- and fast-twitch skeletal muscles. *Proteomics*, 5(11), 2896-2906.
- Osório, A.J., Matta, P.L., Monteiro, C.C.R., Pontes Dos Santos, L.H., Soares, M.F.A., Carneiro, L.A.C., Calado, L.C., Leal-Cardoso, J.H., Pires, C.D., Soares, F.R., & Marilande, C.V. (2020). Sternuous acute exercise induces slow and fast twitch dependent NADPH oxidase expression in rat skeletal muscle. *Antioxidants*, 9(1), E57.
- Park, J.S., & Höke, A. (2014). Treadmill exercise induced functional recovery after peripheral nerve repair is associated with increased levels of neurotrophic factors. *PLoS One*, 9(3), e90245.
- Patodia, S., & Raivich, G. (2012). Role of transcription factors in peripheral nerve regeneration. *Front Mol Neurosci*, 8(5), 1-15.
- Pette, D., & Spamer, D. (1986). Metabolic properties of muscle fibers. *Fed Proc*, 45(13), 2910-2914.
- Polleux, F., & Snider, W. (2010). Initiating and growing an axon. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(4), 1925-1943.
- Qin, X., Jiang, B., & Zhang, Y. (2016) 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein. *Cell cycle*, 15(6), 781-786.
- Reyes, N.L., Banks, G.B., Tsang, M., Margineantu, D., Gu, H., Djukovic, D., Chan, J., Torres, M., Liggitt, H.D., Hirehallur, S.D.K., Hockenbery, D.M., Raffery, D., & Iritani, B.M. (2015). Fnipl regulates skeletal muscle fiber type specification, fatigue resistance, and susceptibility to muscular dystrophy.

- Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(2), 424-429.
- Robey, R.B., & Hay, N. (2009). Is Akt the "warburg kinase"?-Akt energy metabolism interactions and oncogenesis. *Semin Cancer Biol*, 19(1), 25.
- Ruff, C.A., Staak, N., Patodia, S., Kaswich, M., Rocha-Ferreira, E. Da Costa, C., Brecht, S., Makwana, M., Frontana, X., Hristova, M., Rumajogee, P., Galiano, M., Bohatschek, M., Herdegen, T., Behrens, A., & Raivich, G. (2012). Neuronal c-Jun is required for successful axonal regeneration, but the effects of phosphorylation of its N-terminus are moderate. *J Neurochem*, 121(4), 607-618.
- Sabatier, M.J., Redmon, N., Schwartz, G., & English, A.W. (2008). Treadmill training promotes axon regeneration in injured peripheral nerves. *Exp Neurol*, 211(2), 489-493.
- Sakamoto, K., Arnolds, D.E., Ekberg, I., Thorell, A., & Goodyear, L.J. (2004). Exercise regulates Akt and glycogen synthase kinase-3 activities in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 19(2), 419-425.
- Salzer, J.L. (2015). Schwann cell myelination. *Cold spring harbor Perspect Biol*, 7(8), 1-26.
- Santos, D., Perez, F.G., Navarro, X., & Valle, J.D. (2016). Dose-dependent differential effect of neurotrophic factors on in vitro and in vivo regeneration of motor and sensory neurons. *Neural Plast*, 4969523, 1-13.
- Saxton, R.A., & Sabatini, D.M. (2017). mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*, 168, 960-976.
- Schiaffino, S., Dyar, K.A., Ciciliot, S., Blaauw, B., & Sandri, M. (2013). Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J*, 280(17), 4249-4314.
- Schiaffino, S., & Mammucari, C. (2011). Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skeletal Muscle*, 1, 4.
- Seijffers, R., Allchorne, A.J., & Woolf, C.J. (2006). The transcription factor

- ATF-3 promotes neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci*, 32(1-2), 143-154.
- Sengen, X., Jin, G., Betty, B., Howard, W., & Leepo, C.Y. (2006). Structural characterization of the binding of myosin·ADP·Pi to actin in permeabilized rabbit psoas muscle. *Biophys J*, 91(9), 3370-3382.
- Seo, T.B., Oh, M.J., You, B.G., Kwon, K.B., Chang, I.A., Yoon, J.H., Lee C.Y., & Namgung, U. (2009). ERK1/2-mediated Schwann cell proliferation in the regenerating sciatic nerve by treadmill training. *J Neurotrauma*, 26(10), 1733-1744.
- Shiying, L., Xiaosong, G., & Sheng, Y. (2017). The regulatory effects of transforming growth factor- β on nerve regeneration. *Cell Transplant*, 26(3), 381-394.
- Snider, W.D., Zhou, F.Q., Zhong, J., & Markus, A. (2002). Signaling the pathway to regeneration. *Neuron*, 35(1), 13-16.
- Solaini, G., Baracca, A., Lenaz, G., & Sgarbi, G. (2010). Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1797(6), 1171-1177.
- Stoll, G., & Müller, H.W. (1999). Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol*, 9(2), 313-325.
- Sullivan, P.G., Rabchevsky, A.G., Waldmeier, P.C., & Springer, J.E. (2005). Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: cause or effect of neuronal cell death? *J neurosci Res*, 79(1-2), 231-239.
- Svenningsen, A.F., & Dahlin, L.B. (2013). Repair of the peripheral nerve - Remyelination that works. *Brain Sci*, 3(3), 1182-1197.
- Sweeney, H.L., & Hammers, D.W. (2018). Muscle contraction. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10(2), a023200.
- Syed, N., & Kim, H.A. (2010). Soluble neuregulin and Schwann cell myelination: A therapeutic potential for improving remyelination of adult axons. *Mol Cell Pharmacol*, 2(4), 161-167.
- Tam, S.L., Archibaid, V., Jassar, B., Tyreman, N., & Gordon, T. (2001). Increased

- neuromuscular activity reduces sprouting in partially denervated muscles. *J Neurosci*, 21(2), 654-667.
- Tapinos, N., & Rambukkana, A. (2005). Insights into regulation of human Schwann cell proliferation by ERK1/2 via a MEK-independent and p56Lck-dependent pathway from leprosy bacilli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(26), 9188-9193.
- Thong, C.M., Barco, A., Ratan, R.R., & Willis, D.E. (2014). cAMP-responsive element-binding and cAMP co-regulate activator protein 1(AP1)-dependent regeneration associated gene expression and neurite growth. *J Biol Chem*, 289(47),32914-32925.
- Tsai, S., Sitzmann, J.M., Dastidar, S.G., Rodriguez, A.A., Vu, S.L., McDonald, C.E., Academia, E.C., O'Leary, M.N., Ashe, T.D., Spada, A.R.L., & Kennedy, B.K. (2015). Muscle-specific 4E-BP1 signaling activation improves metabolic parameters during aging and obesity. *J Clin Invest*, 125(8), 2952-2964.
- Udina, E., Puigdemasa, A., & Navarro, X. (2011). Effects of activity-dependent strategies on regeneration and plasticity after peripheral nerve injuries. *Ann Anat*, 193(4), 347-353.
- Vargas, M.E., & Barres, B.A. (2007) Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow? *Annu Rev Neurosci*, 30, 153-179.
- Vaudano, E., Campbell, G., Anderson, P.N., Davies, A.P., Woolhead, I., Schreyer, D. J., & Lieberman, A.R. (1995). The effects of a lesion or a peripheral nerve graft on Gap-43 upregulation in the adul rat brain: An in situ hybridization and immunocytochemical study. *J Neurosci*, 15(5), 3594-3611.
- Violante, S., Ijlst, L., Te Brinke, H., Tavares de Almeida, I., Wanders, R.J., Ventura, F.V., & Houten, S.M. (2013). Carnitine palmitoyltransferase 2 and carnitine/acylcarnitine traslocase are involved in the mitochondrial synthesis and export of acylcarnitines. *FASEB J*, 27(5), 2039-2044.
- Walker, M.J., & Xu, X.M. (2018). History of glial cell line-derived neurotrophic factor(GDNF) and its for spinal cord injury repair. *Brain Sci*, 8(6), E109.

- Wan, L., Zhang, S., Xia, R., & Ding, W. (2010). Short-term low-frequency electrical stimulation enhanced remyelination of injured peripheral nerves by inducing the promyelination effect of brain-derived neurotrophic factor on Schwann cell polarization. *J Neurosci Res*, 88(12), 2578-2587.
- Wang, Q., Hu, J., Liu, Y., Li, J., Liu, B., Li, M., & Lou, S. (2019). Aerobic exercise improves synaptic-related proteins of diabetic rats by inhibiting FOXO1/NF- κ B/NLRP3 inflammatory signaling pathway and ameliorating PI3K/Akt insulin signaling pathway. *J Mol Neurosci*, 69(1), 28-38.
- Wei, X., Luo, L., & Chen, J. (2019). Roles of mTOR signaling in tissue regeneration. *Cells*, 8(9), 1075-1102.
- Weng, J., Peixun, P., Yin, X., & Jiang, B. (2018). The whole transcription involved in denervated muscle atrophy following peripheral nerve injury. *Front Mol Neurosci*, 11, 69.
- Wessel, T.V., Haan, A., Laarse, W.J., & Jaspers, R.T. (2010). The muscle fiber type-fiber size paradox: hypertrophy or oxidative metabolism? *Eur J Appl Physiol*, 110(4), 665-694.
- Wilhelm, J.C., Xu, M., Cucoranu, D., Chmielewski, S., Holmes, T., Lau, K.S., Bassell, G.J., & English, A.W. (2012). Cooperative roles of BDNF expression in neurons and Schwann cells are modulated by exercise to facilitate nerve regeneration. *J Neurosci*, 32(14), 5002-5009.
- Woo, J.H., Shin, K.O., Lee, Y.H., Jang, K.S., Bae, J.Y., & Roh, H.T. (2016). Effect of treadmill exercise on skeletal muscle mTOR signaling pathway in high-fat diet-induced obese mice. *J Phys Ther Sci*, 28(4), 1260-1265.
- Yang, D.P., Zhang, D.P., Mak, K.S., Bonder, D.E., Pomeroy, S.L., & Kim, H.A. (2008). Schwann cell proliferation during Wallerian degeneration is not necessary for regeneration and remyelination of the peripheral nerves: axon-dependent removal of newly generated Schwann cells by apoptosis. *Mol Cell Neurosci*, 38(1), 80-88.
- Yoon, M.S. (2017). mTOR as a key regulator in maintaining skeletal muscle

- mass. *Front Physiol*, 8, 788.
- Zhang, Z.K., Li, J., Guo, B., Leung, A., Zhang, G., & Zhang, B.T. (2016). Icaritin requires phosphatidylinositol 3 kinase(PI3K)/Akt signaling to counteract skeletal muscle atrophy following mechanical unloading. *Sci Rep*, 6, 20300.
- Zhou, Y., & Notterpek, L. (2016). Promoting peripheral myelin repair. *Exp Neurol*, 283(Pt B), 573–580.
- Ziaaldini, M.M., Marzetti, E. Picca, A., & Murlasits, Z. (2017). Biochemical pathway of sarcopenia and their modulation by physical exercise: a narrative review. *Front Med*, 4, 167.
- Zigmond, R.E., & Echevarria, F.D. (2019). Macrophage biology in the peripheral nervous system after injury. *Prog Neurobiol*, 173, 102–121.

감사의 글

본 논문이 나오기까지 주변 사람들의 도움과 지지에 깊은 감사를 드립니다.

석사과정을 위해 본교에 들어와서 지도교수님을 처음 소개 받던 날을 여전히 기억합니다. 여의치 않은 상황으로 박사과정에 복귀하기까지 2년6개월의 공백을 기다려 주시고 지지해주신 김영표 지도교수님께 감사드리고 그 사랑 잊지 않겠습니다. 단지 김영표 교수님 제자라는 이유로 아무 조건 없이 예뻐해 주시고 연구자의 자세를 가르쳐주신 류재청 교수님께 감사드립니다. 학자로서의 소양을 깨닫게 해주시고 멀리서나마 응원을 아끼지 않으신 양명환 교수님께 많은 것을 배웠습니다. 논문작성에 고민이 많고 혼란스러울 때 김미예 교수님의 가르침에 많은 도움을 받을 수 있었습니다. 김덕진 교수님의 대학원 수업을 통해 진정한 생각의 깊이와 열린 토론이 이루어져 다양한 생각을 경험할 수 있었습니다. 마지막으로 심사위원장이시며 실험연구의 지지자이신 서태범 교수님, 논문이 나오기까지 실험실을 내어주시고 학문적인 지식을 쌓게 도와주신 수의학과 이영재 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

박사논문이 나오기까지 어렵고 마음이 흔들릴 때마다 아무 조건 없이 손 내밀어준 친구 백혜경, 아무리 힘든 일이 있어도 현명하게 이겨나갈 수 있는 조언을 아끼지 않은 김병영 오빠, 학교까지 찾아와 무심하게 밥 한 끼 사주며 무언의 토닥임으로 응원해준 박서연, 김성희 언니 감사합니다. 서울에 있어도 늘 내 편인 부정아, 마음의 부채가 있는 김란, 잊을만하면 연락 와서 응원을 아끼지 않은 양인혁 오빠 미안하고 감사합니다. 그리고 실수 많은 상황에서도 실험과정을 인내심으로 가르쳐준 수의학과 전윤아 선생님 감사합니다.

끝으로 누구보다도 저의 든든한 지원자이신 부모님과 가족들에게 감사하고 사랑합니다.

2020년 7월

김지은 배상