creative commons

COMMONS DEED

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

dCollection

약학박사 학위논문

과중력 스트레스에 대한 생체 자기 방어 및 신호 조절 기전

Mechanism of self-protection and signal regulation against hypergravity stress

2021년 8월

서울대학교 대학원

약학과 약물학전공

이 상 길

과중력 스트레스에 대한 생체 자기 방어 및 신호 조절 기전

Mechanism of self-protection and signal regulation against hypergravity stress

지도교수 강 건 욱

이 논문을 약학박사 학위논문으로 제출함

2021 년 6 월

서울대학교 대학원

약학과 약물학전공

이 상 길

이상길의 약학박사 학위논문을 인준함

2021 년 6 월

위 원 장	이 승 희
부위원장	이 윤 희
위 원	강 건 욱
위 원	김 원 기
위 원	김 상 건

초 록

생물체가 경험하는 중력 관련 스트레스는 연구 모델, 물체, 관찰 지수에 따라 다양하다. 따라서 항공 우주 임무에 대한 적절한 생리학적 반응 및 변화를 관리하려면 과중력이 인체에 미치는 영향에 대한 이해가 필요하다.

본 연구에서는 생쥐 모델을 이용하여 과중력의 단일 또는 반복 자극이 에너지 대사와 관련된 분자에 영향을 미치는지 조사하였다. 간에서 AMPKα와 그 하위 신호의 발현은 1 시간 동안 + 9 Gz 과중력 자극에 노출된 후 6 시간 이후에 유의적으로 억제되었다가 점차 정상으로 돌아옴을 확인할 수 있었다. 그러나 억제된 AMPKα의 발현 수치는 + 9 Gz 과중력 자극을 3 회 반복하였을 때는 정상 수준을 나타내며 이는 반복된 다중 자극 훈련에 의한 적응효과를 나타내는 것을 시사한다. cDNA microarray 분석을 통해 221 개의 유전자가 + 9 Gz 중력 자극에 의해 유의적으로 변화한다는 것을 발견할 수 있었고 억제된 유전자에는 Nrf2 타겟 유전자들이 포함되어 있음을 확인할 수 있었다. 이를 추가적으로 확인하기 위해 시행한 Nrf2 유전자 결핍 동물을 이용한 실험에서는 + 9 Gz 3회 반복 자극에 의해 유도되는 AMPKα 신호의 적응을 통한 회복이 나타나지 않음을 확인했으며, 이는 Nrf2가 AMPKα의 적응을 통한 회복효과에 역할을 미친다는 것을 나타낸다. 종합적으로, + 9 Gz 중력이 생쥐에 주어졌을 때 간 손상과 함께 AMPKα 신호 억제 효과를 유발하며, 이는 Nrf2에 의해 매개되는 반복적인 과중력 자극에 의한 적응반응에 의해 극복될 수 있음을 확인하였다.

과중력 자극이 간 기능에 미치는 영향을 더 알아보기 위해 대표적인 간 독성 모델인 알코올 단 회 폭음 섭취와 + 9 Gz 과중력 자극의 병용 처치에 의한 간의 변화를 확인하였다. 알코올 폭음 섭취는 간세포에서 미토콘드리아

기능 장애를 유발하는 것으로 알려져 있다. 따라서 과중력 스트레스와 폭음 섭취의 조합이 AMPK와 간세포 생존에 필요한 생체 신호에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. 쥐를 1시간 동안 +9 Gz의 과중력 자극을 가한 직후 알코올 섭취를 진행하고 24시간 이후 간에서 Akt와 PARP-1 수치가 억제됨을 확인하였다. 또한, 에너지 대사를 조절하는 핵심 분자의 AMPKα의 수준을 지속적으로 감소시켰다. 마찬가지로, 세포 생존에 필요한 핵심 전사 요인인 STAT3, FOXO1/3, C/EBP 및 CREB의 수준을 억제하였다. 그러나 이러한 변화는 3회 연속 반복 자극 후에는 나타나지 않았으며, 이는 과중력에 대한 반복적인 과중력 자극에 의한 적응 반응이 과중력 및 알코올에 의한 영향을 극복할 수 있음을 보여준다

나아가 과중력 자극이 간 뿐만 아니라 신장에 미치는 생체적 스트레스 및 독성을 확인하였다. 특히 소포체에서 발생하는 단백질의 축적 (즉, ER 스트레스)은 신장 질환에서 관찰된다. 단일 과중력 자극 이후 아세트아미노펜 투여 후 신장에서 세포 생존 지표의 단백질 수치가 감소하였고, 또한 신장 손상 지표가 증가했으며 ER 스트레스 관련 지표의 발현이 증가되었다. 또한 과중력 반복 자극 훈련에 의해 생쥐의 신장 손상이 극복됨을 확인하였다. 다중 과중력 자극와 APAP에 의한 pri-miR-122의 수치는 신장이 아닌 간에서만 증가했기 때문에 신장에서의 miR-122 수준의 증가는 간에서 비롯되었을 가능성이 높을 것으로 예측되었다. 이는 과중력 자극과 APAP에 의한 자극이 생쥐의 생체 내에서 ER 스트레스 증가로 인한 신장 기능 장애를 일으켰으며, 이는 반복적인 과중력 자극으로 인한 간에서 miR-122의 생산 증가로 극복될 수 있음을 발견하였다.

종합할 때, 본 연구에서는 과중력 스트레스에 의한 자극이 간, 신장을

포함한 장기에 생체 스트레스를 유발하였음을 밝혔다. 특히 과중력 스트레스는 간에서 AMPKα 신호를 포함한 에너지 항상성 유지에 혼란을 주었으며, 이는 반복적인 과중력 자극 훈련이 부분적으로 Nrf2 의존적인 AMPK 경로 복구에 의해 매개되어 과중력 스트레스에 대한 적응 능력을 향상시켰다는 것을 입증하였다. 또한 이러한 방어기전은 폭음 알코올 자극을 동반한 심화된 과중력 자극에서도 동일하게 적용됨을 발견하였다. 또한 과중력 자극에 의한 스트레스는 간 뿐만 아니라 신장에서도 ER 스트레스 발생을 통해 신장 기능 장애를 발생시킬 수 있음을 확인하였고, 이는 반복적인 과중력 자극훈련에 의한 miR-122의 작용에 의해 극복될 수 있음을 입증하여 우주 여행 중 과중력 스트레스 극복에 대한 새로운 정보를 제공하였다.

주요어 : 과중력 스트레스, 알코올, 아세트아미노펜, AMPK, Nrf2, ER 스트레스

학번 : 2014-30558

목 차

초록..... i
목차..... iv
List of figures..... vi
List of abbreviation..... viii
I. 서론 1
II. 연구재료 및 방법

동물 모델 5
과중력 자극 실험..... 5
혈액 화학 분석 6
조직화학적 염색 6
면역화학적 분석..... 7
RNA 품질 검사 7
Affymetrix whole transcript expression arrays..... 7
Raw 데이터 준비 및 통계 분석 8
cDNA 마이크로 어레이 데이터베이스를 활용한 기전 분석 9
실시간 중합효소 연쇄반응 분석 9
통계분석 10

III. 연구결과

1) 단 회 +9 Gz 과중력 자극에 의한 간 조직 손상 모델에서 AMPKα의 역할 및 다중 +9 Gz 과중력 자극 훈련 모델을 통한 적응 작용 기전 11
1-1. +3 또는 +9 Gz 과중력 자극이 조직 손상 지표에 미치는 영향..... 11
1-2. +9 Gz 과중력 자극에 의한 AMPK 신호 변화..... 15
1-3. cDNA 마이크로 어레이 분석을 통한 +9 Gz 과중력 자극의 영향을 받는 유전자 분석..... 18
1-4. +9 Gz 과중력 자극 후 간 손상 지표의 변화..... 24
1-5. 단일 또는 다중 +9 Gz 자극 후 전사 인자 및 미토콘드리아 지표.. 27
1-6. +9 Gz 과중력의 영향을 받는 분자 지표에 대한 고정/구속 효과.... 30

2) 과중력 스트레스 후 알코올 폭음 섭취 모델에서의 AMPK의 역할과 간세포 생존 관련 전사 인자 조절..... 32
2-1. +9 Gz 과중력 자극과 폭음 섭취가 간 손상 지표에 미치는 영향... 32
2-2. +9 Gz의 과중력과 폭음 섭취에 의한 AMPK 경로의 지속적 억제.. 35
2-3. +9 Gz의 과중력과 폭음 섭취에 의한 미토콘드리아 표지 지표의 변화..... 38
2-4. 간 내 주요 전사 인자에 대한 알코올 및 과중력의 영향..... 40
2-5. 3회 반복 과중력과 폭음 섭취 자극의 영향..... 45
3) 과중력 스트레스와 아세트아미노펜 자극에 의한 신장 독성..... 48
3-1. APAP 자극과 결합된 단일 과중력 자극과 관련된 신장 손상억제 48
3-2. APAP 처리와 결합된 단일 과중력 자극에 의한 ER 스트레스 유도..... 49
3-3. 반복 +9 Gx 과중력 자극 훈련을 통한 APAP 유도 신장 손상 감쇠 52
3-4. 다중 과중력 자극 훈련에 의한 신장 내 miR-122 수치의 적응을 통한 증가..... 55

IV. 고찰 58

V. 참고문헌 70

VI. Abstract 75

List of figures

Figure 1. Changes of hematological indexes by a load to +3 or +9 Gz hypergravity.....13

Figure 2. AMPK subunit levels and its signal intensity after load(s) to +9 Gz hypergravity.....16

Figure 3. cDNA microarray and qRT-PCR assays.....20

Figure 4. Nrf2 levels after load(s) to +9 Gz and the effect of Nrf2 gene knockout on AMPK.....22

Figure 5. The effects of +9 Gz load(s) on the markers associated with hepatocyte viability or blood glucose contents.....25

Figure 6. The effects of +9 Gz load(s) on hepatic transcription factors.....28

Figure 7. The effects of +9 Gz load(s) on SIRT and PGC-1α levels 29

Figure 8. Immunoblottings for hepatic molecules in mice subjected to restraint stress.....31

Figure 9. The effects of +9 Gz load plus binge alcohol intake on hepatocyte viability markers.....33

Figure 10. The levels of AMPK subunits and ACC intensities after +9 Gz load plus binge alcohol intake.....36

Figure 11. The effect of +9 Gz load plus binge alcohol intake on SIRT1/3 and PGC-1α levels.....39

Figure 12. Gene ontology (GO) terms and a gene expression network.....41

Figure 13. The effects of +9 Gz load plus binge alcohol intake on liver transcription factors.....43

Figure 14. The effects of repetitive +9 Gz loads plus binge alcohol intakes.....**46**

Figure 15. Increased ER stress in the kidneys of mice exposed to a single hypergravity load coupled with APAP treatment.....**50**

Figure 16. Effects of hypergravity preconditioning on kidney dysfunction, cell survival marker expression, and ER stress induced by APAP treatment.....**54**

Figure 17. miR-122 and primary miR-122 levels in major organs of mice exposed to combined treatments of hypergravity load(s) and APAP and putative target genes of miR-122.....**57**

Figure 18. Schematic diagram showing mechanism of self-protection and signal regulation against hypergravity stress.....**68**

List of abbreviations

ACC: Acetyl-CoA carboxylase

Akt: Protein kinase B

ALT: Alanine transaminase

AMPK: AMP-activated kinase

APAP: Acetaminophen

AST: Aspartate Transaminase

AMPK: AMP-activated kinase

C/EBP: CCAAT/enhancer-binding protein beta

CPK: Creatine phosphokinase

CREB: cAMP response element-binding protein

DEG: Differentially expressed gene

ER: Endoplasmic reticulum

FoxO: Forkhead box O

GO: Gene ontology

Grp78: Glucose-regulated proteins 78

IRE1α: Inositol-requiring enzyme 1α

Kim: Kidney injury molecule

KO: Knockout

Nrf2: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2

PARP: Poly (ADP-ribose) polymerase

PBS: Phosphate–buffered saline

PERK: Protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase

PGC-1: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1

SDS: Sodium dodecylsulfate

SIRT: Silent mating type information regulation 2 homolog

WT: Wild-type

I. 서 론

생명체가 지구 표면에서 우주로 이탈할 때 가해지는 가장 큰 변화는 발사체를 타고 올라가는 동안 가해지는 높은 중력과 그 후 겪게 되는 급격한 무중력으로의 변화로 볼 수 있다(과중력과 중력변화). 특히, 과도한 중력과 중력 가속도의 변화는 생체에 급격한 스트레스를 가하게 되는데 이에 관한 생물학적 연구는 많지 않은 상황이다. 우주 비행과 관련된 외부 변화 및 자극으로 인해, 우주선 조종사나 관련 경험을 하게 되는 인류가 이러한 자극에 성공적으로 적응하고 손상을 방지할 수 있는 전략을 개발하는 데 추가적인 독성 연구가 중요하다. 1961년 유인 우주 임무가 시작된 이래, 기술의 발전은 훈련된 우주 비행사 뿐만 아니라 민간인 또한 우주 여행을 할 수 있는 수준에 이르렀다. 그러나 최근의 기술적 진보와 전망에도 불구하고 중력 변화, 전리방사선, 생리적/심리적 스트레스 요인 등과 같은 많은 요소들이 지구 대기권 밖의 우주 비행사들의 건강을 위협하고 있다. 생물학적 시스템에 대한 과중력 자극에 대한 영향을 다루는 보고는 거의 없다. 우주 비행사들은 발사 시 +3.2 Gz, 재진입 시 +1.4 Gz 정도의 과중력 자극을 경험한다. 유인우주선의 경우 발사 후 첫 엔진이 끊길 때 우주인들은 최대 +3.6 ~ +4.0gz까지 노출되고 두 번째 엔진이 차단될 때 최대 100초 동안 +2 Gz의 과중력에 노출되는 것으로 보고되었다. 또한 제트 전투기 조종사는 수 초 동안 +9 Gz까지 노출될 수 있다. 이러한 과중력 자극은 장기에 상당한 부담을 준다는 정도의 보고 만이 보편적으로 알려져있다. 따라서, 과중력이 에너지 항상성에 미치는 영향에 대한 이해는 과중력 조건에서 안전하고 효과적인 항공 우주 임무와 인간의 생

존을 보장하기 위한 적절한 대책을 관리하는 데 도움이 될 것으로 생각되며, 이에 대한 생물학적 반응에 대한 종합적인 이해와 연구가 필수적이다.

간은 구심성 혈관과 원심성 혈관의 서로 맞물리는 네트워크로 구성된 연속적인 스펀지 모양의 장기이며 식이 섭취를 통해 흡수된 에너지원이 가장 먼저 유입되어 대사되는 기관으로써 외부의 에너지 상태의 변화를 인식하여 포도당의 저장 및 생합성을 통해 타 기관의 에너지 대사를 직접적으로 조절하는 핵심 장기이다. 따라서 간 조직은 물리적 또는 압축 스트레스와 같은 혈류역학적 변화에 더 민감할 수 있다. 항공 우주 우주선 발사 또는 이륙 중 간세포에 대한 직접적인 압력 변화, 세포 기관의 물리적 결합에 수반되는 영향 외에도, 혈류역학적 순환의 교란과 스트레스는 간에서의 대사 및 결과적으로 에너지 생산과 관련된 분자적 신호에 영향을 미칠 것이 예상된다. 분자 수준에서는 세포내 에너지 센서인 AMP 활성 단백질 키나제(AMPK)가 STAT3, FoxO1/3, CREB 등 전사인자의 조절에 핵심적인 역할을 하며 따라서 간 포도당 신생합성 또는 글리코겐, 지방산, 콜레스테롤의 합성 과정의 교란이 수반될 것이다. 간의 기능은 전사인자의 활성화 및 불활성화를 통한 유전자 발현에 의해 조절받는다. 이들 전사인자중 CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBPβ) 및 NF-E2 related factor-2 (Nrf2)는 간재생, 해독, 염증 및 에너지 대사와 관련된 유전자의 발현을 조절함으로 정상적 간기능을 유지케하는 필수전사인자이다. 따라서 본 연구는 과중력 스트레스가 미치는 영향에 대한 이해가 부족하고 혈류역학적 순환의 변화와 순응력이 생물학적 시스템에 미치는 영향을 분석하기 위하여 +3 Gz 또는 +9 Gz까지의 단일 또는 다중 과중력 자극이 간을 비롯한 장기에 어떠한 영향을 미치는지, 특히 간에 에너지 항상성과 관련된 분자들에 초점을 맞춰 에너지 대사 및 세포

생존가능성 등을 탐구하고자 하였다.

과중력 자극이 간 기능에 미치는 영향을 조금 더 알아보기 위해 대표적인 간 독성 모델인 급성 폭음 알코올 섭취와 + 9 Gz 과중력 자극의 병용 처치에 의한 간의 변화를 탐구하고자 하였다. 특히 과중력 자극 이후 발생하는 간 기능 장애와 과중력에 대한 반복 훈련을 통한 적응을 고려할 때, 본 연구는 단일 또는 다중 과중력 자극과 알코올 섭취가 에너지 대사 및 세포 생존과 관련된 분자에 부가 또는 감소 효과를 미칠 수 있는지 탐구하였다. 알코올 관련 질환은 항공 인구에서 가장 보편적인 질환 중 하나이다. 알코올의 지속적인 사용은 만성적인 성능 저하로 이어질 수 있지만, 가장 중요하고 잘 알려진 영향은 급성 알코올 중독의 영향이다. 곡예비행 조종사에게 중요한 것은 알코올이 +Gz 가속도에 대한 내성을 감소시킨다는 것이다. 일부 연구에 따르면 적당한 수준의 알코올도 조종사의 +Gz 허용오차를 약 +0.5Gz 정도 감소시킨다. 이는 부분적으로 정맥과 동맥 내 근육의 이완과 알코올의 탈수 효과로 인해 혈액량이 감소했기 때문일 수 있다. 더욱이 단기간 음료 섭취로 정의되는 급성 폭음 알코올 섭취가 간세포의 미토콘드리아 DNA 합성을 억제해 미토콘드리아 대사와 손상을 유발한다는 증거가 있다.

나아가 과중력 자극이 간 뿐만 아니라 신장에 미치는 생체적 스트레스 및 독성을 확인하였다. 아세트아미노펜(APAP)은 일반적으로 많이 처방되는 진통제로서 일반적인 투여범위에서는 넓은 안전 마진을 가지고 있는 것으로 보고되어 있다. 그러나 이 화합물은 특정 생리학적 조건, 특히 과다복용의 경우 신독성과 간독성을 유발할 수 있다. 우주 환경 조건 하에서 과중력 스트레스의 영향과 장기에 미치는 의약품의 영향에 대한 연구가 부족한 점을 감안하여, 본 연구에서는 APAP가 세포 내 증강 ER 스트레스로 인해 과중력

자극과 결합될 때 신장 기능에 어떠한 영향을 미치는 지를 조사하였다. 또한, 과중력 반복 훈련을 통한 체내 적응반응이 APAP 독성을 개선할 수 있는지 여부를 탐색했으며, 그 후 신장과 간에서 miR-122 및 pri-miR-122를 중심으로 APAP 독성 및 적응에 대한 분자 기전을 조사하였다.

본 연구에서는 과중력 스트레스에 의한 자극이 간, 신장을 포함한 장기에 생체 스트레스를 유발하였음을 밝혔다. 특히 이 스트레스는 간에서 AMPKα 신호를 포함한 에너지 항상성 유지에 혼란을 주었으며, 이는 반복적인 과중력 자극 훈련이 부분적으로 Nrf2 의존적인 AMPK 경로 복구에 의해 매개되어 과중력 스트레스에 대한 적응 능력을 향상시킴을 새롭게 규명하였다. 나아가 이러한 방어기전은 폭음 알코올 자극을 동반한 심화된 과중력 자극에서도 동일하게 적용됨을 탐구하였다. 과중력 자극에 의한 스트레스는 간 뿐만 아니라 신장에서도 ER 스트레스 발생을 통해 신장 기능 장애를 발생시킬 수 있음을 확인하였고, 이는 반복적인 과중력 자극훈련에 의한 miR-122의 작용에 의해 극복될 수 있음을 입증하여 우주 여행 중 과중력 스트레스 극복에 대한 새로운 정보를 제공하였다.

II. 연구재료 및 방법

1) 동물모델(Mouse model)

동물실험은 서울대학교 동물실험 윤리위원회(Institutional Animal Use and Care Committee)의 지침에 따라 시행하였다. 실험동물로 사용된 C57BL/6 생쥐를 Charles River Orient (Seoul, Korea)에서 공급받아 55±5%의 습도, 22±2°C의 온도 및 환기가 조절된 서울대학교 약대 동물실험 연구동에서 1주 이상 사육하여 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주었다. 특별한 언급이 없는 한 물과 고형사료를 자유로이 공급하였다.

2) 과중력 자극 실험(Centrifugation experiment)

생쥐들은 항공우주 의약품 연구센터(한국 청주)에서 소형 동물 원심분리기를 이용해 1시간 동안 +9 Gz 과중력에 노출됐다. 원심분리기에 장착했을 때 원통형 플라스틱 구속 장치 안에 생쥐를 넣어 상하 공전축을 따라 +Gz가 전달되도록 하였다. 생쥐를 고정한 후에는 구속 장치를 원심분리기에 고정시켰다. 팔의 끝에 케이지 장착 모듈을 부착하여 중력이 구속 장치의 바닥과 수직이 되도록 하였다. 생쥐는 과중력 자극에 노출된 후 6, 12 또는 24시간 후에 희생되었다. 또한 반복 과중력 자극 실험군에서는 동물들은 3일 동안 과중력에 1시간 동안 매일 노출되었고, 조직 샘플은 마지막 노출 후 6시간 이후에 획득되었다.

또한 과중력 스트레스 후 알코올 폭음 섭취 모델에서는 생쥐에게 1 시간

동안 + 9 Gz 고 중력 부하 후 즉시 알코올 (5g / kg 체중, 20 % EtOH) 또는 수돗물을 경구 투여하고 알코올 또는 수돗물 처리 후 23 시간 이후에 희생되었다. 반복 자극 실험군에서는 3일 동안 + 9 Gz 과중력 부하에 1시간 동안 노출된 후 알코올 투여를 24시간마다 반복했고, 조직 샘플은 마지막 노출 후 23시간 이후에 획득되었다.

과중력 스트레스와 아세트아미노펜(APAP) 복합 자극 모델의 경우 마우스는 단일 용량의 아세트아미노펜 (i.p., 500 mg / kg BW, i.p.) 이 처리되거나 처리되지 않고 과중력에 노출 된 후 6시간 후에 희생되었다. APAP의 용량은 산화 스트레스와 ER 스트레스를 유도하기 위해 선택되었다. 반복 자극 모델의 동물을 3 일 동안 매일 과중력 자극에 노출되고 마지막 자극 6 시간 후에 조직 샘플을 얻었습니다.

과중력 자극 실험 내내 CCD (Charge Coupled Device) 카메라로 생쥐의 행동을 관찰하였다.

3) 혈액 화학 분석(Blood chemistry)

혈장 알라닌 아미노 전달효소(ALT) 활성, 아스파테이트 아미노 전달효소(AST), 크레아틴 키나제(CPK), 혈액요소 질소(BUN), 크레아티닌 및 포도당 함량을 자동 혈청 분석기(Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, 미국)를 사용하여 분석하였다.

4) 조직화학적 염색(histochemistry)

간의 왼쪽 엽을 잘라낸 후 조직 조각은 6시간 동안 10% 완충-노말 포르말린으로 고정되었다. 일반 광학현미경 검경 후 10% neutral buffered

formalin에 고정하여 제작한 파라핀 포매 조직을 4 μm 두께로 박절하여 X-traTM 슬라이드(Surgipath, Richmond, Illinois)에 부착하여 xylene에 탈파라핀한 뒤 무수 알코올과, 90%, 75% 및 50% 에탄올에 각각 2분씩 처리하여 함수시켰다. 항원성 회복을 위하여 citrate 완충액(10 mM, pH 6.0)에 슬라이드를 담가 전자오븐에 15분간 끓인 후 실온에 방치시켜 20분간 식힌 후 50 mM Tris 완충용액(TBS, pH 7.5)으로 수세하였다. 샘플은 헤마토실린&에오신(H&E) 염색법으로 염색하였다.

4) 면역화학적 분석(Immunoblot analysis)

단백질은 7.5%의 도데실황산나트륨(sodium dodecyl sulfate) 폴리아크릴아미드겔 전기영동으로 분리되어 니트로셀룰로스 막(Millipore, Bedford, MA)으로 전달되었다. 1시간 동안 TBST(20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5)에서 무지방 건조 우유 5%로 막은 후 각 1차 항체를 4℃에서 하룻밤 배양하였다. TBST 완충제로 세척한 후 실온에서 1시간 동안 2차 항체로 막이 배양되었다. 단백질 밴드는 ECL 화학 발광 시스템을 사용하여 발색하였다.

5) RNA 품질 검사(RNA quality check)

품질 관리를 위해, RNA 순도와 무결성은 OD 260/280 비율로 평가되었으며 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, USA)로 분석하였다.

6) Affymetrix whole transcript expression arrays

Affymetrix 전체 Transcript Expression 어레이 프로세스는 제조업체

프로토콜 (GeneChip Whole Transcript PLUS reagent Kit)에 따라 실행되었다. cDNA는 제조업체가 설명한 대로 GeneChip WT Amplification Kit를 사용하여 합성되었다. 감지 cDNA는 분해되어 GeneChip WT Terminal 표지 키트를 사용하여 TdT(단자 디옥시뉴클레오티딜 전달효소)로 표지되었다. 약 5.5 μg의 라벨링된 DNA 표적을 45 °C에서 Affymetrix GeneChip Mouse 2.0 ST Array로 16시간 동안 하이브리드화하였다. 하이브리드 어레이는 GenChip Fluidics Station 450에서 세척 및 염색을 시행했으며 GCS3000 스캐너(Affymetrix)에서 스캔되었다.

7) Raw 데이터 준비 및 통계 분석(Raw data preparation and statistical analysis)

Raw 데이터는 AFCC(Affymetrix GenChip® Command Console® Software)에서 제공하는 소프트웨어를 사용하여 Affymetrix 데이터 추출 프로토콜에서 자동으로 추출되었다. CEL 파일을 이용하여, 데이터는 Affymetrix® Expression Console™ Software(EC)에서 구현된 강력한 다중 평균(RMA) 방법으로 분석 및 표준화되었다.

유전자 수준 RMA 분석과 함께 결과를 도출하였고, 차등 발현 유전자(DEG) 분석을 수행하였다. 테스트 샘플과 제어 샘플 간의 비교 분석은 LPE 테스트 및 폴드 변경을 사용하여 수행되었다. False discovery rate (FDR)은 Benjamini-Hochberg algorithm을 사용하여 p 값을 조정함으로써 제어되었다. DEG 세트의 경우, 유사성의 척도로 완전한 연결과 유클리드 거리를 사용하여 계층적 군집 분석이 수행되었다. 차등 발현 유전자의 모든 통계 테스트와 시각화는 R 통계 언어 v.3.0.2(www.r-project.org)를 사용하여 수행되었다.

8) cDNA 마이크로 어레이 데이터베이스를 활용한 기전 분석(Pathway analysis using microarray database)

"Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery"(DAVID)가 유전자 분석에 사용되었다. DAVID 온라인 버전 (http://david.abcc.ncifcrf.gov/)의 "Functional Annotation Tool"는 기본 매개변수를 사용하고 Gene-Ontology-Biological Process의 범주에 초점을 맞추어 실행되었다. 포함 기준을 충족하는 모든 Annotation 용어를 " Functional Charts"를 통해 획득할 수 있었다. 주석 용어 간의 유사성을 시각화하기 위해 기능 차트를 먼저 p-값(다중 테스트를 위한 Benjamini-Hochberg 방법)으로 필터링한 다음 Pcorr <0.01를 기준으로 annotation 대상를 필터링하였다. 모든 대상 사이의 유사성은 공유 유전자의 수를 사용하여 측정되었다. 이러한 Annotation Cluster 지도는 연구 결과에 표시하였다. 군집화된 분화 유전자 사이의 유전자 상호작용 네트워크는 STRING 9.0 (http://string-db.org) 프로그램에 의해 제작되었고 Cytoscape 소프트웨어를 사용하여 시각화되었다.

9) 실시간 중합효소 연쇄반응 분석(Real-Time polymerase chain reaction assays)

RT-PCR은 제조사의 지침에 따라 Light Cycler DNA master SYBR green-I kit (Light-Cycler 2.0; Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 수행되었다. Trizol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 총 RNA를 추출하여

complementary DNA(cDNA)를 얻었으며, qRT-PCR은 ABI Step One Plus RT-PCR 시스템(Thermo Fish Scientific, Walam, USA)을 사용하여 수행하였다. 상대 mRNA 수준은 actin 수준을 기반으로 정량화되었다. Mature 마이크로RNA는 각각의 특정 primer와 miScript SYBR 그린 중합효소 연쇄반응 키트(Qiagen, Valencia, CA, 미국)를 사용하여 증폭되었다. U6 소형 핵 RNA (U6)의 Transcript은 마이크로 RNA 수준의 표준화를 위해 정량화되었다.

10) 통계분석(Data analyses)

Scanning densitometry는 Image Scan & Analysis System (Alpha-Innotech Corporation, San Leandro, CA)으로 정량하였다. 배경을 제외시킨 밴드 영역의 강도를 AlphaEase™ 5.5 software로 정량하였다. One way analysis of variance (ANOVA)로 그룹간 유의성을 평가하였고 post hoc multiple comparison은 Newman-Keuls test를 활용하였다. 데이터는 산술평균 ± S.E.로 표기하였으며 통계적 유의성은 $p<0.05$ 또는 $p<0.01$을 기준으로 하였다.

III. 연구 결과

1) 단 회 +9 Gz 과중력 자극에 의한 간 조직 손상 모델에서 AMPKα의 역할 및 다중 +9 Gz 과중력 자극 훈련 모델을 통한 적응 작용 기전

1-1. +3 또는 +9 Gz 과중력 자극이 조직 손상 지표에 미치는 영향

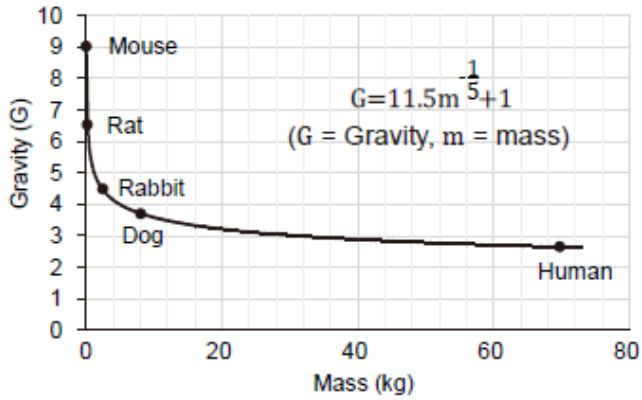
동물의 크기와 중력 반응에 대한 영향과의 관계는 비례하는 것으로 알려져 있다. 앞선 연구에서는 쥐, 토끼, 개 등 다양한 종 가운데 동물이 생존할 수 있는 중력 자극이 줄어든 것이 체질량 대비로 나타났다. 현재 연구에서, 인간의 사례에 데이터를 추정하기 위해 보고된 사망률과 동물 종의 질량에 대한 중력의 영향을 사용하여 새로운 방정식을 만들었다(그림 1A). 이 방정식은 인간에게 주어지는 과중력 자극의 정도와 일치하는 생쥐의 과중력 자극의 정도를 예측할 수 있게 해주었다. 본 방정식에 따르면 생쥐에게 주어지는 +9 Gz는 인간에게 주어지는 +2.7 G 과중력 스트레스와 유사한 것으로 생각된다.

주요 장기에 미치는 과중력 영향을 평가하기 위해 생쥐가 +3 또는 +9 G 과중력 자극에 노출된 직후 간, 골격근, 신장의 대표적인 손상 표지자로서 혈청 내 알라닌 아미노 전이효소(ALT), 아스파테이트 아미노 전이효소(AST), 크레아틴 키나아제(CPK), 혈액 요소 질소(BUN) 및 크레아티닌 함량을 먼저 측정하였다. 생쥐에 +3 Gz 또는 +9 Gz 과중력 자극을 1시간 동안 주었을 때 혈청 AST 수치가 크게 증가하였다(그림 1B). 혈청 ALT 수치가 증가하는 경향도 보였다.

또한 골격근 및 신장 손상의 지표로 알려진 혈청 내 CPK 및 BUN 또한 증가하는 모습을 보였다. 특히 +9 Gz에 3시간 동안 노출된 생쥐의 혈청에서 ALT와 AST 수치가 모두 증가했지만, 그중 6마리 중 2마리가 노출 이후 사망

하였다. 또한, 3시간 동안 +9 Gz에 대한 자극이 증가했지만 CPK에서는 증가하지 않았다. 이는 일부 동물이 사망함에 따라 표본 크기가 더 작아졌기 때문일 수 있다. 본 데이터를 통해 생쥐가 +3 또는 +9 Gz 과중력 자극에 1시간 또는 3시간 동안 노출되면 장기의 일부 손상이 발생할 가능성이 있음을 확인하였다(그림 1B). 다른 일련의 실험을 통해 1시간 동안 +9 Gz 과중력 자극이 주어진 후 휴식 시간 동안 CPK 및 BUN과 같은 다른 지표가 정상으로 돌아왔지만 혈청 아미노 전이효소의 수준은 증가하는 것을 발견하였다. 그 후, 실험 동물이 죽지 않는 수준에서 최대 손상 정도를 평가하기 위해 +9 Gz 과중력 자극의 1시간 처치를 주요 실험 방법으로 선택하였다. 간은 스펀지와 같은 구조 질량으로 인해 과중력 자극 스트레스에 더 취약한 것으로 보이기 때문에 다음으로 에너지 대사 및 세포 생존성과 관련된 간 내 주요 분자의 변화에 초점을 맞췄다.

A)


Gravity (G)
Mass (kg)
Mouse
Rat
Rabbit
Dog
Human
G=11.5m^-1/5+1
(G = Gravity, m = mass)

B)

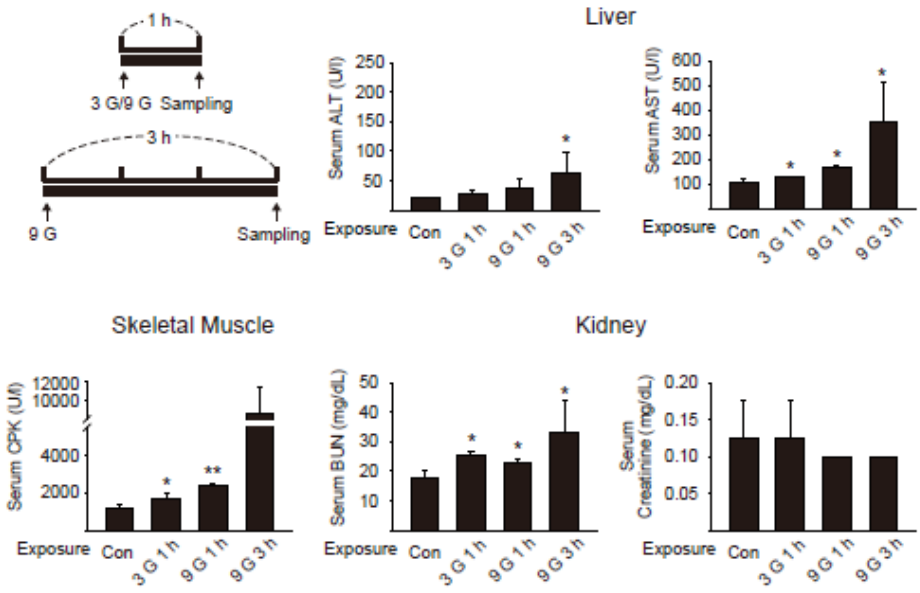

1 h
3 G/9 G Sampling
3 h
9 G
Sampling
Liver
Serum ALT (U/l)
Serum AST (U/l)
Skeletal Muscle
Serum CPK (U/l)
Kidney
Serum BUN (mg/dL)
Serum Creatinine (mg/dL)
Exposure
Con
3 G 1 h
9 G 1 h
9 G 3 h

Figure 1. Changes of hematological indexes by a load to +3 or +9 Gz hypergravity.

(A) A new equation created using reported effects of gravity on mortality vs. masses of different animals. A scaling in hypergravity was extrapolated to that of human using the proposed equation. (B) Hematological parameters. The activities of aminotransferases, creatine phosphate kinase (CPK), blood urea nitrogen (BUN) and creatinine contents in serum were measured as injury markers of the liver, skeletal muscle, and kidney, respectively, immediately following exposure of mice to a single load to + 3 or + 9 Gz for 1 h or 3 h. Data represent the mean± S.E (N = 3-4 each). Statistical significance of the differences between hypergravity stress and control group (*$P < 0.05$, **$P < 0.01$). Con, control.

1-2. +9 Gz 과중력 자극에 의한 AMPK 신호 변화

과중력 자극은 이에 대한 신체 내 적응을 유발하면서 일련의 분자 변화를 촉발할 수 있다. 따라서, 1시간 동안 +9 Gz 과중력에서 +9 Gz까지의 단일 자극 후 6, 12 또는 24시간 동안 AMPK 하위 신호를 모니터링하여 에너지 항상성 조절을 위한 세포 내 센서인 AMPK의 변화를 조사하였다. AMPKα의 발현 정도는 자극 후 6시간 후에 유의미하게 감소한 뒤 시간이 지남에 따라 정상으로 회복되었다(그림 2A). 반면, AMPKα1과 β1/2/3는 크게 변하지 않았다. 일관되게 AMPK 활성도 지표인 p-AMPK의 발현 정도는 +9 Gz 자극 후 6시간 후에 감소하였고, 이후 이 효과는 정상 수준으로 회복되었다. 마찬가지로, p-ACC 수위는 과중력 스트레스 후 6시간 대에 최대 감소되었다가 정상 상태로 되돌아갔다. 인산화 AMPK 신호(p-AMPK)는 +9 Gz 자극 직후에는 변화되지 않았으며 이는 AMPK 신호가 감소하여 휴식 시간 동안 회복될 수 있음을 의미한다.

또한 과중력 다중 자극이 +9 Gz 과중력에 대한 AMPK 하위 신호에 미치는 영향에 관심이 있었다. 이 모델에서는 과중력 다중 자극에 의한 효과를 단일 자극과 비교하기 위해 +9 Gz에 마지막으로 노출한 후 6시간 시점을 선택하였다. 흥미롭게도, AMPKα 발현량은 3회의 +9 Gz 과중력 다중 자극이 주어진 후 6시간 만에 거의 정상 상태와 비슷한 수준으로 회복되었고 그 하위 신호인 p-ACC 발현량 또한 이 결과와 일치하였다(그림 2A). 종합적으로, 1시간 동안의 +9 Gz 과중력 단일 자극은 자극 후 6시간 동안 다른 신호가 아닌 AMPKα를 저해하였고, 이러한 AMPKα 저해 효과는 반복적인 과중력 자극 훈련에 의해 극복되었다.

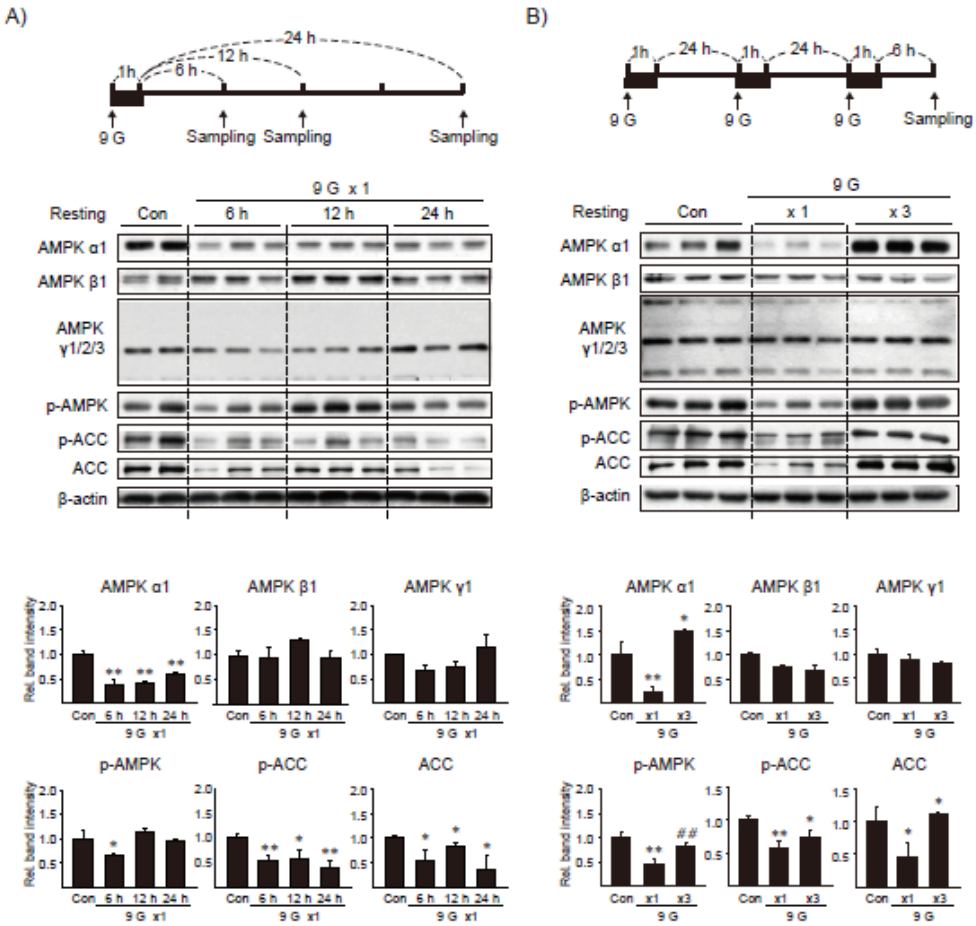


Figure 2. AMPK subunit levels and its signal intensity after load(s) to +9 Gz hypergravity.

(A, B) Immunoblottings for AMPKα 1, β 1, γ 1/2/3, p-AMPK, p-ACC and ACC in liver homogenates (Top). C57BL/6 mice were subjected to a single load to + 1 Gz (control, Con) or + 9 Gz for 1 h (x1), or to three consecutive daily loads (x3), and the liver samples were obtained at the indicated times after treatment. Of six different samples, two or three representative lanes were shown in each group.

Scanning densitometry was done to assess relative changes (bottom). Data represent the mean± S.E (N = 6 each). Statistical significance of the differences was determined as compared to control group (*P < 0.05, **P < 0.01) or to a single load to + 9 Gz (##P < 0.01).

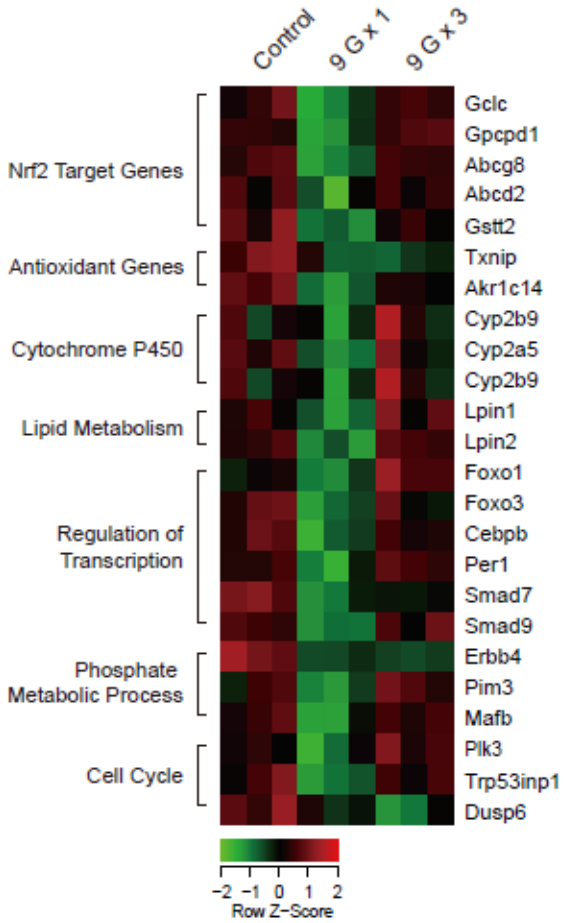
1-3. cDNA 마이크로 어레이 분석을 통한 +9 Gz 과중력 자극의 영향을 받는 유전자 분석

과중력 자극에 영향을 받는 유전자를 찾기 위해, 단일 또는 다중 과중력 자극(1시간 동안 +9 Gz 자극 후 6시간)이 주어진 생쥐의 간을 사용하여 cDNA 마이크로 어레이 분석을 수행했고, 마이크로 어레이 프로파일을 비교하였다(그림 3A). 마이크로 어레이 결과로 나타난 유전자 중 $P<0.05$와 1.5배 이상 변화한 유전자에 대한 컷오프를 적용하였을 때 221개의 유전자가 +9 Gz의 자극에 의해 유의미하게 변화함을 발견하였다. Differentially Expressed Genes (DEGs) 분석을 이용한 생체정보 분석을 통해 단일의 과중력 자극에 의해 Nrf2 표적 유전자, 항산화 유전자, 사이토크롬 P450, 지질대사, 전사적 조절 또는 세포주기 조절과 관련된 유전자를 포함하는 발현이 억제되는 유전자를 찾을 수 있었다(그림 3B). DEG 분석에서 +9 Gz의 자극이 Nrf2 표적 유전자와 다른 두 항산화 유전자의 그룹을 억제하는 것을 발견하였다. Nrf2 표적 유전자는 모두 단회 과중력 자극에 의해 현저하게 억제되었고 반복된 다중 자극 훈련에 의해 복원되었다. 항산화 유전자 중에서, Akr1c14 mRNA 수준은 Nrf2 표적 유전자의 경향과 유사하였다. 이와는 대조적으로, +9 Gz 과중력 자극에 의해 억제되었던 Txnip mRNA 발현량은 +9 Gz의 3회 반복 자극 후에 기저로 돌아가지 못하였다. 역전사-폴리머레이즈 연쇄반응(qRT-PCR) 분석을 통해 Nrf2 표적 유전자(Gclc, Gpcpd1, ABCp8, Abcd2 및 Gstt)의 유의적인 억제를 확인하였고, Txnip의 변화 경향 또한 동일하게 발생하였음을 확인하였다.

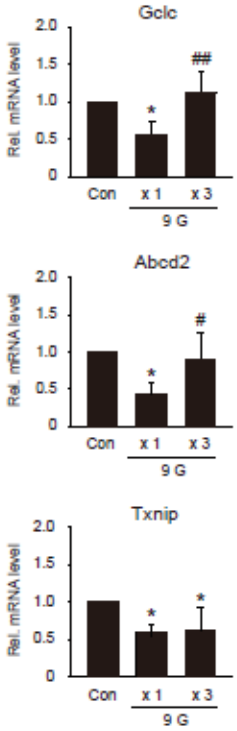
+9 Gz 단 회 또는 반복 자극에 의한 Nrf2 의존적 또는 비의존적 유전자의 발현 차이를 통해 과중력에 의한 적응적 복구 과정에 있어 Nrf2와 AMPKα 사이의 상관 관계를 탐구하도록 하였다. 면역화학 측정 방법을 통한 실험에서

Nrf2 수준은 과중력에 대한 자극 후 휴식 시간 동안 유의하게 변하지 않았다(그림 4A). +9 Gz 반복 자극 또한 Nrf2 수준을 변경하지 않았다. 다음으로, Nrf2 유전자 결핍 동물을 사용하여 Nrf2가 AMPKα의 적응적 변화에 미치는 영향을 평가하였다. 흥미롭게도, Nrf2 유전자 결핍 동물에서는 3회 +9 Gz 과중력 훈련된 간에서 AMPKα의 복원을 완전히 중단시켰다(그림 4B). 이러한 현상은 AMPK 와 ACC 인산화의 정도를 통해 재확인할 수 있었다. 이상의 결과는 Nrf2가 과중력 스트레스에 대한 간에서의 AMPKα와 신호 경로의 적응적 회복에 필수적임을 나타낸다.

A)



C)



B)

	Gene symbol	Gene name	9Gx1/con FC	9Gx1/con adj.pval	9Gx3/con FC	9Gx3/con adj.pval
Nrf2 Target Genes	Gclc	glutamate-cysteine ligase	-1.538	0.009	-1.018	1.000
	Gpcpd1	glycerophosphocholine phosphodiesterase GDE1	-1.805	0.000	-1.105	1.000
	Abcg8	ATP-binding cassette, sub-family G	-2.169	0.000	-1.067	1.000
	Abcd2	ATP-binding cassette, sub-family D	-1.627	0.000	-1.158	1.000
	Gstt2	glutathione S-trasferase theta 2	-1.875	0.000	-1.366	0.116
Anti-oxidant	Akr1c14	aldo-keto reductase family 1	-1.564	0.000	-1.214	0.817
	Txnip	Thioredoxin interacting protein	-1.889	0.000	-1.963	0.000

Figure 3. cDNA microarray and qRT-PCR assays.

(A) Heat map. cDNA microarray analyses were done on RNA samples extracted from the liver. Mice were subjected to a single load to + 1 Gz (control, Con) or + 9 Gz for 1 h, or to three consecutive daily loads, and the liver samples were obtained 6 h after treatment (N = 3 each). (B) Relative changes and significance values for the transcripts of a subset of genes targeted by Nrf2 and two Nrf2-independent antioxidant genes. (C) qRT-PCR assays for Gclc, Abcd2 and Txnip in the liver. Data represent the mean± S.E (N = 4 each). Statistical significance of the differences was determined as compared to control group (*P < 0.05) or to a single load to + 9 Gz treatment (#P < 0.05, ##P < 0.01).

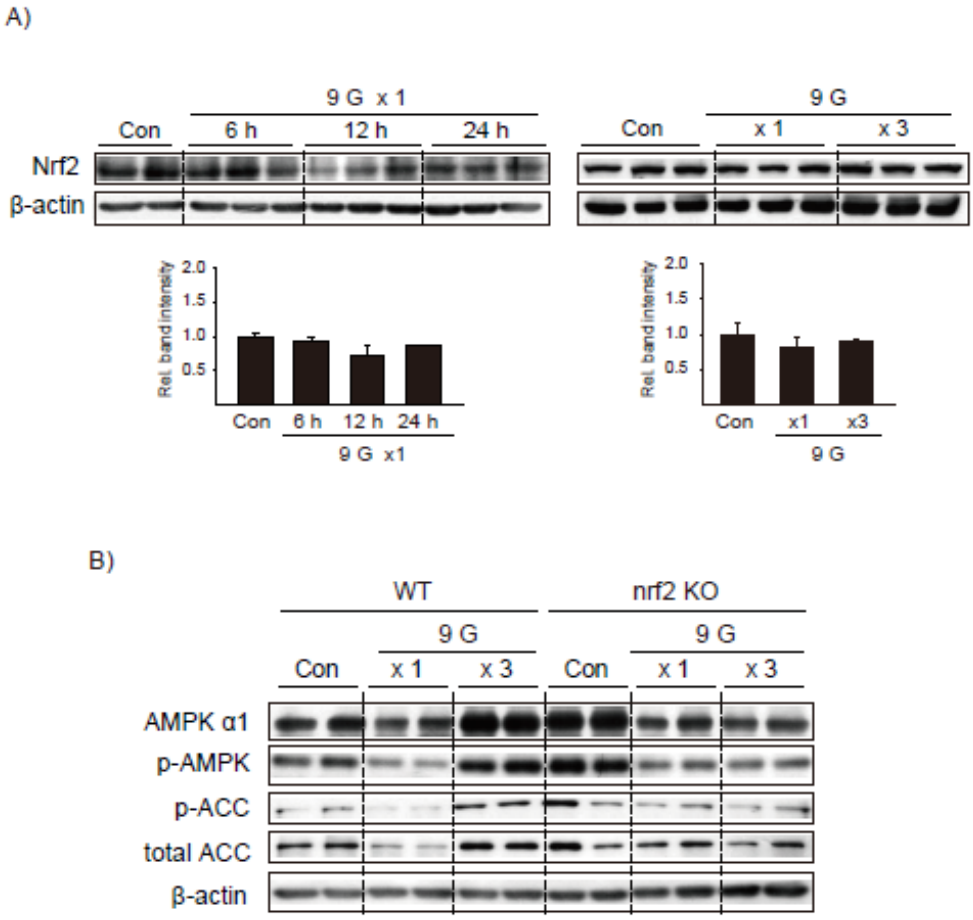


Figure 4. Nrf2 levels after load(s) to +9 Gz and the effect of Nrf2 gene knockout on AMPK.

(A) Immunoblottings for Nrf2 in the liver. Mice were treated as described in the panels to Fig. 2. Of six different samples, two or three representative lanes were shown in each group. Data represent the mean± S.E (N = 6 each). No statistical significance of the differences was found between each treatment group and control. (B) Immunoblottings on the liver samples. C57BL/6 mice (wild type) or Nrf2 gene

knockout (KO) mice were treated as described in the panel A to Fig. 3. Of three different samples, two lanes were shown in each group.

1-4. +9 Gz 과중력 자극 후 간 손상 지표의 변화

이후 실험에서 +9 Gz 과중력 자극이 가해진 간 조직에서 세포생존 지표를 측정하여 간세포 기능을 악화시키는지 여부를 확인하였다. 총 PARP-1 함량은 검사 시간 동안 cleaved PARP-1의 증가에 따라 현저하게 감소되었다(그림 5A 상부). 시간 포인트 중에서, cleaved PARP-1은 +9 Gz 단일 자극 후 6시간 이후에 가장 뚜렷하게 증가하였다. 이와 동일하게, 세포분열을 나타내는 말단 소실인 cleaved caspase-3는 12시간에서 크게 상승하였고, 마찬가지로 Bcl2 수준도 감소하였다. 총 Akt는 6시간 이후 p-Akt 발현량(Ser473/Thr308)의 변화와 유사하게 감소되었다. 추가적으로 세포사멸 또는 세포생존표지의 변화 또한 동일하게 발생함을 확인하였다. 반복되는 과중력 자극에 대한 적응도 분자 지표에 의해 검증되었다(그림 5B).

간세포 손상을 확인하기 위해, 다음으로 휴식 기간 동안 혈액 내 지표들의 시간 흐름에 따른 변화 프로파일을 조사하였다. ALT 및 AST 수치는 +9 Gz 단일 자극 후 6시간 후 가장 높게 증가되었다가 24시간에 가까워질 수록 점차 정상으로 돌아왔다(그림 5C). ALT 및 AST 수치 증가는 과중력 3회 반복 자극에 노출된 동물에서 발견되지 않았으며, 이는 반복 자극을 통한 훈련이 적응을 유도한다는 것을 확인하였다. 혈당 수치는 +9 Gz 과중력 자극 후 32%-37%가 6시간 또는 12시간 감소했으며, 24시간에 정상 범위로 복귀하여 간 기능 장애의 정도를 통해 예상되는 포도당 신생합성 억제 효과와 일치하였다(그림 5D). 반복적인 과중력 자극 훈련에 의해 저혈당증 또한 극복됨을 확인하였다. 전반적으로, 본 연구의 결과는 +9 Gz에 대한 자극이 세포 사멸 캐스케이드를 유발하여 간세포 생존을 감소시키며, 다중 과중력 자극을 통한 훈련으로 극복될 수 있는 근거를 보여준다.

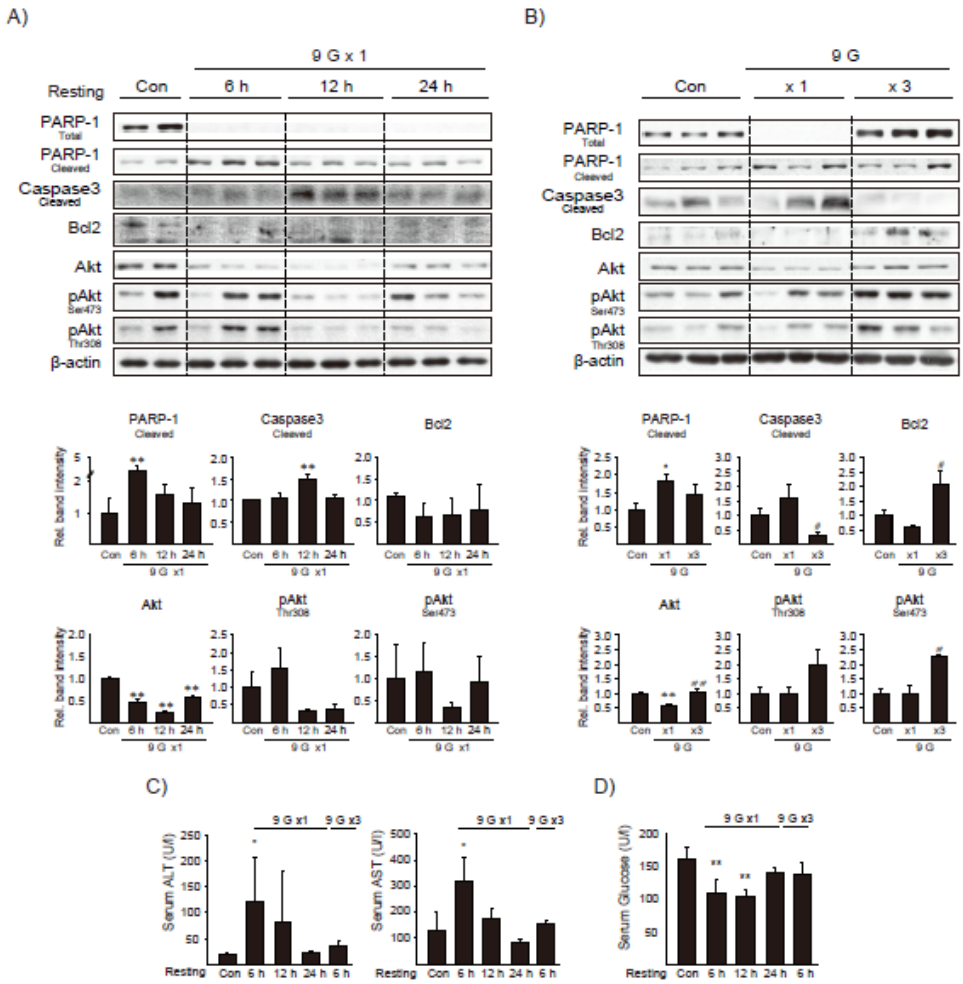


Figure 5. The effects of +9 Gz load(s) on the markers associated with hepatocyte viability or blood glucose contents.

(A,B) Immunoblottings for the molecules associated with apoptosis or cell survival in the liver. Mice were treated as described in the panels to Fig. 2. Of six different samples, two or three representative lanes were shown in each group. (C) Serum transaminase activities. (D) Serum glucose levels. For A-D, data represent the mean± S.E (N = 6 each). Statistical significance of the differences was determined

as compared to control group (*P < 0.05, **P < 0.01) or to a single load to + 9 Gz (#P < 0.05, ##P < 0.01).

1-5. 단일 또는 다중 +9 Gz 자극 후 전사 인자 및 미토콘드리아 지표

간에서 단일 또는 다중 +9 Gz 자극에서 전사 인자의 발현 변화를 측정하였다. STAT3, CREB, FOXO1 및 FOXO3는 IL-6 및 인슐린/IGF-1/PI3K 경로와 관련이 있기 때문에 확인하였다.

+9 Gz 과중력 단일 자극은 대부분 전사 인자 또는 그 인산화 수준을 억제하였다(그림 6A). +9 Gz 다중 자극 모델에서는 6시간 후에 복구되거나 오히려 향상되었다(그림 6B). 또한 이러한 결과는 조사된 대부분의 전사 인자가 과중력 자극에 의해 억제되었고 반복 자극 후에 발현 수준이 복원되거나 향상됨을 보였다.

간에서 +9 Gz 과중력 자극이 지속적이고 유의미하게 AMPKα를 억제하므로, 미토콘드리아 산화 기능 및 연료 활용의 지표로 SIRT와 과산화증식기 활성화 수용체 β 공동활성기(PGC-1))를 추가로 결정하였다. SIRT1, SIRT3, PGC-1a 발현량은 단일 또는 다중 자극에서 +9 Gz 과중력 자극에 의해 바뀐 후 일정하게 변하지 않았다(그림 7A와 B).

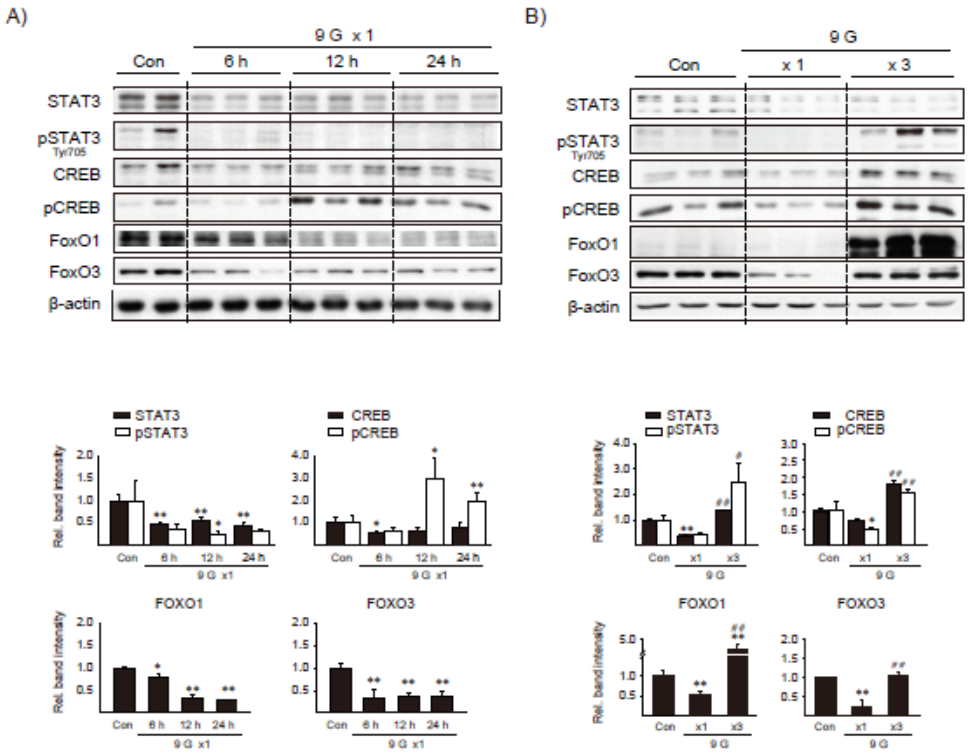


Figure 6. The effects of +9 Gz load(s) on hepatic transcription factors.

(A, B) Immunoblottings for major transcription factors in the liver. Mice were treated as described in the panels to Fig. 2. Of six different samples, two or three representative lanes were shown in each group. Data represent the mean± S.E (N = 6 each). Statistical significance of the differences was determined as compared to control group (*P < 0.05, **P < 0.01) or to a single load to + 9 Gz (#P < 0.05, ##P < 0.01). Con, control.

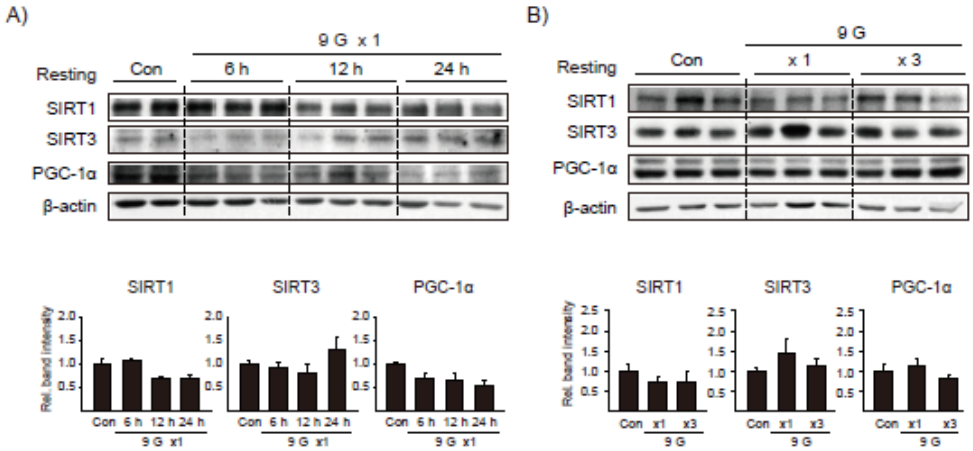


Figure 7. The effects of +9 Gz load(s) on SIRT and PGC-1α levels.

(A, B) Immunoblottings for SIRT1, SIRT3, and PGC-1α . Mice were treated as described in the panels to Fig. 2. Of six different samples, two or three representative lanes were shown in each group. Data represent the mean± S.E (N = 6 each). No statistical significance of the differences was found between each treatment group and control. Con, control.

1-6. +9 Gz 과중력의 영향을 받는 분자 지표에 대한 고정/구속 효과

유인 우주선이 과중력 스트레스에 노출되는 경우에 우주 비행사나 제트 전투기들은 제자리에 고정된다. 그래서 과중력 모델에서 조사된 인자들에 대한 고정/구속의 영향을 추가로 평가하였다. 생쥐는 원통형 플라스틱 구속 장치 안에 1시간 동안 배치되었다가 6시간 동안 휴식을 취하게 되었다. 또 다른 세트에서는 생쥐가 3일 연속 유사한 구속/고정 장치에 배치되었다. 그러나 고정/구속만으로는 AMPKα 또는 과중력 자극에 의해 유의하게 변한 다른 분자들은 특별히 변화되지 않는 것을 발견하였다(그림 8). 전사 인자 분석에서 STAT3, CREB, FoxO 및 Nrf2 수준도 영향을 받지 않았다. 또한, SIRT1과 PGC-1a 또한 동일하게 변화가 없었다. 본 실험 결과는 생쥐의 단일 또는 다중 고정/구속(각각 1시간)이 +9 Gz 과중력 자극에 의해 영향을 받는 AMPKα 및 다른 지표의 수준에 유의한 영향을 미치지 않는다는 개념을 뒷받침한다.

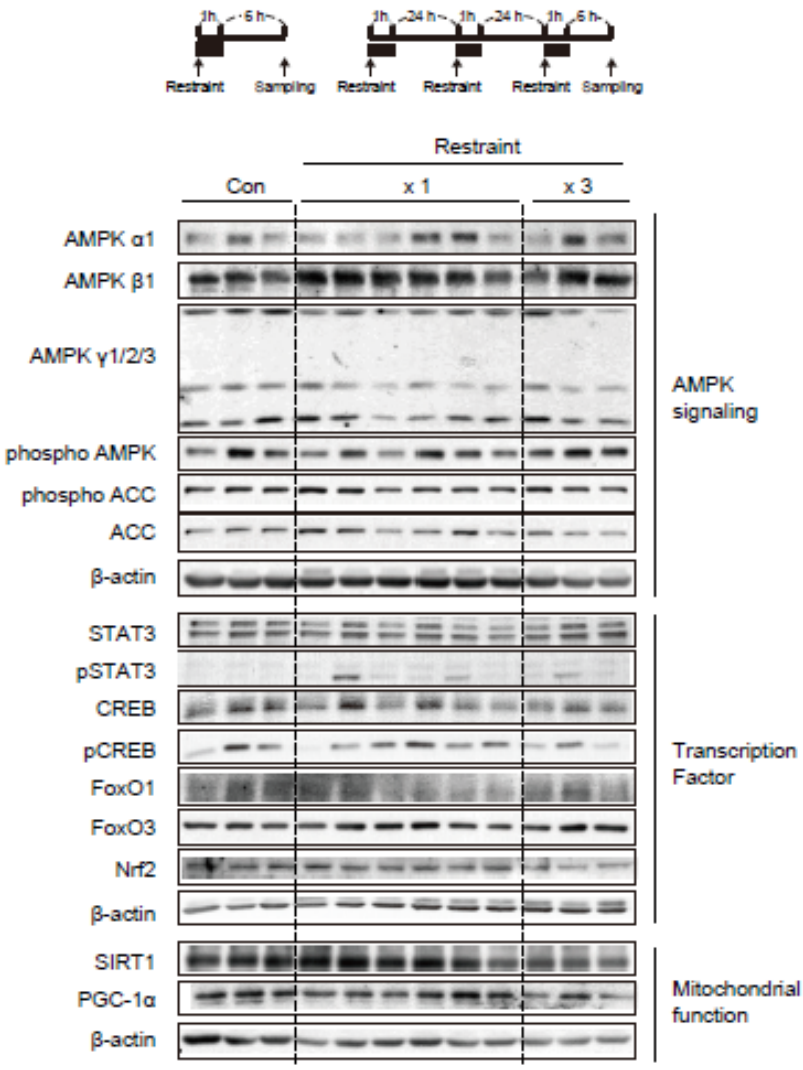


Figure 8. Immunoblottings for hepatic molecules in mice subjected to restraint stress.

C57BL/6 mice were exposed to either a single restraint stress (x1) or three consecutive daily stresses (x3), and the liver samples were obtained 6 h after treatment. Of six different samples, three or six representative lanes were shown in each group. Con, control.

2) 과중력 스트레스 후 알코올 폭음 섭취 모델에서의 AMPK의 역할과 간세포 생존 관련 전사 인자 조절

2-1. +9 Gz 과중력 자극과 폭음 섭취가 간 손상 지표에 미치는 영향

앞선 연구를 통해, 1시간 동안 +9 Gz 단일 자극이 6시간 동안 간세포 손상 표지자 발현량을 증가시켰고, 24시간 이후 점차 정상으로 돌아왔다. 여기서는 +9 Gz의 과중력 자극 직후의 폭음 섭취가 이러한 회복 효과를 악화시키는지 여부를 평가하였다(그림 9A). 총 Akt 수준은 대조군 또는 각 개별 처리와 비교하여 과중력 자극과 폭음 섭취로 인해 낮아졌다(그림 9B). 또한, Akt의 인산화 중 Thr308의 수준은 거의 완전히 낮아진 반면, Ser473에서는 p-Akt의 수준이 완전히 낮아지진 않았다. 또한 각 자극을 단독으로 주었을 때에 비해 과중력 자극과 폭음 섭취에 모두 노출된 동물에서 총 PARP-1 수준의 상당한 변화 발생함을 발견하였다(그림 9C). 간세포 사멸의 증가는 세포사멸에 작용하는 cleaved caspase-3의 변화를 통해 더욱 뒷받침되었다. 이러한 결과는 폭음 섭취가 +9 Gz의 과중력 스트레스를 받은 후 간세포가 점차 회복되는 것을 막는다는 것을 보여주었다.

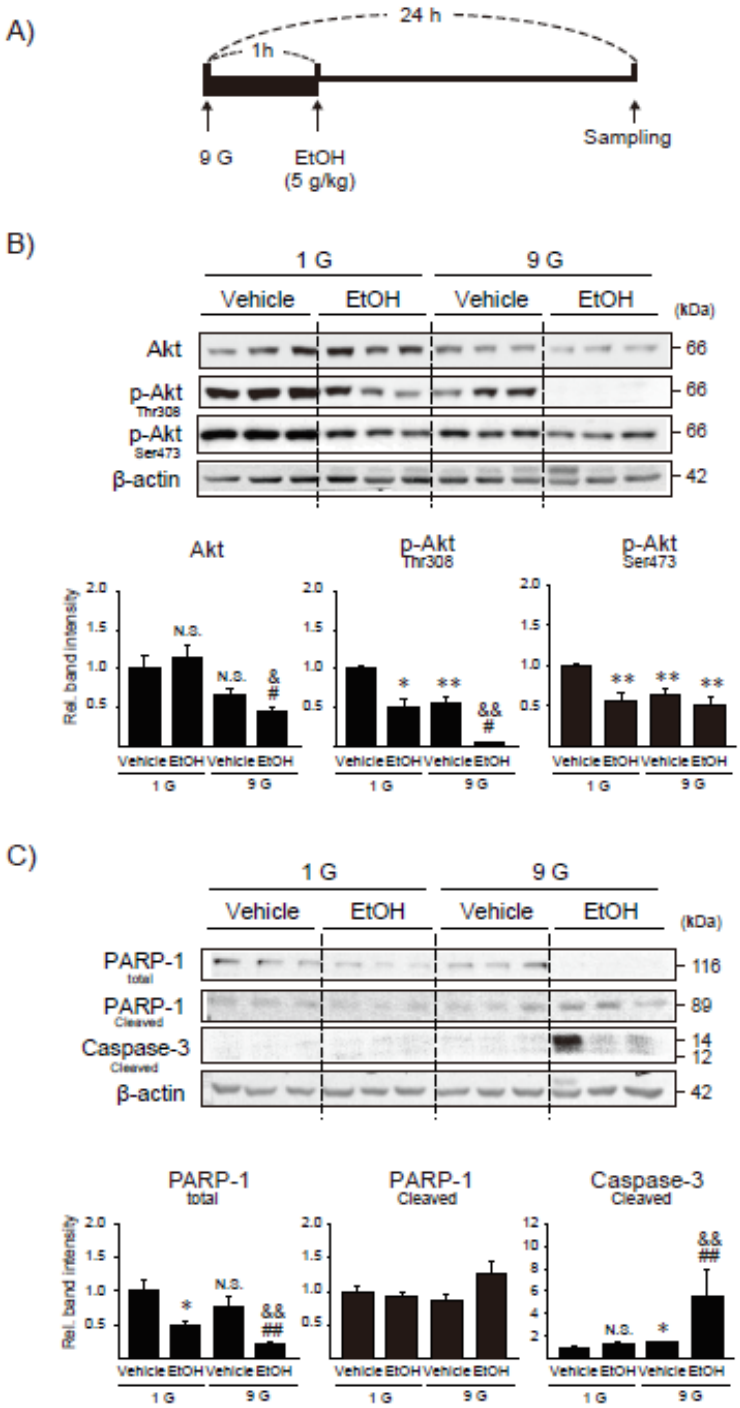

A)
24 h
1h
9 G
EtOH
(5 g/kg)
Sampling
B)
1 G
9 G
Vehicle
EtOH
Vehicle
EtOH
(kDa)
Akt
p-Akt
Thr308
p-Akt
Ser473
β-actin
66
66
66
42
Akt
p-Akt
Thr308
p-Akt
Ser473
Rel. band intensity
N.S.
N.S.
&
#
*
**
&&
#
**
**
**
Vehicle EtOH Vehicle EtOH
1 G
9 G
C)
1 G
9 G
Vehicle
EtOH
Vehicle
EtOH
(kDa)
PARP-1
total
PARP-1
Cleaved
Caspase-3
Cleaved
β-actin
116
89
14
12
42
PARP-1
total
PARP-1
Cleaved
Caspase-3
Cleaved
Rel. band intensity
*
N.S.
&&
##
N.S.
*
&&
##
Vehicle EtOH Vehicle EtOH
1 G
9 G

Figure 9. The effects of +9 Gz load plus binge alcohol intake on hepatocyte viability markers.

(A) Experimental scheme. **(B)** Immunoblottings for total Akt and p-Akt in liver homogenates. C57BL/6 mice were subjected to a single load to +1 Gz (1 G, Vehicle) or +9 Gz for 1 hour (9 G, Vehicle), or a binge alcohol intake following a single load to +1 Gz (1G, EtOH) or +9 Gz for 1 hour (9 G, EtOH), and the liver samples were obtained 23 hours after alcohol (or vehicle) treatment. Of 6 different samples, 3 representative lanes are shown in each group. **(C)** Immunoblottings for PARP-1 and caspase-3. Of 6 different samples, 3 representative lanes are shown in each group. Data represent the mean ± S.E (N = 3 each). For B and C, statistical significance of the differences was determined as compared to 1 G vehicle-treated group (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$), 1 G EtOH-treated group (#$p < 0.05$, ##$p < 0.01$), or 9 G vehicle-treated group (&$p < 0.05$, &&$p < 0.01$). EtOH, ethanol; N.S., not significant.

2-2. +9 Gz의 과중력과 폭음 섭취에 의한 AMPK 경로의 지속적 억제

앞서 에너지 항상성에 대한 세포 내 센서 인 AMPKα의 수치가 과중력 스트레스 후 초기 (6 시간)에 간에서 감소했으며, 시간이 지남에 따라 (24 시간)에 정상으로 돌아오는 것을 발견하였다. 폭음 섭취가 이 효과에 미치는 영향을 평가하기 위해 AMPKα 및 p-AMPKα 수준을 측정했으며, +9 Gz 과중력 또는 알코올 처리만으로는 거의 변화가 없었음에도 불구하고 24시간 동안 간에서 AMPKα 수준이 거의 완전히 감소하였다(그림 10A 및 B). AMPK 신호 경로의 감소는 p-AMPKα 수준의 변화에 의해 반영되었다. p-ACC 수준은 지속적으로 +9 Gz 와 폭음 섭취 자극에 의해서만 낮아져 AMPK 수치 억제를 확인하였다. AMPKβ와 γ1/2/3를 포함한 다른 지표들은 크게 바뀌지 않았다. 본 결과는 폭음 섭취가 +9 Gz 과중력의 스트레스로부터 적어도 24시간까지 AMPKα의 적응적인 회복을 막는 것으로 나타났다.

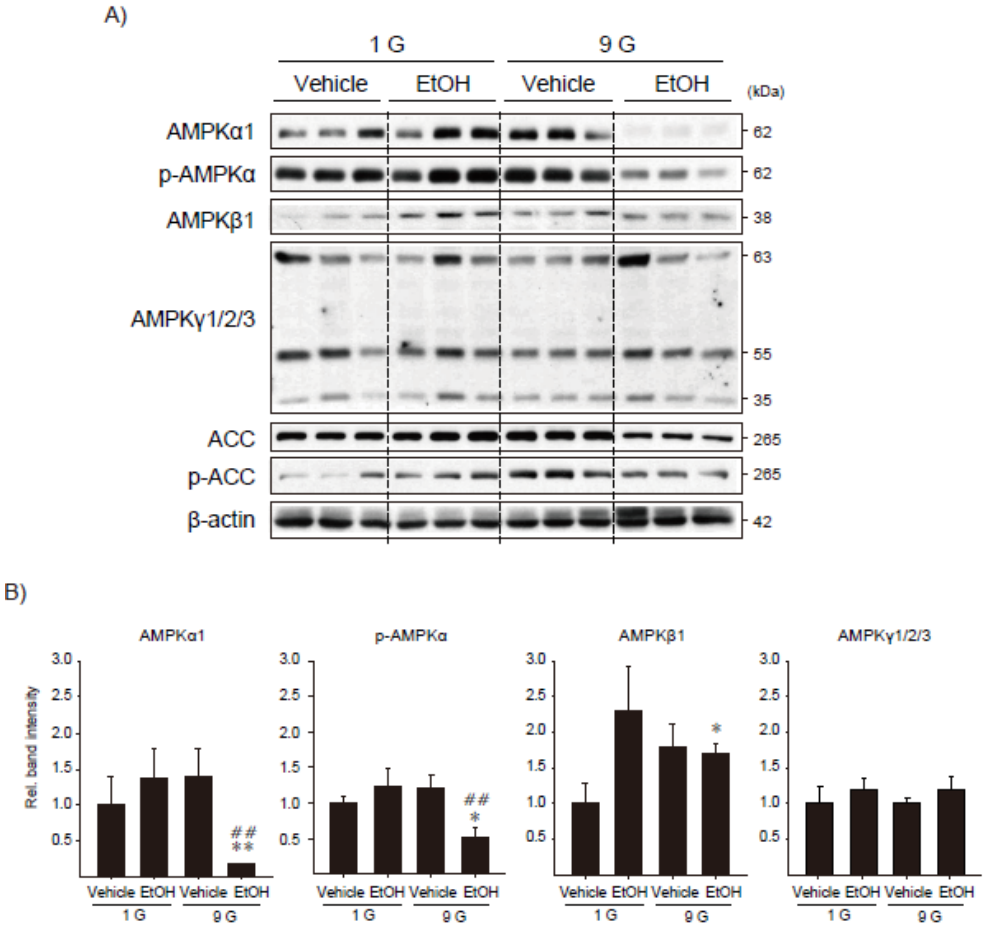


Figure 10. The levels of AMPK subunits and ACC intensities after +9 Gz load plus binge alcohol intake.

(A) Immunoblottings for AMPKα1, β1, γ1/2/3, p-AMPK, and ACC in liver homogenates. C57BL/6 mice were subjected to a single load to +1 Gz (1 G, Vehicle) or +9 Gz for 1 hour (9 G, Vehicle), or a binge alcohol intake following a single load to +1 Gz (1G, EtOH) or +9 Gz for 1 hour (9 G, EtOH). The liver samples were obtained 23 hours after alcohol (or vehicle) treatment. Of 6 different samples, 3 representative lanes are shown in each group. **(B)** Scanning

densitometry using the immunoblots. Data represent the mean ± S.E (N = 3 each). Statistical significance of the differences was determined as compared to 1 G vehicle-treated group (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$), 1 G EtOH-treated group (#$p < 0.05$, ##$p < 0.01$), or 9 G vehicle-treated group (&&$p < 0.01$). EtOH, ethanol; AMPK, AMP-activated protein kinase.

2-3. +9 Gz의 과중력과 폭음 섭취에 의한 미토콘드리아 표지 지표의 변화

앞서 1시간 동안 +9 Gz 과중력 자극 후 24시간의 회복기를 거치면 미토콘드리아 산화기능과 연료활용의 대표적 지표인 SIRT1, SIRT3 및 PGC-1 발현에 미치는 영향이 미미하였다. 흥미롭게도, 여기서 SIRT1 수치가 +9 Gz 과중력과 폭음(그림 11A와 B)의 조합 자극 후 24시간 후에 현저히 감소하는 것을 발견했는데, 이는 적응에 의한 회복이 부족하다는 것을 보여준다. SIRT3 수준도 1 Gz 군과 비교하여 억제되었지만 +9 Gz 단독 처치군과 비교하였을 때 유의미한 변화를 보이지 않았다. PGC-1α 수치는 과중력과 폭음과의 조합 자극으로 크게 감소하지 않았다. 이러한 결과는 +9 Gz의 과중력 자극 가한 후 알코올 폭음 섭취에 의해 미토콘드리아 산화 기능이 지속적으로 감소할 수 있다는 주장을 제기한다.

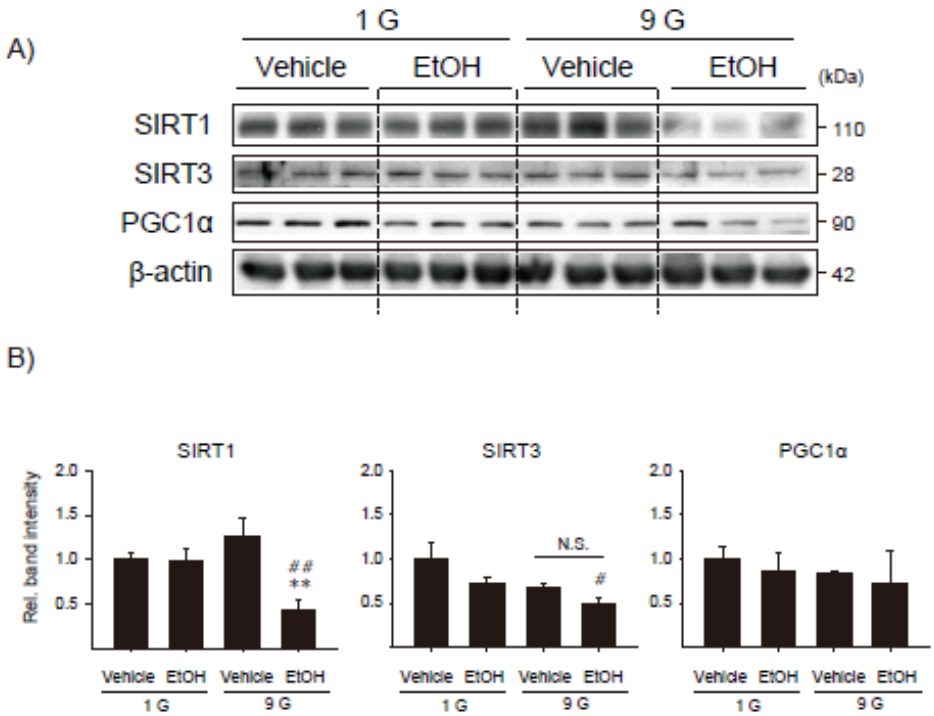


Figure 11. The effect of +9 Gz load plus binge alcohol intake on SIRT1/3 and PGC-1α levels.

(A) Immunoblottings for SIRT1, SIRT3, and PGC-1α. Mice were treated as described in the panels to Fig. 10. Of 6 different samples, 3 representative lanes are shown in each group. (B) Scanning densitometry using the immunoblots. Data represent the mean ± S.E (N = 3 each). Statistical significance of the differences was determined as compared to 1 G vehicle-treated group (*p < 0.05, **p < 0.01), 1 G EtOH-treated group (#p < 0.05, ##p < 0.01), or 9 G vehicle-treated group (&&p < 0.01). EtOH, ethanol; N.S., not significant; PGC-1α, proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha.

2-4. 간 내 주요 전사 인자에 대한 알코올과 과중력의 영향

이전에 과중력에 노출된 생쥐의 간을 사용하여 cDNA 마이크로 어레이 측정을 수행하였다. 과중력 자극에 의해 변화하는 주요 지표를 찾기 위해 마이크로 어레이 데이터베이스를 사용하여 GO(Gene Ontology) 분석을 수행하였다. 기능성 유전자 네트워크의 cDNA 미세배열 분석은 acute-phase response, cholesterol metabolic process, response to unfolded protein, cellular homeostasis, oxidation reduction, response to endogenous stimuli, regulation of cell differentiation, negative regulation of transcription, and regulation of apoptosis과 관련된 생물학적 과정의 변화를 보여준다(그림12A). unfolded protein response (UPR), acute-phase response, and oxidation reduction와 관련된 기능 유전자 클러스터의 네트워크를 분석하여 STAT3, FOXO3, C/EBPβ를 포함한 관련 전사 인자 유전자를 도출할 수 있었다(그림 12B).

이후 이를 기반으로 전사 인자 단백질 수준의 변화를 확인하였다. STAT3, FoxO3, FoxO1, C/EBPβ, CREB 및/또는 그 인산화 형태는 모두 +9 Gz 과중력과 에탄올의 조합 처리 후 24시간 동안 간에서 현저히 억제되었다(그림 13A와 B). 반면 각각의 개별적인 자극은 유의미한 변화를 나타내지 못하였다. 참고로 +9 Gz 과중력만으로도 p-STAT3가 감소하였다.

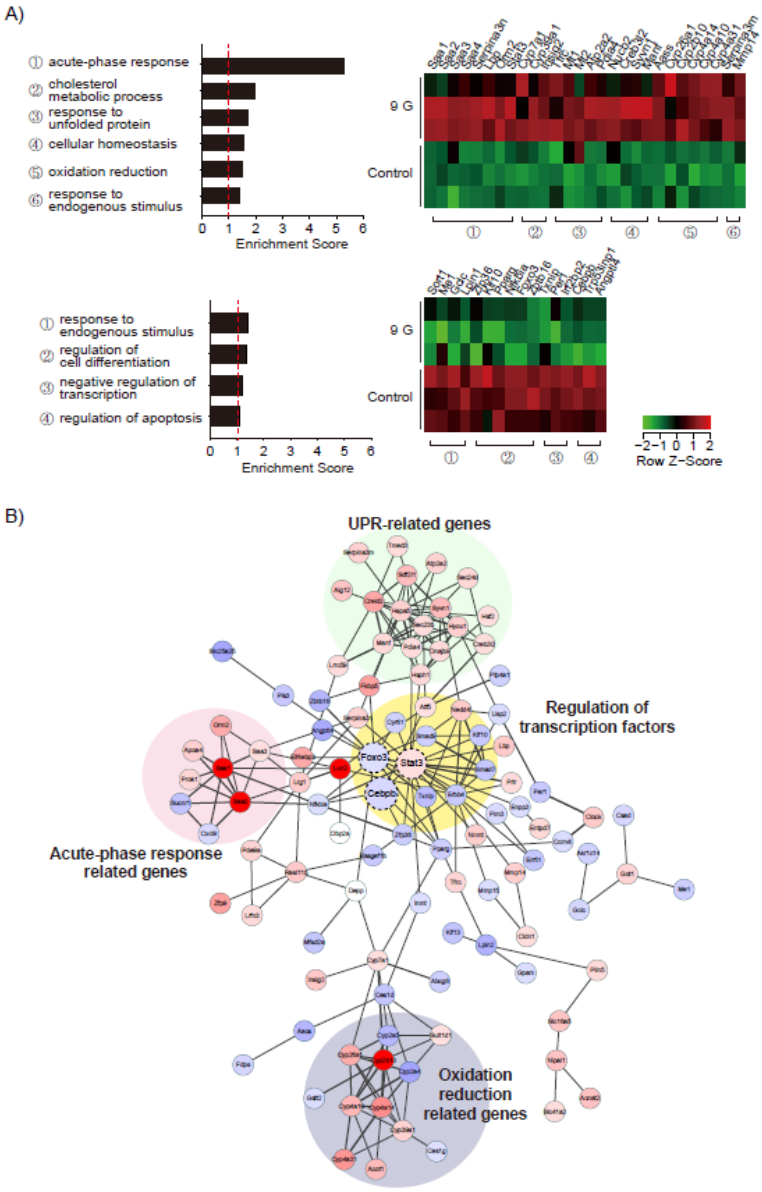


Figure 12. Gene ontology (GO) terms and a gene expression network

(A) cDNA microarray analyses using RNA samples extracted from the liver 6 hours after a single load to +1 Gz (control, Con) or +9 Gz for 1 hour. Enriched pathways and gene set enrichment analysis (GSEA) are shown (left). Heat map with selected

genes inside GO categories is listed (right). **(B)** A network of genes up- or down-regulated 6 hours after +9 Gz hypergravity stress for 1 hour. The colors of each node indicate amounts of expression. Red, up-regulated; blue, down-regulated.

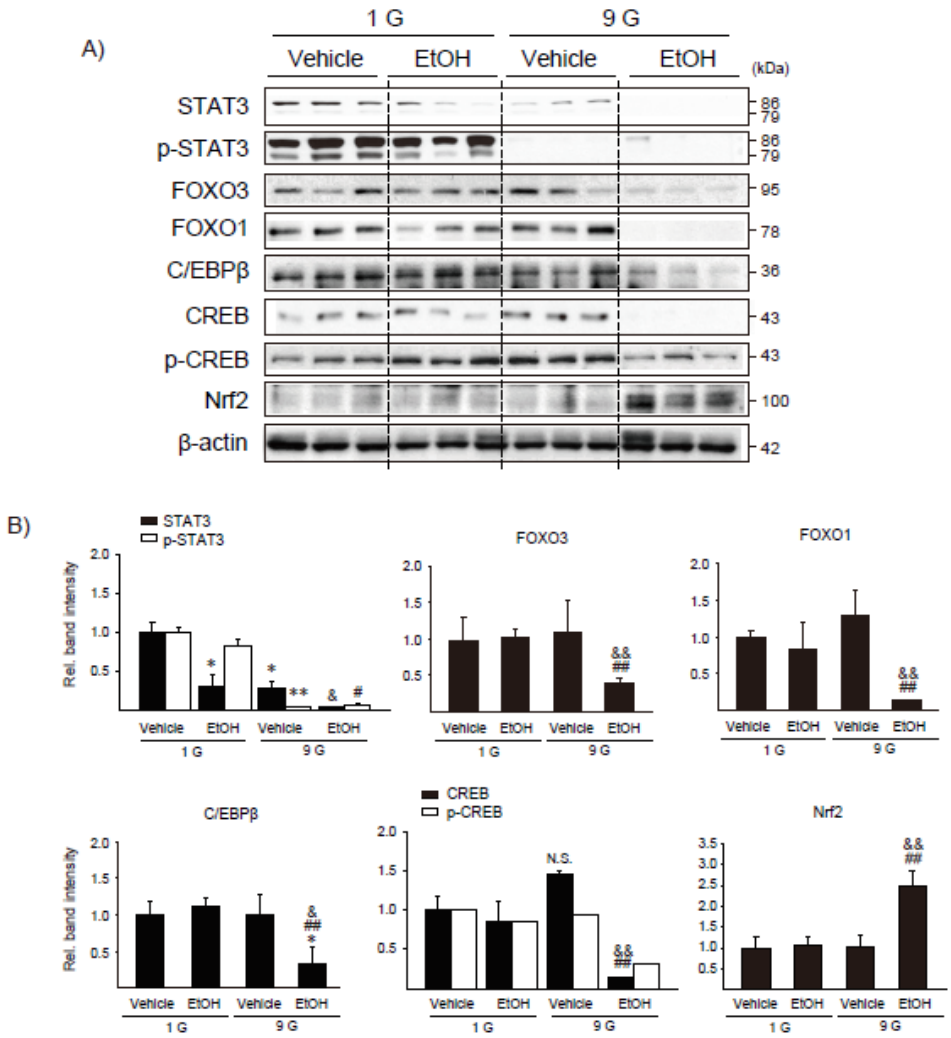


Figure 13. The effects of +9 Gz load plus binge alcohol intake on liver transcription factors.

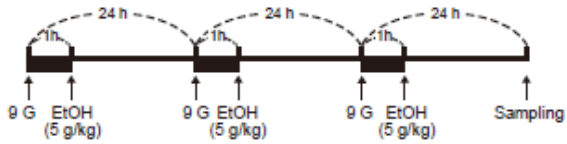
(A) Immunoblottings for STAT3, FOXO3/1, C/EBPβ, and CREB in liver homogenates. Mice were treated as described in the panels to Fig. 2. Of 6 different samples, 3 representative lanes are shown in each group. **(B)** Scanning densitometry using the immunoblots. Data represent the mean ± S.E (N = 3 each).

Statistical significance of the differences was determined as compared to 1 G vehicle-treated group (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$), 1 G EtOH-treated group (#$p < 0.05$, ##$p < 0.01$), or 9 G vehicle-treated group (&$p < 0.05$, &&$p < 0.01$). EtOH, ethanol.

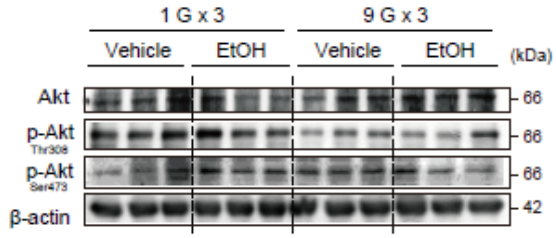
2-5. 3회 반복 과중력과 폭음 섭취 자극의 영향

앞선 결과를 통해 반복적인 과중력 자극이 생체 적응 능력을 증가시킨다는 점을 확인하였다. 과중력과 폭음 섭취의 조합 자극에 의한 시너지 효과를 고려하여, 3회 반복된 폭음 섭취와 +9 Gz 과중력 자극이 적응 능력에 미치는 영향을 평가하였다(그림 14A). 흥미롭게도, 과중력과 함께 폭음 섭취 3회 반복 자극은 간세포 손상이나 관심 분자의 억제 (p-Akt, AMPKα 발현 및 그 하위 분자 또는 간 전사 인자의 회복)를 일으키지 않았다. (그림 14B-D). 반면 SIRT1, SIRT3 and PGC-1α 와 같은 지표들은 조금의 차이만을 보였다. (그림 13E). 이러한 결과는 반복된 다중 자극 훈련이 알코올 폭음으로부터의 간 보호 능력을 제공한다는 가설을 뒷받침한다.

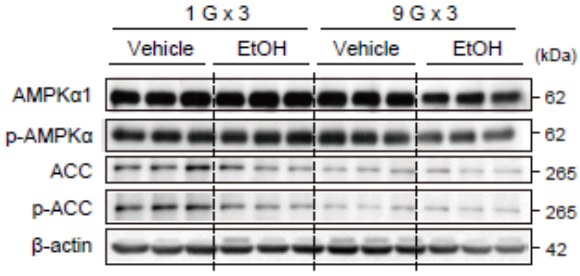
A)


24 h
24 h
24 h
1h
1h
1h
9 G
EtOH
(5 g/kg)
9 G
EtOH
(5 g/kg)
9 G
EtOH
(5 g/kg)
Sampling

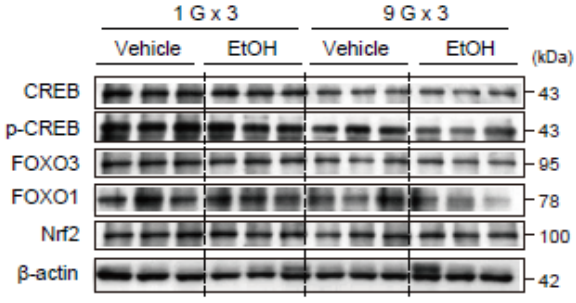
B)


1 G x 3
9 G x 3
Vehicle
EtOH
Vehicle
EtOH
(kDa)
Akt
p-Akt
Thr308
p-Akt
Ser473
β-actin
66
66
66
42

C)


1 G x 3
9 G x 3
Vehicle
EtOH
Vehicle
EtOH
(kDa)
AMPKα1
p-AMPKα
ACC
p-ACC
β-actin
62
62
265
265
42

D)


1 G x 3
9 G x 3
Vehicle
EtOH
Vehicle
EtOH
(kDa)
CREB
p-CREB
FOXO3
FOXO1
Nrf2
β-actin
43
43
95
78
100
42

E)

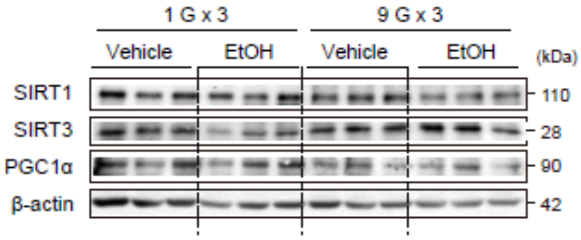

1 G x 3
9 G x 3
Vehicle
EtOH
Vehicle
EtOH
(kDa)
SIRT1
SIRT3
PGC1α
β-actin
110
28
90
42

Figure 14. The effects of repetitive +9 Gz loads plus binge alcohol intakes.

(A) Experimental scheme. **(B)** Immunoblottings for total Akt and phosphorylated Akt in liver homogenates. C57BL/6 mice were subjected to 3 consecutive daily loads to +1 Gz (1G x 3, Vehicle) or +9 Gz for 1 hour (9 G x 3, Vehicle), or binge alcohol intakes following 3 consecutive daily loads to +1 Gz (1G x 3, EtOH) or +9 Gz for 1 hour (9 G x 3, EtOH). The liver samples were obtained 23 hours after last alcohol (or vehicle) treatment. Of 6 different samples, 3 representative lanes are shown in each group. **(C–E)** Immunoblottings for the targets of interest using the same liver homogenates. EtOH, ethanol.

3) 과중력 스트레스와 아세트아미노펜 자극에 의한 신장 독성

3-1. APAP 자극과 결합된 단일 과중력 자극과 관련된 신장 손상

과중력 스트레스 단독 또는 아세트아미노펜(APAP) 병용 자극이 신장에 미치는 영향을 이해하기 위해 간에 미치는 영향의 분석과는 달리+9 Gx 과중력 동물 모델을 사용했으며, 그 후 신장 조직에 대한 형태학적 및 분자적 분석을 수행하였다. TUNEL(Terminal deox-ynucleotidyl transfered UTP nickend labeling) 염색 분석 및 헤마토실린 및 에오신(H&E) 염색 분석 결과 과중력 또는 APAP 단독 자극에 비해 APAP 처치와 결합된 단일 과중력 자극에 노출된 생쥐에서 TUNEL 양성 세포 및 손상된 관상 상피 세포의 강도가 증가한 것으로 나타났다. 마찬가지로, 결합된 자극에 노출된 동물에서 혈청 크레아티닌(신장 부상에 대한 혈청 지표) 함량이 크게 증가한 반면, 과중력 또는 APAP 자극만으로는 별다른 영향을 주지 않았다. 또한 본 연구에서는 세포 생존 지표인 pAKT 및 pCREB 수준을 분석하였다. 예상한 바와 같이, pAKT(Ser473) 수준은 단일 과중력 자극, APAP 자극 단독 또는 이들의 조합에 의해 억제되었다. 더욱이, APAP 자극과 결합된 단일 과중력 자극은 각 자극에만 비해 pCREB 수준을 훨씬 더 낮추는 것으로 보인다. 마찬가지로, 정량적 qRT-PCR 분석에서는 APAP와 결합된 단일 과중력 자극이 단일 중력의 자극 또는 APAP에 비해 Kim-1(신장 손상 지표)과 Bax(세포사멸 유전자)의 수준을 현저하게 향상시켰다는 증거를 제공한다. 단독 또는, 과중력과 APAP에 모두 노출된 동물에서 Bcl2(항세포사멸 유전자)의 발현 수치가 현저하게 감소하였다. 이러한 결과를 바탕으로, APAP 자극과 결합된 단일 과중력 자극이 신장 부상과 기능 장애를 시너지적으로 악화시킬 수 있다는 가설을 세웠다.

3-2. APAP 처리와 결합된 단일 과중력 자극에 의한 ER 스트레스 유도

다음으로, 단일 과중력 자극 및 APAP 처리에 노출된 생쥐의 간에서 얻은 데이터 세트를 사용하여 이 조합의 영향을 크게 받는 유전자 온톨로지(GO) 그룹을 분석하였다(그림 15A). DAVID 데이터베이스를 사용한 GO 분석은 ER 관련 경로에서 DEG를 식별할 수 있도록 하였다. 또한, Atf4, Atf6, Wfs1, Hspa5와 같은 ER 스트레스 관련 지표의 변경은 STRING 데이터베이스 네트워크 분석을 통해 확인하였다(그림 15B). 특히, ER 관련 분해, ER 스트레스, 단백질 전달과 관련된 유전자 클러스터들은 기능적으로 서로 연결되어 있었다. ER 스트레스 관련 40개 유전자의 네트워크가 추가로 표시되었다(그림 15C). 이 중 mannosidase alpha-like 2,3(Edem2,3), Atf4 및 Atf6은 잘 알려진 ER 스트레스 관련 유전자이다.

면역화학 분석에 따르면, 단일 과중력 자극과 APAP를 병용처치할때는 Grp78, p-PERK, IRE1a를 포함한 생쥐에서 ER 스트레스 지표를 크게 증가시켰으며, 과중력 또는 APAP 자극 단독만으로도 그들의 발현은 다소 증가하였다. 따라서, APAP 자극과 결합된 단일 자극 과중력 스트레스는 신장의 ER 스트레스를 상승적으로 악화시켜 신장 기능 장애를 초래할 수 있다는 점을 시사한다.

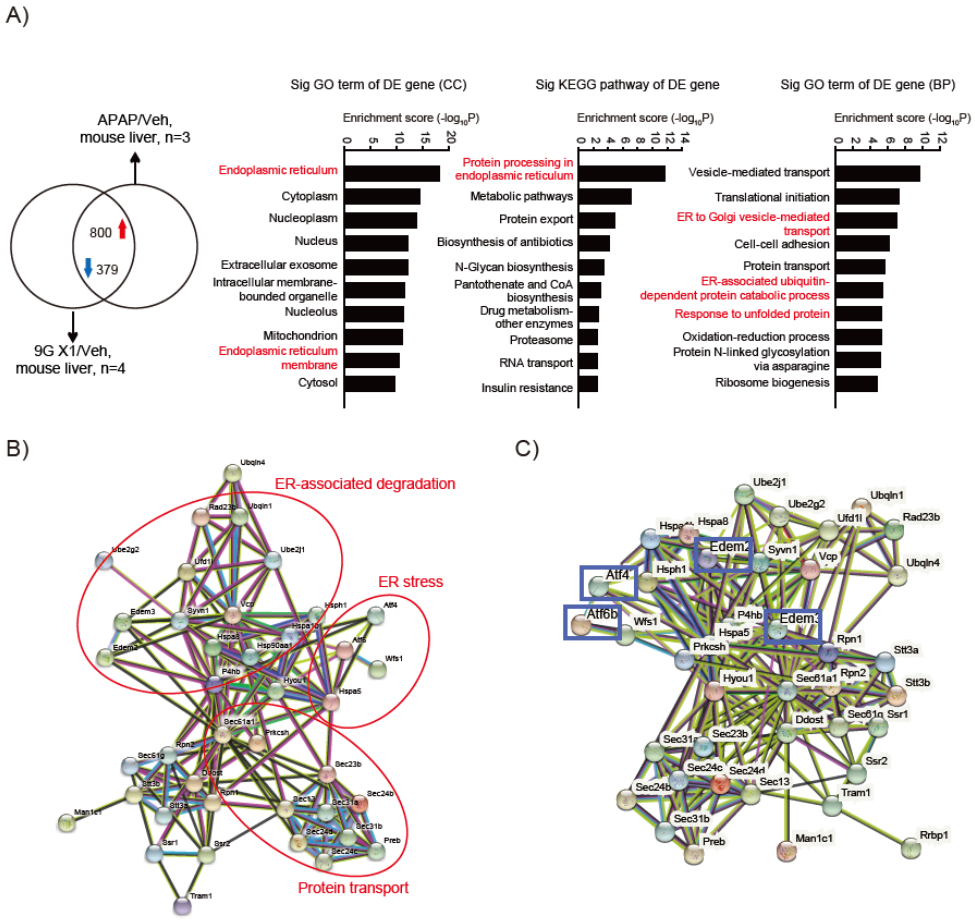


Figure 15. Increased ER stress in the kidneys of mice exposed to a single hypergravity load coupled with APAP treatment.

(A) Bioinformatic analysis of genes affected by +9 Gx load and APAP in mouse liver. The Venn diagram illustrates the DEG overlap according to the cDNA microarray data obtained from the analysis of mouse livers and RNA-seq analysis data for the liver of mice treated with APAP. DEG pathway enrichment analysis was conducted using the DAVID database. **(B)** Protein-protein interaction network. An interaction network for the DEGs of ER-related enriched pathways (marked in

red in panel A) was constructed using the STRING database. **(C)** The network of ER stress-related gene clusters. Boxes indicate well-recognized ER stress-associated genes

3-3. 반복 +9 Gx 과중력 자극 훈련을 통한 APAP 유도 신장 손상 감소

앞선 연구를 통해 다중 반복 과중력 자극(즉, 3개 자극)이 과중력 유도 스트레스에 대한 적응적 반응을 유도하여 생쥐에서 간손상을 유발하지 않는다는 것을 보고하였다. 여기서는 APAP 자극과 결합된 다중 과중력 자극이 신장 및 간 기능에 미치는 영향을 조사했으며, 결과를 APAP와 결합된 단 회 과중력 자극의 결과와 비교하였다. 위에서 언급한 바와 같이, 후자의 조합은 혈청 크레아티닌 함량을 크게 증가시켰다. 이와는 대조적으로 APAP와 결합된 다발성 과중력 자극은 혈청 크레아티닌 분석에 의해 결정되었기 때문에 신부전을 유발하지 않았고 오히려 APAP 자극과 비교할때는 신장 기능이 약간 개선되었다. 이것은 다중 과중력 자극이 APAP에 대항하여 신장에서 적응성 세포 보호 효과를 발휘할 수 있다는 것을 제시한다. APAP 단독으로 또는 단일 과중력 자극으로 조합하여 처리된 생쥐도 ALT 활성이 현저하게 증가하였다. 신장에서 관찰된 세포 보호 효과와 대조적으로, 과중력 훈련 그룹에 비해 ALT 수치 증가(간 부상의 지표)는 과중력과 APAP 자극이 모두 주어진 그룹에서 개선되지 않았다. 신장 내 Kim-1에 대한 qRT-PCR 평가는 과중력 자극 사전 조절의 신장 보호 효과를 강조하였다. 구체적으로, Kim-1 transcript 수준은 APAP와 단일 과중력 자극에 노출된 그룹보다 다중 반복 자극을 통해 훈련된 그룹에서 더욱 낮은 것으로 나타났다.

다중 과중력 자극이 신장 기능에 미치는 이로운 영향을 추가로 조사하기 위해, 세포 생존율과 ER 스트레스 지표를 신장 샘플에서 분석하였다. 예상한 바와 같이, APAP와 결합된 단일 과중력 자극에 노출된 생쥐에서 pAKT와 pCREB(생존 지표)의 수준은 저하되었지만, APAP와 결합된 다중 과중력 자극에 노출된 생쥐에서는 이러한 영향이 나타나지 않았다. 마찬가지로 Grp78, p-

PERK 및 IRE1a를 포함한 ER 스트레스 지표의 발현 수준은 APAP와 결합된 단일 과중력 자극에 노출된 생쥐에서 개별 노출에 비해 모두 더 컸다. 다시, 이러한 변화는 다중 과중력 자극을 받는 동물에서는 관찰되지 않았다. 결과적으로, 후자 그룹은 이전 그룹보다 ER 스트레스 지표 단백질 수준이 감소하였다. 앞선 연구에서 Nrf2는 다중 과중력 자극 모델에서 과중력 스트레스로 유도된 ROS 생성을 억제하는 데 중요한 역할을 한다는 것을 밝혔다. Nrf2의 역할과 ER 스트레스 및 ROS 생성의 확립된 연관성을 고려하여, STRING 프로그램을 사용하여 APAP를 처리된 생쥐의 간에서 얻은 데이터 세트를 추가로 분석한 결과 Nrf2 전사체 수준이 Sirt3, Ppara, Stat3, Hmox1을 포함한 세포 생존 마커 단백질과 밀접히 관련됨을 발견할 수 있었다. (그림 16). 이상의 결과를 종합할때, 과중력 자극의 반복 훈련은 ER 스트레스 감소와 관련하여 APAP에 의한 신장 손상으로부터 신장을 보호한다는 증거를 제공한다.

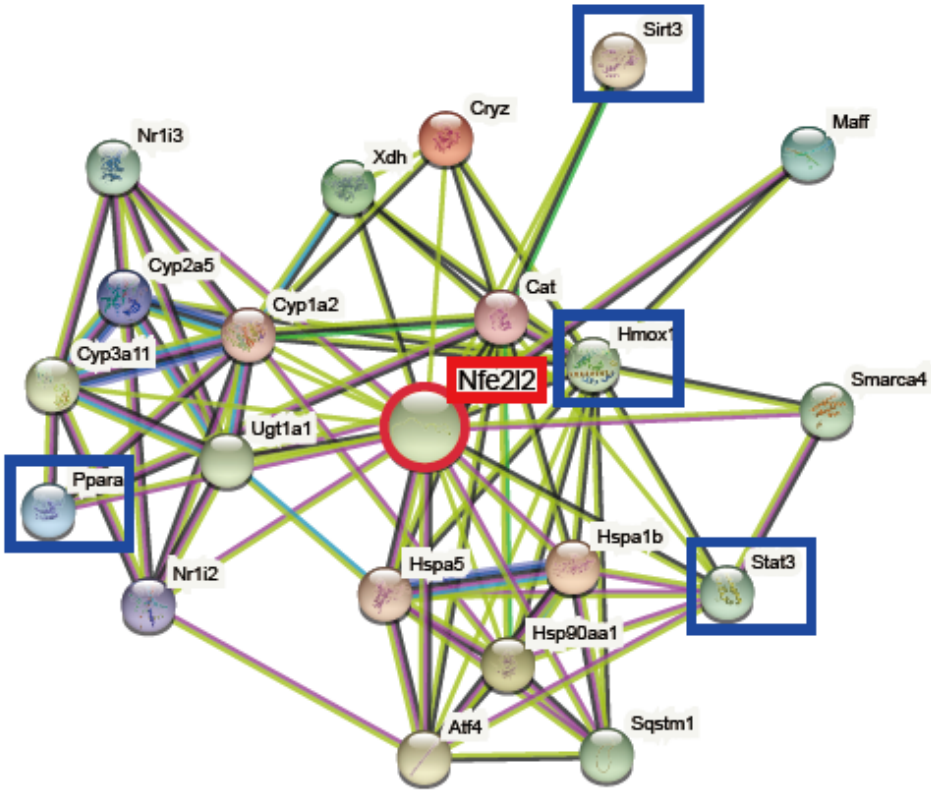


Figure 16. Effects of hypergravity preconditioning on kidney dysfunction, cell survival marker expression, and ER stress induced by APAP treatment. The network of genes linked to Nrf2 in the liver of mice treated with APAP and hypergravity. Blue boxes indicate representative cell-survival marker proteins.

3-4. 다중 과중력 자극 훈련에 의한 신장 내 miR-122 수치의 적응을 통한 증가

다음으로, 과중력 노출 및 APAP 적응과 관련된 분자들을 연구하여 신장에 대한 다중 과중력이 APAP 독성에 대한 선택적 세포 보호 효과를 뒷받침하는 메커니즘을 식별하기 위해 노력하였다. 상위 조절자가 여러 하위 유전자를 제어하기 때문에, 먼저 Ingenuity path analysis(IPA) 소프트웨어(QIAGEN)를 사용하여 대표 전사 인자를 예측하였다. 그림 15A(각각 800, 379개의 상·하 조절 유전자)에 나타난 1179개의 DEG 중 가장 영향을 많이 받는 유전자가 나열되었다(그림 17). ER 스트레스 조절자 (XBP1 및 ATF4) 및 세포 자멸사 관련 조절자 (TP63)는 상향 조절되는 반면, 항 세포 자멸사 관련 조절자 (HNF4A, SRSF2, FOXA1 및 SMAD7)는 하향 조절될 것으로 예측되었다. 이 결과는 ER 스트레스가 신장 세포 기능 장애에 미치는 영향을 뒷받침한다.

위의 데이터베이스 분석에서 miR-122는 고도로 억제된 상위 조절자 중 하나로 추가로 예측되었다. 위에서 설명한 다중 과중력 자극의 조직 특이 적 보호 효과와 간에서의 miR-122의 풍부한 발현과 다른 장기에게 공급되는 점, 급성 신장 손상에서의 microRNA 저하 (예: miR-122)에 대한 이전 연구 결과를 감안할 때 단일 또는 다중 과중력 자극 및 APAP 처리를 받은 동물의 신장과 간에서 miR-122 수준을 측정해보았다.

신장의 miR-122 수준은 단일 또는 다중 과중력 자극 또는 APAP 단독 처치에 의해 최소한의 영향을 받았다. 그러나 흥미롭게도 APAP 처치와 결합된 다중 과중력 동물군에서는 단독 처치군보다 신장에서의 miR-122 발현을 크게 증가시켰다. 신장의 pri-mir-122 수준은 처치 그룹과 비교하여 유의하게 다르지 않았으며, 이는 pri-mir-122 miRNA가 다른 기관에서 신장으로 전해지는 것

을 시사한다.

miR-122 발현이 간에서 가장 풍부하고 신장에서는 영향을 받지 않음을 감안하여 간에서의 miR-122 및 pri-miR-122 수준을 조사하였다. APAP 처치와 결합된 다중 과중력 자극이 간에서 miR-122 발현을 유의하게 증가시키는 반면, 단일 또는 다중 과중력 부하 또는 APAP 처치, 각각의 처치 군에서는 miR-122 발현에 유의한 영향을 미치지 않는다는 것을 발견하였고. 이 패턴 변화는 신장의 변화와 매우 유사하였다. 특히 APAP 처치와 다중 과중력 자극이 같이 주어졌을 때 대조군 또는 각각의 개별 군에 비해 간 pri-miR-122의 수준이 크게 증가되었다.

종합할 때, 본 결과는 다중 과중력 자극 및 APAP 처치가 간에서 pri-miR-122 생산을 촉진하고, 혈액 순환을 통해 순환하는 mature-miR-122는 신장 조직으로 이동하여 ER 관련 생리 기능을 조절할 수 있음을 시사한다.

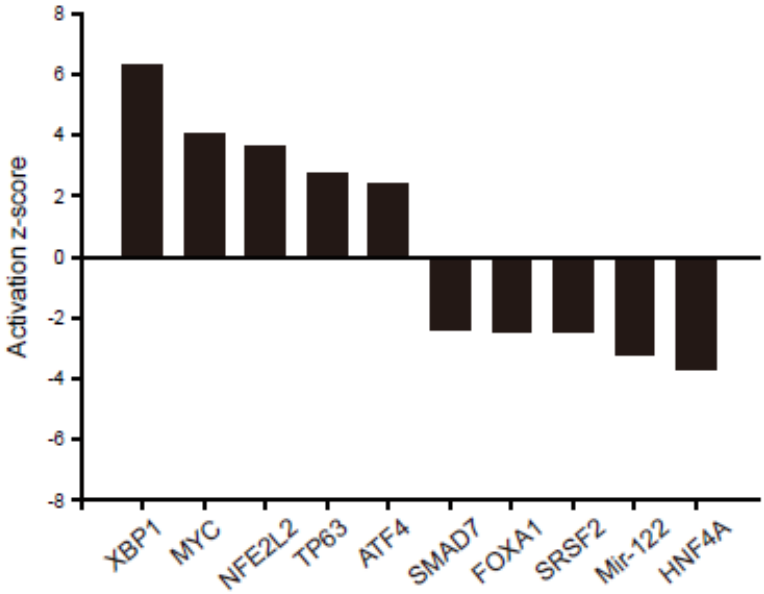


Figure 17. miR-122 and primary miR-122 levels in major organs of mice exposed to combined treatments of hypergravity load(s) and APAP and putative target genes of miR-122.

The upstream regulator analysis using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software (QIAGEN) from the 1179 overlapping DEGs (Fig.16A) that commonly up- (800 genes) or down- (379 genes) regulated by a single hypergravity load and by an APAP treatment.

IV. 고 찰

과중력에 노출되는 동안 발생하는 유해 반응을 방지하기 위해서는 과중력에 대한 생물학적 반응에 대한 이해가 중요하다. 본 연구에서는 동물 모델에서 머리에서 발까지 수직 축에 가해지는 힘인 +Gz 가속 중력이 신체에 미치는 영향을 평가하였다. 보고된 사망률과 동물 종의 질량에 대한 중력의 영향을 사용하여 만들어진 새로운 방정식은 인간에게 외삽될 수 있는 생쥐의 중력 자극을 추정할 수 있게 하였다. +3 또는 +9 Gz 자극에서 얻은 데이터는 인간이 해당 상황에서 발생하는 중력을 반영할 것으로 보인다. 과중력 스트레스가 +3 또는 +9 Gz 자극 직후 골격 근육이나 신장에 부상을 초래한다는 것을 발견하였다. 그러나 지표는 휴식 시간 동안 정상으로 돌아왔다. 이와는 대조적으로 +9 Gz의 과중력 스트레스는 휴식 시간 동안 간에 현저한 변화를 일으켜, 간 조직이 점진적으로 물리적 또는 압축적 스트레스에 취약할 수 있음을 암시하였다.

중력 변화는 압축 응력, 생물학적 반응의 장애 및 산화능을 변화시킬 수 있다. 간은 구 심성 혈관과 원심성 혈관의 서로 맞물리는 네트워크로 구성된 연속적인 스펀지 모양의 장기이며 식이섭취를 통해 흡수된 에너지원이 가장 먼저 유입되어 대사되는 기관으로써 외부의 에너지 상태의 변화를 인식하여 포도당의 저장 및 생합성을 통해 타 기관의 에너지 대사를 직접적으로 조절하는 핵심 장기이다. 따라서 간 조직은 물리적 또는 압축 스트레스와 같은 혈류역학적 변화에 더 민감할 수 있다. 항공 우주 우주선 발사 또는 이륙 중 간세포에 대한 직접적인 압력 변화, 세포 기관의 물리적 결합에 수반되는 영향 외에도, 혈류역학적 순환의 교란과 스트레스는 간에서의 대사 및

결과적으로 에너지 생산과 관련된 분자적 신호에 영향을 미칠 것이 예상된다. 본 연구 결과에서 +9 Gz의 과중력 자극은 에너지 대사와 관련된 분자의 수준에 심각한 영향을 미쳐 간 손상을 나타내는 혈액 생화학 지수를 변화시켰다. 마찬가지로, 과중력의 힘에 의해 유도되는 압력 스트레스는 간에서 세포자멸사 지표 수치를 증가시켰다. 혈청 아미노전이효소 수치는 압축 스트레스 이후 나중에 악화되어 간세포의 과중력 자극에 대한 부상 지연과 간 조직의 본질적인 취약성을 나타낸다. 간세포는 신진대사 또는 혈류역학적으로(예: 노화된 세포) 에너지 부족 또는 저산소증으로 인해 더 높은 중력에 취약할 것이라고 강조했으며, 이는 미래에 명확히 밝혀질 것이다.

간세포에서 AMPK는 AMP:ATP 비율의 변화에 대응하여 에너지 항상성을 위한 센서 역할을 한다. AMPK 활성화는 α 서브 유닛의 촉매 도메인의 Threonine-172 인산화를 일으켜 포도당신생합성과 글리코겐, 지방산 및 콜레스테롤 합성을 억제하여 연료 이용을 촉진하게 된다. + 9 Gz 과중력에 자극 후 6시간 경과 지점에서 AMPKα1/2가 크게 억제되는 결과는 간세포에서 점진적 대사 장애를 나타낸다. 과중력 스트레스로부터 간세포를 완전히 회복하기 위해서는 충분한 휴식 시간(즉, 24시간 이상)이 필요한 것으로 보인다. 이러한 가설은 p-AMPK 및 p-ACC 수준이 처음에는 (6시간 경과 지점) 낮아지고 휴식 기간 동안 점차적으로 기존 수준으로 되돌아간다는 것을 발견함으로써 더욱 뒷받침된다. 이 연구의 또 다른 중요한 발견은 3일 동안 생쥐를 +9 Gz에 반복적으로 노출시키면 과중력 스트레스를 극복할 적응 능력을 유도할 수 있다는 것이다. 또한, 이러한 결과는 에너지 대사 용량의 회복이 과중력 스트레스에 적응하는 데 필수적일 수 있다는 개념을 뒷받침한다. 이것은 또한 p-AMPK와 p-ACC의 변화에도 반영되었다.

Nrf2는 basic region-leucine zipper (b-Zip) 전사조절인자로서, 여러 가지 자극에 대해 민감하게 반응하는 산화·환원 반응의 감수성 전사인자로서 다양한 항산화제와 생체방어의 유전자발현을 조절하기도 한다. Nrf2 항산화 시스템은 세포에서 작동하는 주요 방어 시스템으로 주로 외인성 및 내인성 자극의 독성 스트레스를 극복하기 위한 항산화 유전자, 2 상 효소 및 항 세포자멸사 유전자 등의 발현을 유도한다. 세포 생존 및 산화 환원 항상성의 유지에 대한 적응 반응에서 Nrf2는 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 실제로 Nrf2의 활성을 저해하는 Keap1(Kelch-like ECH-associated protein 1) 억제 화합물이 Nrf2 활성화 제제로서 신장병 치료 의약품 개발 임상실험이 진행되고 있는 것으로 알려져 있다.

cDNA 마이크로 어레이 분석은 복잡하고 상호 관련된 생물학적 프로세스에 대한 새롭고 흥미로운 정보를 산출하였다. 과중력의 영향을 받는 유전자 군집 중 Nrf2와 그 표적 유전자 발현에 중점을 둔 결과, Nrf2 자체 발현의 뚜렷한 변화가 없음에도 불구하고 Nrf2 표적 유전자의 발현은 과중력에 대한 자극 후 6시간 만에 억제되어 과중력 스트레스가 산화 스트레스를 유발한다는 가설을 증명하였다. 또한, 이 데이터는 Nrf2가 항산화 용량의 회복과 유도하여 과중력으로 인한 스트레스로부터 세포를 보호하는 역할을 한다는 생각을 뒷받침한다. 본 연구에서 흥미로운 발견은 Nrf2의 결핍이 과중력에 대한 반복적인 자극에 의해 유도되는 AMPK의 적응적 증가를 폐지한다는 것으로, Nrf2가 과중력 스트레스의 조건 하에서 AMPK 의존적 ATP 생산에 역할을 한다는 것을 암시한다.

미세중력이 동물과 세포에 미치는 영향에 대한 연구는 많이 이루어진 바 있다. 임신 8일부터 21일까지 +1.65G의 과중력에 쥐가 노출되면 발달하는

뇌에 산화적 스트레스가 발생할 수 있다. 반면, 시뮬레이션된 공간 조건에 대한 만성 미세중력에 대한 노출은 생쥐 태아 섬유종에서 산화 응력 반응을 변화시킨다. 쥐의 대뇌동맥에서 미세중력이 미토콘드리아 반응산소종의 증가로 미토콘드리아 기능장애를 유발하고, 미토콘드리아 표적항산화제는 미토콘드리아 기능 회복을 촉진하였다. 분석을 통해 STAT3, CREB 및 FoxOs (세포 생존 및 세포주기 제어와 관련된 전사 인자)가 + 9 Gz과 중력에 대한 부하에 의해 현저하게 억제되었음을 보여주었다(예: IL-6에 의한 간세포에서 급성 단백질의 생산; STAT3의 gp130-IL-6 R 조절; IGF-1 / PI3K 경로에 의한 FoxO1 조절; 세포주기 정지 및 세포 사멸의 FoxO3 조절; 및 FoxO1의 CREB 조절). 그리고 이들 억제 효과는 다중 과중력 자극에 의한 훈련 효과로 인해 최소화되거나 폐지되었다. 전사 인자 중 FoxO1은 세포 증식, 항산화 용량 및 적응 스트레스 반응을 포함한 다양한 생리학적 사건에 영향을 미친다. 간에서의 FoxO1은 또한 정상적인 포도당 함량을 유지하며 포도당 신생반응을 조절한다. 과중력 자극에 의해 변화된 FoxO1 수준은 스트레스와 적응 반응을 잘 반영한다. SIRT1/3은 PGC-1α와 관련하여 미토콘드리아 연료 산화 및 지질 항상성을 제어할 수 있다. +9 Gz 과중력 자극이 SIRT1/3 및 PGC-1α에 최소한의 영향을 미쳤다는 본 연구의 결과는 과중력에 의한 압축 스트레스가 AMPKα 수준과 신호 경로를 우선적으로 변화시킨다는 결론을 뒷받침한다.

앞서 생쥐 모델에서 +Gz 가속중력이 신체에 미치는 영향을 평가한 결과 +9 Gz 과중력에 대한 생쥐의 부하가 간, 골격근, 신장을 포함한 장기에 즉각적인 압축응력을 유발한 것으로 나타났다. 중요한 것은 간이 과중력 부하 스트레스에 더 취약하다는 점이다. 간 독성 물질 중에서, 알코올은 항공

인구에서 가장 보편적으로 노출되는 자극 중 하나이다. 간은 알코올 산화의 주요 장기이기 때문에 고농도의 에탄올에 노출되게 되면 이로 인한 손상이 쉽게 일어나는 것으로 알려져있다. 본 연구 결과는 과중력과 알코올 폭음 섭취의 조합이 간세포 생존과 관련된 분자에 시너지 억제 효과를 가지고 있다는 것을 보여주며, 알코올 섭취가 압축 스트레스로부터의 회복 과정을 지연시키거나 악화시킬 수 있음을 제시한다.

AMPK는 에탄올, 지방산 대사의 효과를 조절하는 데 중요한 역할을 하며 알코올 지방간의 발달을 막는다. 간장 AMPK의 에탄올 매개 장애는 알코올성 간 기능 상실을 위한 주요 메커니즘 중 하나이다. 따라서, AMPK에 대한 에탄올의 영향은 에너지 대사에 대한 에탄올의 효과에 대한 설명의 핵심이 될 수 있다. 알코올에 의한 AMPK 억제는 에탄올 대사가 반응성 산소 종(ROS)을 생성하기 때문에 역설적일 수도 있다. 그러나 ROS의 생산은 AMPK의 활성화에 있어 중요한 제어 요인이다. 실제로, ROS 매개 AMPK 활성화는 고혈당 및 메트포민 치료를 포함한 광범위한 자극에 의해 유도된다. 이전 연구에서, 과중력이 AMPK 신호를 억제하고 이는 시간이 흐름에 따라 점진적으로 회복된다는 사실을 발견하였다. 그러나 이 반응에서 독성물질 섭취가 과중력 스트레스에 미치는 영향에 대한 정보는 제공되지 않았다. 본 연구는 +9 Gz 과중력 스트레스에 대한 자극 후 폭음 알코올 섭취가 AMPK와 그 하위 신호 경로를 지속적으로 억제한다는 것을 보여주었다. 폭음 알코올 자극이 중력 스트레스 조건에서 산화 스트레스를 증가시켜 ROS 형성 속도(AMPK 인산화 및 활성을 유도함)와 AMPK를 매개하는 에너지 생산 사이의 균형을 악화시킬 수 있다는 개념을 뒷받침한다.

폭음 알코올 자극이 중력 자극에 의한 스트레스를 증가시킬 수 있다는

가설은 p-AKT 발현의 감소와 cleaved PARP과 같은 간세포 사멸 지표의 증가에 의해 강화되었다. 따라서 폭음 알코올 섭취는 + 9 Gz과 중력 스트레스에 대한 민감성을 높였음을 알 수 있었다. 이 효과는 AMPK 의존적 보상 ATP 생성 및 항산화 효과의 부족으로 인해 간세포의 ROS 증가와 관련이 있을 수 있다. 환경 자극 (예: 에탄올 섭취, 독성 물질 노출, 온도 및 빛 변화)은 인체 내 에너지 대사, 항산화 및 해독 능력에 영향을 미친다. 폭음 알코올 자극이 ROS를 증가시켜 과중력 스트레스로 인한 손상을 민감하게 한다는 가설은 과중력 자극 과의 병용 처치 후 Nrf2 발현의 반발적 증가에 의해 입증되었다.

SIRT (Sirtuins)는 세포 에너지 균형 유지에도 관여한다; SIRT의 활성화는 선택적 영양소 활용과 미토콘드리아 산화 기능을 증가시키는 칼로리 제한의 몇 가지 대사 측면을 모방한다. SIRT1은 미토콘드리아 연료 산화와 지질 항상성를 관장하는 분자인 PGC-1α를 조절한다. 본 연구의 결과는 과중력에 대한 부하 후 폭음에 대한 생쥐의 노출이 간세포에서 미토콘드리아 기능 장애를 나타내는 SIRT1, SIRT3, PGC-1α 수준을 감소시켰다는 것을 보여준다. 또한 앞서 과중력 자극에 대한 반복적인 노출에 의해 예방될 수 있다는 것을 발견한 바 있는데, 이는 과중력 스트레스에 적응하는 것이 동물들이 알코올로 인한 해로운 영향을 미토콘드리아 용량을 증가시킴으로써 극복할 수 있다는 것을 보여준다.

다양한 환경 조건에 의해 영향을 받는 생물학적 경로를 식별하는 것은 게놈 전체 표현 프로파일링 또는 연관 연구에서 가장 일반적인 작업 중 하나가 되었다. 마이크로 어레이 기술의 장점은 생쥐 간에서의 과중력으로 인한 전반적인 유전자 표현 변화에 대한 통찰력을 얻을 수 있는 새로운

기회를 제공하여, 과중력에 의해 조절되는 유전자, 전사 인자 및 대사 경로(즉, STAT3, FoxO3/1, C/EBPβ)를 확인할 수 있었다. 추가적인 실험을 통해 과중력에 노출된 후 폭음 알코올 소비가 간에서 STAT3, FoxO3/1, C/EBP and 및 CREB를 포함한 전사 인자(즉, 세포 생존과 관련된 전사 인자, UPR, 산화 및 감소, 세포 주기 제어)를 실제로 억제한다는 것을 확인하였다. IL-6은 간세포가 급성 단백질을 생성하도록 자극한다. 또한 IL-6 활성는 gp130-IL-6R 복합체를 통해 STAT3 신호 경로를 활성화한다. FoxO3는 스트레스 자극, 세포주기 정지, 세포사멸과 상당히 관련이 있는 반면 FoxO1은 체내 에너지 대사를 조절한다. FoxO1은 IGF-1/PI3K 경로와도 관련이 있으며 지방 조직, 근육, 간 등 인슐린 관련 조직에서도 잘 나타난다. FOXO1 활동은 단식과 간 지질대사 중 포도당 신생합성의 마스터 조절자인 CREB의 아세틸화에 의해 조절된다. 활성화된 C/EBPβ는 유전자 전사를 통해 해독 효소를 유도한다. C/EBP 결합 부위는 γ-glutamylcysteine synthetase 와 manganese superoxide dismutase 등과 같은 특정 항산화 유전자의 촉진부위에서 발견된다. 따라서 C/EBPβ 활성화는 해독 효소 및 기타 생물학적 활동을 유도에 필요하며, 또한 이는 xenobiotics의 대한 간세포 보호에 기여하는 것으로 알려져 있다. 과중력에 대한 부하 후 폭음 알코올 섭취가 FoxO3, FoxO1, C/EBPβ 및 CREB를 억제하였다는 발견은 복합 자극이 UPR 및 항산화 유전자 조절 뿐만 아니라 에너지 항상성에 영향을 미칠 수 있다는 주장을 더욱 뒷받침한다.

신장은 혈액 속의 노폐물을 걸러내는 간 외에 또 다른 압력에 민감한 기관이고 혈액의 일부 대사 산물이 약물 복용 시 신장 손상의 위험 요소가 될 수 있다는 점을 감안하여 과중력 스트레스 하에서 APAP 처치 스트레스 추가가 신장 손상을 일으키는지 여부를 연구하였다. 과중력 스트레스 단독

또는 APAP 병용 자극이 신장에 미치는 영향을 이해하기 위해 앞선 분석과는 달리+9 Gx 과중력 동물 모델을 사용했으며 TUNEL 분석 결과를 통해 알 수 있듯이 +9 Gx 과중력 자극과 APAP 처치를 결합하면 신장 기능 장애가 증가한다는 것을 Bax 및 Bcl2 전사체, 혈청 크레아티닌 및 Kim-1 mRNA 변화를 통해 보여주었다. 이러한 결과에 따라 손상된 관상 상피 세포도 관찰되었고 이는 신장 세포 손상을 나타낸다. 이러한 발견은 세포 생존력 및 세포 사멸 마커의 변화에 의해 뒷받침되었다.

또한 다중 과중력 자극은 사전 조절을 통해 APAP 유발 손상으로부터 신장을 보호한다는 것을 확인하였다. 이는 신장 세포 생존 바이오 마커 및 생체 내 신장 손상 마커 (즉, 크레아티닌 및 Kim-1)의 변화에 의해 뒷받침되었다. 그러나 흥미롭게도 이 적응 효과는 APAP로부터 간을 효과적으로 보호하지 못했으며 이는 반복 자극을 통한 훈련 효과가 신장 선택적 세포 보호만을 제공함을 시사한다. 앞선 연구에서는 다중과 중력 부하가 간을 압박 손상과 중력 스트레스로부터 보호할 수 있다고 한 바 있다. 그러나, APAP 처치와 결합된 과중력 전처리가 신장에서와 달리 간에서 적응 반응을 이끌어 내지 못하였다는 것을 보여주었다. 또한, 과중력과 APAP를 통한 자극은 GO 생물학적 프로세스 분석과 실험적인 방법을 통해 ER 스트레스를 증가시킨다는 것을 보여주었다. 이는 앞선 결과들과 마찬가지로 신장에서의 증가된 ER 스트레스 또한 반복적인 과중력 자극에 노출되었을 때 적응 반응을 통해 완화되었다. APAP와 단일 중력 자극에 노출되었을 때, PERK 매개 경로는 신장에서 강하게 증가되었다. IRE1a에 따른 XBP1의 활성화는 ER 접힘 능력을 조절하고 펼쳐진 단백질의 부작용을 완화하는 반면, XBP1의 지속적인 생산은 세포 사망과 장기 기능 장애를 유발한다. 본

연구 결과는 IRE1a가 과중력과 APAP 병용 자극에 의해 추가로 활성화되었다는 사실을 밝혔다. 그러나 ATF6 단백질 수치에는 큰 변화가 없었다. 따라서 APAP 자극과 함께 과중력 스트레스가 작용될 때 신장의 PERK와 IRE1a 경로를 통해 ER 스트레스 신호가 강화되는 것으로 보인다. ER 스트레스 반응에 있어서 또한 APAP에 대한 다중 과중력 자극을 통한 적응 효과는 신장 선택적임을 발견하였다. 따라서 APAP 자극과 결합된 과중력 자극 후 신장과 간에서 관찰된 기능 변화가 ER 스트레스에 의해 매개되었을 가능성이 높다.

MiRNA는 인간 단백질 코딩 유전자의 최대 30%를 조절하는 역할을 할 수 있다. 그러나 아직 밝혀지지 않은 다른 잠재적 대상도 존재할 수 있으며 과중력 노출 및 APAP 중독에 대한 적응을 조절하는 데 관여할 수 있을 것으로 생각되었다. 그 중 miR-122가 간에서 가장 풍부한 miRNA이고 전신 항상성 조절에 중요한 역할을 하기 때문에 APAP 자극에 대한 조직 선택적 적응을 매개하는 메커니즘을 식별하기 위해 miR-122를 주목하였다. 흥미롭게도, miR-122와 pri-miR-122 수준은 반복된 과중력 스트레스와 APAP 자극을 동시에 주었을 때 간에서 증가하였으며, 이는 신장에서의 결과와 일치한다. 따라서 다중 과중력 및 APAP 자극이 간에서의 pri-miR-122 발현량을 증가시키고, pri-miR-122에서 생성된 mature 형태의 miR-122가 간으로 이동해 과중력과 APAP 자극에 대한 신장의 적응 반응에 기여할 가능성이 매우 높다. 따라서 간에서 분비되는 miR-122는 과중력 자극과 APAP 처치를 통해 발생하는 독성으로부터 신세포를 보호하는 유전자의 발현에 기여할 가능성이 높다는 점을 입증하였다.

결론적으로 본 연구를 통해 1) +9 Gz의 과중력 자극이 즉시 간, 골격근,

신장을 포함한 장기에 압축 스트레스를 유발했고, 이 스트레스는 점진적으로 AMPKα 수준 및 그 하위 에너지 생산 경로, 그리고 간에서 Nrf2 의존성 항산화 유전자 발현의 감소를 유발한다는 것을 보여주었고 이는 ATP 생성을 악화시키고 간세포의 손상을 유발할 것으로 생각된다. 또한, 반복적인 과중력 자극이 부분적으로 Nrf2 의존적인 AMPK 경로를 통해 중력 스트레스에 대한 생쥐의 적응 능력을 향상시켰다는 것을 입증하였다(그림 18A). 2) 본 연구는 +9 Gz의 과중력 스트레스 후 폭음 알코올 섭취가 AMPK와 그 신호 경로를 지속적으로 억제한다는 것을 처음으로 입증하며, 폭음 알코올 자극이 과중력 스트레스 조건 하에서 산화 스트레스를 증가시켜 ROS 형성의 조절과 에너지 항상성의 조절 간의 균형을 악화시켜 수 있다는 점을 입증하였다. 앞선 연구와 마찬가지로 반복적인 과중력 자극을 통한 훈련이 장기들의 과중력 스트레스와 폭음 알코올 자극으로 인한 간세포 손상을 극복할 수 있다는 증거를 제공하며, AMPKα와 그 하위 신호가 이를 반영한다는 점을 입증하였다. 이러한 연구 결과는 간세포가 과중력 스트레스와 폭음 알코올 섭취에 의한 손상의 극복에 있어 에너지 대사 용량의 회복이 필수적일 수 있다는 개념을 뒷받침한다(그림18B). 3) 과중력 스트레스와 APAP에 대한 관절 노출이 ER 스트레스를 통해 신장 기능 장애를 악화시킬 수 있다는 것을 보여주며, 이는 이 또한 반복된 과중력 자극을 통한 적응 효과에 의해 극복될 수 있음을 증명하였다. 그리고 이 현상에서 간에서 기원한 miR-122의 중요성을 입증하였다(그림18C).

종합하면, 이상의 결과는 과중력 자극에 의한 스트레스가 간, 신장을 포함한 장기에 생체 스트레스를 유발함을 밝혔고 이는 반복 자극에 의해 유도되는 생체 내 자기 방어 기전을 통해 극복될 수 있음을 제시한다.

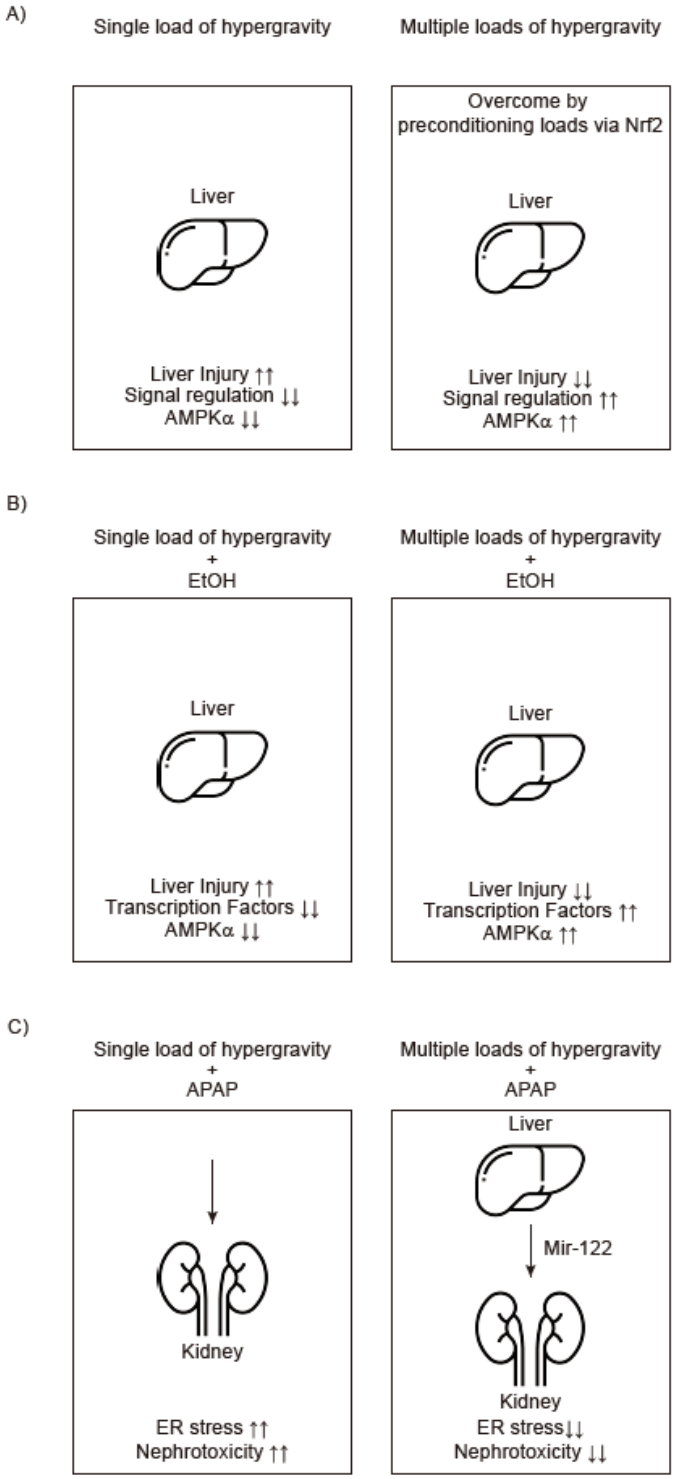

A)
Single load of hypergravity
Multiple loads of hypergravity
Overcome by preconditioning loads via Nrf2
Liver
Liver Injury ↑↑
Signal regulation ↓↓
AMPKα ↓↓
Liver
Liver Injury ↓↓
Signal regulation ↑↑
AMPKα ↑↑
B)
Single load of hypergravity + EtOH
Multiple loads of hypergravity + EtOH
Liver
Liver Injury ↑↑
Transcription Factors ↓↓
AMPKα ↓↓
Liver
Liver Injury ↓↓
Transcription Factors ↑↑
AMPKα ↑↑
C)
Single load of hypergravity + APAP
Multiple loads of hypergravity + APAP
Kidney
ER stress ↑↑
Nephrotoxicity ↑↑
Liver
Mir-122
Kidney
ER stress↓↓
Nephrotoxicity ↓↓

Figure 18. Schematic diagram showing mechanism of self-protection and signal regulation against hypergravity stress

(A) A load of mice to hypergravity causes AMPKα repression with liver injury, which is overcome by preconditioning loads via Nrf2. **(B)** A binge alcohol intake after hypergravity stress sustainably decreases AMPK and transcription factors necessary for hepatocyte survival. **(C)** Hypergravity Load Modulates Acetaminophen Nephrotoxicity via Endoplasmic Reticulum Stress in Association with Hepatic microRNA-122 Expression.

V. 참 고 문 헌

1. Caiozzo, V. J. *et al.* Effect of spaceflight on skeletal muscle: mechanical properties and myosin isoform content of a slow muscle. *J. Appl. Physiol.* **76,** 1764–1773 (1994).
2. Del Signore, A. *et al.* Hippocampal gene expression is modulated by hypergravity. *Eur. J. Neurosci.* **19,** 667–677 (2004).
3. Fitts, R. H. *et al.* Functional and structural adaptations of skeletal muscle to microgravity. *J. Exp. Biol.* **204,** 3201–3208 (2001).
4. Ikawa, T. *et al.* Hypergravity suppresses bone resorption in ovariectomized rats. *Adv Space Res.* **47,** 1214–1224 (2011).
5. Kramer, L. A. *et al.* Orbital and intracranial effects of microgravity: findings at 3-T MR imaging. *Radiology* **263,** 819–827 (2012).
6. Nabavi, N. *et al.* E. Effects of microgravity on osteoclast bone resorption and osteoblast cytoskeletal organization and adhesion. *Bone* **49,** 965–974 (2011).
7. Sanford, G. L. *et al.* Influence of changes in gravity on the response of lung and vascular cells to ischemia/reperfusion *in vitro*. *J Gravit Physiol.* **6,** P27–28 (1999).
8. Wang, J. *et al.* Simulated microgravity promotes cellular senescence via oxidant stress in rat PC12 cells. *Neurochem. Int.* **55,** 710–716 (2009).
9. Xue, J. H. *et al.* Differential regulation and recovery of intracellular Ca2+ in cerebral and small mesenteric arterial smooth muscle cells of simulated microgravity rat. *PloS one* **6,** e19775 (2011).

10. Fitts, R. H. *et al.* Prolonged space flight-induced alterations in the structure and function of human skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* **588,** 3567–3592 (2010).

11. Sandona, D. *et al.* Adaptation of mouse skeletal muscle to long-term microgravity in the MDS mission. *PloS one* **7,** e33232 (2012).

12. Carpenter, R. D. *et al.* Long-term changes in the density and structure of the human hip and spine after long-duration spaceflight. *Acta Astronaut* **67,** 71–81 (2010).

13. Crestini, A. *et al.* Effects of simulated microgravity on the development and maturation of dissociated cortical neurons. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **40,** 159–165 (2004).

14. Dememes, D. *et al.* Development of the rat efferent vestibular system on the ground and in microgravity. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **128,** 35–44 (2001).

15. Husson, D. *et al.* Differentiation in microgravity of neural and muscle cells of a vertebrate (amphibian). *Adv Space Res.* **22,** 303–308 (1998).

16. Frigeri, A. *et al.* Effect of microgravity on gene expression in mouse brain. *Exp Brain Res.* **191,** 289–300 (2008).

17. Monticone, M. *et al.* Activation of nervous system development genes in bone marrow derived mesenchymal stem cells following spaceflight exposure. *J. Cell. Biochem.* **111,** 442–452 (2010).

18. Wang, N. D. *et al.* The simulated microgravity enhances multipotential differentiation capacity of bone marrow mesenchymal stem cells. *Cytotechnology* **66,** 119–131 (2014).

19. Breaeunig, R. A. *Saturn V launch simulation*, (2010) Available at: www.braeunig.us/apollo/saturnV.htm.

20. Hirasaka, K. *et al.* Short-term hypergravity does not affect protein-ubiquitination and proliferation in rat L6 myoblastic cells. *Biol. Sci. Space*. **19,** 3–7 (2005).

21. Ciofani, G. *et al.* Hypergravity effects on myoblast proliferation and differentiation. *J. Biosci. Bioeng.* **113,** 258–261 (2012).

22. Genchi, G. G. *et al.* Hypergravity stimulation enhances PC12 neuron-like cell differentiation. *Biomed Res Int*. **2015,** 748121 (2015).

23. Oshima, M. *et al.* Hypergravity induces expression of cyclooxygenase-2 in the heart vessels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330,** 928–933 (2005).

24. Gueguinou, N. *et al.* Stress response and humoral immune system alterations related to chronic hypergravity in mice. *Psychoneuroendocrinology* **37,** 137–147 (2012).

25. Oguro, A. *et al.* The molecular chaperone HSP47 rapidly senses gravitational changes in myoblasts. *Genes Cells* **11,** 1253–1265 (2006).

26. Nerstedt, A. *et al.* AMP-activated protein kinase inhibits IL-6-stimulated inflammatory response in human liver cells by suppressing phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *Diabetologia* **53,** 2406–2416 (2010).

27. Yun, H. *et al.* AMP-activated protein kinase mediates the antioxidant effects of resveratrol through regulation of the transcription factor FoxO1. *FEBS J.* **281,** 4421–4438 (2014).

28. Kim, A. D. *et al.* Cytoprotective effect of eckol against oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction: involvement of the FoxO3a/AMPK pathway. *J. Cell. Biochem.* **115,** 1403–1411 (2014).

29. Lee, J. M. *et al.* AMPK-dependent repression of hepatic gluconeogenesis via disruption of CREB.CRTC2 complex by orphan nuclear receptor small heterodimer partner. *J. Biol. Chem.* **285,** 32182–32191 (2010).

30. Herms, A. *et al.* AMPK activation promotes lipid droplet dispersion on detyrosinated microtubules to increase mitochondrial fatty acid oxidation. *Nat Commun.* **6,** 7176 (2015).

31. Wade, C. E. Responses across the gravity continuum: hypergravity to microgravity. *Adv. Space Biol. Med*. **10,** 225–245 (2005). 32. Gross, D. N. *et al.* The role of FOXO in the regulation of metabolism. *Curr. Diab. Rep*. **9,** 208–214 (2009).

33. Heinrich, P. C. *et al.* Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* **374,** 1–22 (2003).

34. Gebhardt, R. *et al.* Liver zonation: Novel aspects of its regulation and its impact on homeostasis. *World J. Gastroenterol.* **20,** 8491–8504 (2014).

35. Yang, Y. M. *et al.* AMPK-associated signaling to bridge the gap between fuel metabolism and hepatocyte viability. *World J. Gastroenterol.* **16,** 3731–3742 (2010).

36. Sajdel-Sulkowska, E. M. *et al.* Potential role of oxidative stress in mediating the effect of altered gravity on the developing rat cerebellum. *Adv Space Res.* **40,** 1414–1420 (2007).

37. Beck, M. *et al.* Chronic exposure to simulated space conditions predominantly affects cytoskeleton remodeling and oxidative stress response in mouse fetal fibroblasts. *Int. J. Mol. Med.* **34,** 606–615 (2014).

38. Zhang, R. *et al.* Simulated microgravity-induced mitochondrial dysfunction in

rat cerebral arteries. *FASEB J*. **28,** 2715–2724 (2014).

39. Adachi, M. *et al.* The forkhead transcription factor FoxO1 regulates proliferation and transdifferentiation of hepatic stellate cells. *Gastroenterology* **132,** 1434–1446 (2007).
40. Shao, D. *et al.* A functional interaction between Hippo-YAP signalling and FoxO1 mediates the oxidative stress response. *Nat Commun.* **5,** 3315 (2014).
41. Smith, G. R. *et al.* Modelling the response of FOXO transcription factors to multiple post-translational modifications made by ageing-related signalling pathways. *PloS one* **5,** e11092 (2010).
42. Choi, D. *et al.* Protein arginine methyltransferase 1 regulates hepatic glucose production in a FoxO1-dependent manner. *Hepatology* **56,** 1546–1556 (2012).
43. Lagouge, M. *et al.* Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* **127,** 1109–1122 (2006).
44. Shin, S. Y. *et al.* SIRT1 activation by methylene blue, a repurposed drug, leads to AMPK-mediated inhibition of steatosis and steatohepatitis. *Eur. J. Pharmacol.* **727,** 115–124 (2014).

VI. Abstract

Mechanism of self-protection and signal regulation against hypergravity stress

Sang Gil Lee

Advisor: Prof. Keon Wook Kang

Gravity-related stresses experienced by living things vary depending on the research model, object, and observation index. Therefore, managing appropriate physiological responses and changes to aerospace missions requires an understanding of the effects of hypergravity on the human body.

In this study, it was investigated whether single or repeated stimulation of hypergravity affects molecules related to energy metabolism using a mouse model. The expression of AMPKα and its sub-signals in the liver was significantly suppressed after 6 hours after exposure to +9 Gz hypergravity stimulation for 1 hour and gradually returned to normal. However, the expression figures of the suppressed AMPKα show normal levels when +9 Gz hypergravity stimulation is repeated three times, suggesting that it is adaptive by repeated multi-stimulus training. The cDNA microarray analysis revealed that 221 genes were significantly altered by +9 Gz gravitational stimulation, and confirmed that the inhibited genes contained Nrf2 target genes. Experiments with Nrf2 gene-deficient animals conducted to further confirm this confirmed that no recovery was shown through

adaptation of AMPKα signals induced by +9 Gz 3 repeated stimuli, indicating that Nrf2 plays a role in the recovery effect through adaptation of AMPKα. Overall, it is confirmed that +9 Gz gravity causes AMPKα signal inhibition effects with liver damage when given to mice, which can be overcome by adaptive responses caused by repeated hypergravity stimulation mediated by Nrf2.

To further understand the effect of hypergravity stimulation on liver function, a representative liver toxicity model, alcohol binge-drinking intake and liver changes due to combined treatment of +9 Gz hypergravity stimulation were investigated. Alcohol binge drinking is known to cause mitochondrial dysfunction in liver cells. Therefore, we investigated how the combination of hypergravity stress and binge drinking intake affects AMPK and biological signals needed to survive hepatocytes. Immediately after the rat was subjected to +9 Gz of hypergravity stimulation for one hour, binge alcohol intake was carried out and Akt and PARP-1 levels were found to be inhibited in the liver after 24 hours. Furthermore, the level of AMPKα in the key molecules regulating energy metabolism was continuously reduced. Similarly, we inhibited levels of STAT3, FoxO1/3, C/EBP and CREB, the key transcription factors needed for cell survival. However, this change was not seen after three consecutive repetitive stimuli, indicating that adaptive responses caused by repeated hypergravity stimuli to hypergravity can overcome the effects of hypergravity and alcohol.

In particular, the accumulation of proteins (i.e., ER stress) from the vesicle is observed in kidney disease. Protein levels of cell survival indicators decreased in the kidneys after acetaminophen administration after a single hypergravity stimulus, and kidney damage indicators increased, and ER stress-related indicators were

expressed. It has also been confirmed that kidney damage in mice is overcome by hypergravity repetitive stimulation training. It was predicted that the increase in miR-122 levels in the kidneys would likely have originated in the liver, as the levels of multiple hypergravity stimuli and pri-miR-122 by APAP only increased in the liver, not in the kidney. It was found that hypergravity stimulation and APAP-induced stimulation caused kidney failure due to increased ER stress in the mouse's vivo, which can be overcome by increased production of miR-122 in the liver due to repeated hypergravity stimulation.

Taken together, this study found that stimulation caused by hypergravity stress caused stress in organs including liver and kidneys. In particular, hypergravity stress has confused energy homeostasis maintenance including AMPKα signaling in the liver, which has been demonstrated that repeated hypergravity stimulation training has been mediated in part by Nrf2-dependent AMPK recovery, improving adaptability to hypergravity stress. This defense mechanism has also been found to be the same in intensified hypergravity stimulation accompanied by binge drinking alcohol stimulation. It is also confirmed that stress from hypergravity stimulation can cause kidney dysfunction through ER stress generation not only in the liver but also in the kidneys, which can be overcome by the action of miR-122 by repeated hypergravity stimulation training, providing new information on overcoming hypergravity stress during space travel.

Key words: hypergravity stress, alcohol, acetaminophen, AMPK, Nrf2, ER stress.
Student ID Number: 2014-30558