단기간과 장기간 지구성운동 시 쥐의 골격근 내 항산화 효소와 미토콘드리아 효소의 발현양상

김상현¹⁾ · 안나영²⁾ · 홍창배²⁾ · 김기진²⁾

1) Washington University

2) 계명대학교

Abstract

Kim, S. H., Ahn, N. Y., Hong, C. H., Kim, K. J. The effect of acute and prolonged endurance swim exercise on antioxidant and mitochondrial enzymes in rat skeletal muscle. *Exercise Science*, 20(4): 359-366, 2011. The majority of the oxidants produced in muscles are due to an elevated rate of mitochondrial respiration. In general, expression of antioxidant enzymes for protection of oxidative stress were increased in both high intensity and long duration exercise. However, there are no studies reported regarding the effect of acute and prolonged endurance exercise on antioxidant enzymes expression. This study measured antioxidant enzymes to evaluate the total antioxidant defense capacity in rat skeletal muscles subjected to acute and prolonged endurance exercise. Twenty-four rats were randomly assigned into 4 groups (sedentary, 1 day exercise, 3 day exercise, 3 weeks exercise). Exercise groups were trained by using a 6 h/day swimming program. Blood samples for TBARS were drawn immediately after the exercise session. Muscles samples for antioxidant and mitochondrial enzymes were harvested 18 hours after the last bout of exercise. Endurance exercise training increased serum TBARS levels in 1 day exercise group, but that of 3 day and 3 weeks exercise groups were not changed compare to sedentary group. The expression of antioxidant enzymes were not changed (catalase, SOD2) or decreased (SOD1, GPx-1) in the muscles of 1 day exercise group, but SOD1, catalase and SOD2 expression were increased in the 3 day exercise group. Cytoplasmic antioxidant enzymes (SOD1, catalase, GPx-1) were not changed from the sedentary group, but the mitochondrial antioxidant enzyme SOD2 was increased in the muscles of 3 week exercise group. NADH-UO and COX1 expression were increased in all exercised groups (1 day, 3 day, 3 weeks). Mitochondrial electron transport chain enzymes expression were higher in 3 week group compare to 1 day exercise group. Krebs cycle enzyme citrate synthase only increased after 3 weeks exercise. These results indicate that antioxidant defense capacity by cytoplasmic antioxidant enzymes in muscles of endurance trained rat were only increased in short term exercise. However, an increase in antioxidant defense capacity by mitochondrial antioxidant enzyme, SOD 2, was increased after prolonged endurance exercise training.

Key words : Acute endurance exercise, Prolonged endurance exercise, Skeletal muscle, Mitochondrial biogenesis, Antioxidant enzyme, TBARS, Oxidative stress

초 록

김상현, 안나영, 홍창배, 김기진. 단기간과 장기간 지구성운동시 쥐의 골격근 내 항산화 효소와 미토콘드리아 효소의 발현양상. *운동과학*, 제20권 제4호. 359-366, 2011. 증가된 골격근 내 미토콘드리아 호흡은 운동으로 인해 생성되는 대부분의 산화스트레스의 원인이 된다. 일반적으로 운동강도가 높고, 운동시간이 길수록 산화스트레스 조절을 위한 항산화 효소의 발현이 증가되는 것으로 알려져 있지만, 운동기간에 따른 항산화효소의 단백질 발현 변화를 살펴본 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 지구성운동 기간에 따른 항산화 효소의 발현을 알아보았다. 이를 위해 24마리의 쥐를 대상으로 각각 6마리씩 4그룹 (sedentary, 1 day exercise, 3 day exercise, 3 weeks exercise)로 분류한 다음 수영을 실시하였다. TBARS 측정을 위한 혈액은 마지막 운동훈련이 끝난 직후 채취하고, 항산화 효소와 미토콘드리아 전자전달 효소의 발현 분석을 위한 골격근은 마지막 운동훈련 18시간 후 적출하였다. 그 결과 1일 운동 후 증가된 TBARS는 1일과 3주 운동 후에는 대조군 수준으로 감소하였다. 그리고 세포질과 미토콘드리아에 존재하는 다양한 항산화 효소의 단백질 발현은 1일 운동 후에는 차이가 없거나(catalase, SOD2) 감소(SOD1, GPx-1)하였으나, 3일 운동 후에는 증가(SOD1, catalase, SOD2)되었다. 그리고 3주 운동 후에는 세포질에 존재하는 모든 항산화 효소가 대조군과 비교해 차이가 없었으나, 미토콘드리아에 존재하는 SOD2는 증가되었다. 마지막으로 미토콘드리아 전자전달 효소의 단백질 발현은 1일, 3일 그리고 3주 운동 모두 증가하였으며, 3주 운동 후에는 1일 운동에 비해 증가하였다. 그리고 미토콘드리아 Krebs 회로 효소인 citrate synthase 발현은 3주 운동 후 증가되었다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 수영과 같은 지구성 운동 시에는 세포질에 존재하는 항산화 효소에 의한 방어체계의 경우 단기간 운동 시에는 증가하지만, 운동이 장기간 지속될 경우 안정 시 수준으로 회귀하였다. 그러나 미토콘드리아에 존재하는 항산화 효소에 의한 방어체계의 경우 3일부터 3주까지 증가상태를 유지하였다.

주요어 : 단기간 지구성운동, 장기간 지구성운동, 골격근, 미토콘드리아 생합성, 항산화 효소, TBARS, 산화스트레스

I. 서론

격렬한 운동은 우리의 신체, 특히 골격근과 심장 조직에서의 산소섭취를 증가시키는데, 섭취된 대부분의 산소는 산화적 인산화와 물로 환원되기 위해 미토콘드리아에서 사용된다(Ames et al., 1995). 그러나 소량의 산소는 reactive oxygen species(ROS)로 분류된(2~5%) superoxide radical($O_2^{\cdot -}$), hydrogen peroxide(H_2O_2) 그리고 hydroxyl radicals($OH^{\cdot}$)로 전환된다(Halliwell & Gutteridge, 1989). 그러나 조직이 ROS에 노출되는 것은 산화적 손상의 원인이 되기 때문에(Meydani et al., 1993) 운동에 의해 증가된 ROS로부터 조직을 보호하기 위해 항산화 방어체계가 갖춰지게 된다. 이때 방어전략으로서 골격근 세포는 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx) 그리고 catalase 등과 같은 항산화 효소에 의해 ROS를 제거하기 위한 방어능력이 갖춰지게 된다(Jenkins, 1988; Ji, 1998; Min et al., 2011). 뿐만 아니라 운동에 의한 ROS의 생성은 주로 미토콘드리아에서 생성되기 때문에(Yfanti et al., 2011; Murphy, 2009) 미토콘드리아 생합성과 항산화효소와는 서로 관련이 있을 것이다.

지구력 운동은 골격근에서 SOD(Powers et al., 1994a; Higuchi et al., 1985; Laughlin et al., 1990)와 GPx(Powers et al., 1994b; Sen et al., 1992)의 활성도(activity)를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 그러나 SOD의 경우 몇몇 연구에서는 차이가 없었으며(Laughlin et al., 1990; Alessio & Goldfarb, 1988), GPx의 활성도 또한 차이가 없거나(Revan et al., 2010) 감소(Zembron-Lacny et al., 2008)되었다. Catalase의 경우에도 트레이닝에 의한 골격근 내 활성도가 차이가 없거나(Powers et al., 1994b; Higuchi et al., 1985), 감소(Laughlin et al., 1990; Alessio & Goldfarb, 1988)되는 것으로 알려져 있다. 이처럼 많은 연구가 지구성 운동에 따른 골격근 내 항산화 효소의 활성과 관련하여 이루어졌으나, 운동의 형태, 시간, 강도와 근섬유 형태, 샘플의 종류 그리고 샘플링 시기 등 다양한 변수로 인해 일치되는 결과를 얻지 못하고 있다. 또한, 항산화 효소의 활성도가 증가하지 않더라도 그 효소의 발현(protein expression)이 증가하거나 또는 항산화 효소의 발현이 증가하지 않더라도 그 효소의 활성도가 증가하면 항산화 방어체계는 그만큼 증가하기 때문에 골격근 내 항산화 효소의 발현 정도를 분석하는 것은 항산화 방어체계에 대한 운동의 역할을 알아보는 데 많은 도움을 줄 것이다. 또한, 지구력 트레이닝에 따른 항산화 효소의 역할에 대해 조명한 많은 국내 연구 중 전중

귀 등(2010) 등 몇몇 연구를 제외한 대부분의 연구가 항산화 효소의 활성도 측정을 위해 혈액을 주로 이용하였다. 그러나 운동 시 대부분의 산화스트레스가 골격근 내 미토콘드리아에서 생성됨(Yfanti et al., 2011; Ristow et al., 2009)을 고려할 때, 혈액에서 항산화 효소의 활성도를 측정한 이전 연구의 결과는 운동의 역할을 정확히 밝히기에 부족함이 있다.

이에 본 연구는 지구성운동 기간에 따른 골격근 내 항산화 효소의 발현이 산화스트레스 조절을 위해 어떠한 양상을 나타내는지 알아봄으로써 운동이 항산화 방어능력에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 한다.

II. 연구 방법

1. 실험동물 및 처치

본 연구는 약 80~100g의 수컷 Wistar rat 24마리를 구입하여 1주간의 환경 적응 기간을 가진 후 6마리씩 4그룹으로 무작위 분류하였다(Sedentary; Sed, 1day exercise; 1d EX, 3 day exercise; 3d EX, 3 weeks exercise; 3 wk EX). 사육실 온도는 21℃로 유지하였으며, 물과 사료(Purina corp. carbohydrate 58.9%, fat 12.4%, protein 28.7%)는 자유롭게 섭취토록 하였다. 명기(06:00~18:00)와 암기는 각각 12시간으로 조절하였다.

골격근 적출은 운동으로 인한 미토콘드리아와 항산화효소의 합성이 충분히 이뤄진 시점인 마지막 훈련 18시간 뒤 sodium pentobarbital(50mg/100g body weight; Fort Dodge Animal Health, USA)을 이용하여 마취한 후 실시하였으며, Sed 그룹 또한 동일한 시점에 골격근을 적출하였다. 적출된 triceps 근육은 급속 냉동하여 분석 시까지 -80℃에서 보관하였다. 그리고 혈중 thiobarbituric acid-reactive substance(TBARS)는 반감기가 매우 짧은 특성을 고려하여 마지막 훈련이 끝난 직후 꼬리정맥으로 부터 혈액을 약 200 ul 채취하였다. 본 연구는 Animal Studies Committee of Washington University School of Medicine에 의해 승인되었다.

2. 운동프로그램

수영 프로토콜은 Ploug 등(1990)의 방법과 Garcia-Roves 등(2003)의 방법을 일부 수정하여 1일, 3일 그리고 3주(5회/주) 동안 실시하였다. 수영운동 전 물에 대한 적응훈련은 3일간 실시하였다. 처음 이틀 동안은 하루 10분씩 실

시하였으며, 3일째는 3시간 동안 실시하였다. 이후 본 실험에서는 오전 9시부터 3시간씩 2회에 걸쳐 총 6시간 수영을 실시하였다. 첫 번째 3시간의 수영 후에는 45분간 휴식을 취하도록 하였으며, 이 시간 동안 물과 사료의 섭취는 자유롭게 하였다.

수영은 원통형 수조(80 cm × 120 cm, 수심 50~60 cm)에 3마리씩 넣어 자유롭게 수영하도록 하였다. 수온은 체온 변화에 따른 스트레스를 최소화하기 위해 35℃로 일정하게 유지하였으며, 휴식기와 운동 종료 후에는 수건으로 물기를 제거한 후 온풍기를 이용하여 체온을 유지토록 하였다(Kiraly et al., 2007).

3. TBARS 측정

혈청 TBARS 농도는 Quantichrom TBARS Assay kit (Bioassay System, USA)을 사용하여 fluorimetric assay법으로 측정하였다. 혈청 50 μ l를 50 μ l의 35% TCA에 분주하고 교반한 다음 50 μ l의 Tris-HCl buffer(50 mM, pH 7.4)에 넣어 다시 교반하였다. 10분간 상온에서 배양한 다음 0.75% TBA(2M Na₂SO₄ 함유) 1 ml를 첨가하여 혼합한 다음 100℃로 45분간 가열하였다. 그 후 70% TCA 1 ml를 첨가하여 교반하고, 950 × g로 10분간 원심분리 한 다음 형광 microplate reader(Bio Tec, USA)를 이용하여 측정하였다.

4. Western blotting

근육은 ice-cold buffer[50 mmol/l Tris-HCl(pH 7.4), 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mmol/l NaF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin, 0.1 mmol/l bpV(phen), 2 mg/ml β -glycerophosphate]를 이용하여 4℃에서 균질화하였다. 균질화된 시료는 미토콘드리아를 완전히 분해하기 위해 동결/해동 과정을 3회 반복한 다음 10분간 원심분리(1500 g, 4℃)하여 상층액만 사용하였다. 단백질 농도는 Lowry 등(1951)의 방법에 의해 정량분석 하였다. 정량화된 단백질은 SDS-polyacrylamide Gel을 이용한 전기영동을 통하여 분리한 후 nitrocellulose membrane에 전이하였다. 전이 후 immunoblotting을 위해 사용된 일차항체는 다음과 같다. SOD1(Santa Cruz, CA, USA), SOD2(Santa Cruz), catalase(Sigma-Aldrich, MO, USA), GPx-1(LSBio, WA, USA), cytochrome oxidase subunit-1

(COX1; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), NADH ubiquinone oxidoreductase(NADH-UO; Invitrogen), citrate synthase (Alpha Diagnostic) 그리고 β -actin(Fitzgerald, MA, USA). Band의 시각화는 ECL(Amersham)을 이용하였으며, band의 상대적 강도는 sigmaGel(Jandel Scientific Corp., Erkrath)을 이용하여 분석하였다.

5. 자료처리 방법

모든 자료는 SigmaStat 3.0 통계프로그램을 이용하여 각 그룹별 평균과 표준오차(Mean±SE)를 산출하였다. 측정변인들에 대한 그룹 간 차이를 알아보기 위해 일원변량분석법(one-way ANOVA)을 이용하였으며, 사후검정은 LSD법을 이용하였다. 통계적 유의수준은 $p<0.05$ 로 설정하였다.

III. 연구결과

1. TBARS 변화

TBARS는 활성산소로 인한 지방산화로 생성되는 과산화물이 분해될 때 생성되는 최종산물로서 지방산화에 의한 활성산소 생성을 반영하는 대표적인 산화스트레스 표지물이다. 운동기간에 따른 변화는 <Fig. 1>과 같이 1일 운동 후 유의하게($p<0.001$) 증가하였으나, 그 이후 3일과 3주 운동 후에는 다시 감소하여 대조군과 비슷한 수준을 나타냈다.

Fig. 1. The effects of different exercise periods on TBARS in plasma
*** $p<0.001$ significantly different from sedentary group

2. 항산화 효소 발현

1) SOD1 발현

SOD는 superoxide radical에 대한 첫 번째 방어체계로

서(Powers et al., 1999), 그 중 SOD1은 주로 세포질과 세포 외 공간에 존재하면서 그 역할을 수행한다. SOD1의 운동 기간에 따른 골격근 내 발현 정도는 <Fig. 2A>와 같이 대조군에 비해 1일 운동 후 유의하게($p<0.05$) 감소되었으나, 3일 운동 후에는 증가($p<0.001$)되었다. 그리고 3주간의 장기간 지구성운동 후에는 대조군 수준으로 감소하였으며, 3일 운동 후와 비교하여 유의한($p<0.001$) 차이를 보였다.

2) SOD2 발현

SOD2는 주로 미토콘드리아에 존재하는 항산화 효소로서, 운동기간에 따른 골격근 내 발현 정도는 <Fig. 2B>와 같다. 1일 운동 후에는 대조군과 비교해 차이가 없었으나, 3일과 3주 운동 후에는 유의하게($p<0.001$) 증가하였다. 이러한 결과는 전종귀 등(2010)이 장기간 지구성트레이닝 후 SOD2 단백질 발현이 전정골근(tibialis anterior)에서 증가되었다는 결과와 일치한다.

3) Catalase 발현

Catalase는 세포에 넓게 분포되어있는데, 특히 peroxisome

에서 높은 농도를 나타내며, 미토콘드리아에서는 낮은 농도를 나타낸다(Halliwell & Gutteridge, 1989). 이러한 catalase의 운동 기간에 따른 골격근 내 발현 정도는 <Fig. 2C>에 나타난 것과 같이 SOD1과 유사한 결과를 보였다. 운동 3일 후에는 대조군에 비해 유의하게($p<0.01$) 증가되었으나, 3주간의 장기간 운동에 의해서는 3일 운동과 비교해 다시 감소($p<0.01$)하여 대조군과 비슷한 수준을 나타냈다.

4) GPx-1 발현

GPx-1은 주로 세포질에 존재하는 항산화 효소로서 많은 선행연구가 장기간 지구성운동 후 그 활성이 증가된다고 하였다(Laughlin et al., 1990; Sen et al., 1992). 그러나 본 연구의 GPx-1 단백질 발현 결과는 효소 활성화와는 다르게 1일 운동 후 대조군에 비해 유의하게($p<0.05$) 감소되었으나, 3일과 3주 운동 후에는 대조군과 비교해 차이가 없었다<Fig. 2D>. 따라서 지구성운동 시 GPx-1에 의한 항산화 능력(활성화×단백질 양)은 변화가 없거나 증가되었을 것이다.

Fig. 2. The effects of different exercise periods on expression of antioxidant enzymes in rat tricep muscles

* $p<0.05$ significantly different from sedentary group

# $p<0.01$ significantly different from 3 day exercise group

3. 미토콘드리아 효소

1) 전자전달 효소

항산화 효소와 미토콘드리아 생합성과의 관련성을 알아보기 위해 5개의 미토콘드리아 전자전달 효소(mitochondrial electron transport chain enzyme) 중 첫 번째와 중간지점의 효소인 NADH-UO와 COX1 발현 정도를 대표로 분석한 결과는 <Fig. 3>과 같다. COX1과 NADH-UO 모두 운동 후 유의하게($p<0.05$) 증가하였으며, 3주 운동 후에는 1일 운동에 비해 유의하게($p<0.05$) 높게 나타나 운동기간이 늘어날수록 미토콘드리아 생합성이 증가하는 경향을 나타냈다.

Fig. 3. The effects of different exercise periods on expression of mitochondrial electron transport chain enzymes in rat tricep muscles
* $p<0.05$ significantly different from sedentary group
# $p<0.05$ significantly different from 1day exercise group

Fig. 4. The effects of acute and prolonged endurance exercise on citrate synthase expression in rat tricep muscles
* $p<0.05$ significantly different from sedentary group

2) 크렙스 회로(Krebs Cycle) 효소

단기간과 장기간 지구성운동에 따른 미토콘드리아 생합성 정도를 알아보기 위해 미토콘드리아 기질(mitochondria matrix)에 존재하는 크렙스 회로 효소인 citrate synthase 발현 정도를 분석한 결과는 <Fig. 4>와 같다. 지구성운동에 따른 반응으로서 3일 운동 후에는 대조군과 비교해 차이가 없었으며, 3주 운동 후에는 대조군에 비해 유의하게($p<0.05$) 증가하였다.

IV. 논의

일반적으로 항산화 효소는 다양한 스트레스로 인해 활성산소가 증가할 때 이를 방어하기 위해 발현된다. 이에 본 연구에서는 단기간과 장기간 지구성운동에 따른 골격근 내 항산화 효소의 단백질 발현이 어떠한 양상을 나타내는 지 살펴보았다.

혈중 TBARS 농도는 혈중 반감기가 매우 짧은데, Johnson 등(2011)에 따르면 운동 직후 증가된 혈중 TBARS 농도는 1시간 후 안정 시 수준으로 감소된다. 이러한 특성을 고려하여 본 연구에서는 혈액을 1일, 3일 그리고 3주간 지구성운동을 실시한 후 마지막 훈련 직후 꼬리에서 채취하였다. 그 결과 지구성운동에 의한 산화스트레스는 <Fig. 1>에서 나타난 바와 같이 1일 운동에 의해 증가되었으며, 운동 횟수가 늘어날수록 그 정도는 안정 시 수준으로 감소하는데, 3일 운동에 의한 감소가 3주까지 지속되어 더 이상의 변화는 없었다. 이러한 결과는 <Fig. 3>에서 나타난 바와 같이 증가된 미토콘드리아 생합성과 관련이 있을 것으로 판단된다. 예를 들어, 지구성운동에 의한 골격근 적응이 완벽하게 이루어지기 전인 1회 운동직후에는 근육 내·외의 미토콘드리아 수와 양을 $10\text{ 개} \cdot \text{kg}^{-1}$ 로 가정하고, 산소섭취량이 $50\text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 이라면 개개의 미토콘드리아에 작용하는 산소부하는 $5\text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 이 된다. 그러나 지구성운동에 의해 골격근 적응이 충분히 이루어져 미토콘드리아가 ~2.5배 증가하여 $25\text{ 개} \cdot \text{kg}^{-1}$ 가 될 경우 개개의 미토콘드리아에 작용하는 산소이용률은 약 $2\text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 으로 60% 감소하기 때문에 각각의 미토콘드리아가 이용하는 산소는 그만큼 줄어들어(-60%) 산화스트레스가 더 적게 생성되기 때문이다. 그렇지만, 1일 운동에 의해 미토콘드리아 생합성이 증가하였으나, 산화스트레스가 증가된 것은 미토콘드리아 생합성에 핵심적인 역

할을 수행하는 PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor co-activator α)의 발현이 운동 3시간 후부터 증가(Wright et al., 2007) 하는 것과 같이 1회 6시간의 지구성운동으로는 미토콘드리아 생합성과 항산화 효소의 발현이 충분히 이루어지지 않았기 때문인 것으로 생각된다.

Booth & Holloszy(1977)에 의하면 약 1주일간 지구성운동이 지속될 때 cytochrome c와 citrate synthase 같은 미토콘드리아 효소가 증가하는데, 본 연구에서도 <Fig. 4>와 같이 3일 운동 후 citrate synthase 발현이 증가하지 않았고, 3주 운동 후 증가하였다. 따라서 3일 운동 후에는 COX1과 NADH-UO 발현이 증가되었지만, 모든 미토콘드리아 효소가 충분히 증가할 만큼 골격근 적응이 완벽하게 이루어지지 않았다. 그렇기 때문에 단기간 운동 시 생성된 산화스트레스의 조절을 위해서는 <Fig. 2>와 같이 세포질 내 항산화 효소인 SOD1과 catalase의 단백질 발현이 2배 이상 증가하고, 미토콘드리아에 존재하는 SOD2 발현 또한 2배 이상 증가되었기 때문에, 지구성운동에 대한 적응이 충분히 이루어지지 않은 상황에서는 세포질과 미토콘드리아에 존재하는 항산화 효소 공히 항산화 방어능력을 증가시켰을 것이다.

그렇지만 골격근 적응이 완벽하게 이루어져 미토콘드리아 생합성이 충분히 이루어질 경우 각각의 미토콘드리아에 작용하는 부하도 줄어들고, 미토콘드리아 전자전달효소의 모든 연결고리가 단단하게 이루어져 전자가 견고하게 전자전달계를 통해서 이동할 수 있게 된다. 그렇기 때문에 장기간 지구성운동 시에는 미토콘드리아 생합성의 증가로 산화스트레스의 생성이 감소하게 되고, 생성이 되더라도 미토콘드리아에 존재하는 항산화 효소인 SOD2 만으로도 충분한 방어능력이 갖춰져 산화스트레스가 세포질로 방출되지 않아 세포질에 존재하는 항산화 효소의 발현이 <Fig. 2>에 나타난 바와 같이 감소하게 된 것으로 판단된다. 이는 Higuchi 등(1985)이 세포질에 존재하는 항산화 효소인 SOD1과 catalase의 활성도는 장기간 운동 후 변화가 없어 세포질에 존재하는 항산화 효소의 능력은 중요치 않다는 주장과 일치한다.

본 연구는 골격근 내 항산화 효소의 단백질 발현 정도를 분석하여 선행연구에서의 항산화 효소 활성도 결과와 함께 항산화 방어능력을 추측해 볼 수 있다는 것에 의미가 있다. Higuchi 등(1985)에 의하면 3개월의 트레드밀 운동에 의해 미토콘드리아에 존재하는 SOD2의 활성도가 적근(red muscle)과 백근(white muscle) 모두에서 증가되

었다. 특히, 트레드밀 운동에 의해서는 백근의 동원이 잘 이루어지지 않는 데도 외측광근(white vastus lateralis)에서 14% 증가되었다. 그렇기 때문에 본 연구에서 사용한 수영운동은 주로 epitrochlearis와 triceps 근육과 같은 백근이 주로 동원된다는 점에서 SOD2 활성도를 직접 측정하지는 않았지만, Higuchi 등(1985)의 14%보다 더 많이 증가되었을 것으로 판단된다. 따라서 Higuchi 등(1985)에 의한 활성도와 본 연구에서 약 2배 증가된 SOD2 발현 결과인 <Fig. 2>를 종합해 볼 때, 지구성운동으로 인해 골격근 적응이 충분히 이루어질 경우 미토콘드리아에 존재하는 SOD2에 의한 항산화 방어능력이 최소 2.5배 이상 증가됨을 알 수 있다. 그렇지만 Higuchi 등(1985)은 미토콘드리아 효소(citrate synthase and cytochrome c) 활성도가 약 200% 증가되는 것에 비해 SOD2 활성도는 단지 14~37%만 증가하였기 때문에 SOD2 활성도의 증가는 미토콘드리아 효소 활성도의 증가율에 비해 오히려 감소됨으로서 장기간 지구력운동에 의해 적응된 골격근 내 미토콘드리아 SOD2는 산화스트레스를 조절하는데 핵심적인 역할을 하지 않는다고 주장하였다. 그러나 Slot 등(1986)이 처음으로 SOD2 항체를 사용하여 western blot 하기 시작하였다는 점에 비춰볼 때, Higuchi 등(1985)의 연구가 이루어진 시점에는 이들 효소에 대한 특이 항체가 없어 단백질 발현을 분석할 수가 없었기 때문에 이러한 결론을 내린 것으로 판단된다. 따라서 항산화 효소의 활성도를 측정하는 것도 중요하지만, 본 연구처럼 단백질 발현 정도를 분석하는 것 또한 중요하다. 그리고 본 연구는 과거 방법상의 어려움 등으로 인해 잘못 결론된 연구를 재평가 하였다는 것에 또 하나의 의미가 있다.

본 연구는 1일, 3일 그리고 3주간의 수영 운동 후 골격근 내 항산화 효소의 단백질 발현 정도를 분석하여 항산화 효소의 활성도를 분석한 선행연구의 결과와 함께 운동 기간에 따른 항산화 방어체계에 대해 알아보았다. 그 결과 운동 시 생성된 산화스트레스 조절은 지구성운동에 의해 골격근 적응이 완벽히 이루어지지 않은 단기간 운동과 같은 상황에서는 세포질과 미토콘드리아에 존재하는 다양한 항산화 효소에 의해 항산화 방어능력이 증가되어 이루어지며, 골격근 적응이 완벽히 이루어진 장기간 지구성운동과 같은 상황에서는 미토콘드리아 생합성과 미토콘드리아에 존재하는 효소인 SOD2에 의한 항산화 방어능력 증가로 이루어질 것이다. 뿐만 아니라, 운동 시에는 골격근 내 미토콘드리아에서 대부분의 산화스트레스가 생성되기

때문에 비만, 고혈압, 당뇨병과 같은 병적인 상황이 아닌 운동에 의한 항산화 방어체계 능력을 알아보기 위해서는 골격근을 이용하여 특정 항산화 효소의 활성도와 발현을 함께 분석하는 것이 바람직할 것이다.

V. 결론

본 연구는 운동기간에 따른 지구성운동 시 다양한 항산화 효소의 발현이 골격근에서 어떠한 양상을 나타내는지 알아보았다. 이를 위하여 쥐를 대상으로 1일, 3일 그리고 3주간 수영을 실시한 결과는 다음과 같다.

첫째, 지질 과산화물의 분해 시 생성되는 최종산물로서 대표적인 산화스트레스 표지물인 TBARS가 1일 운동 후 증가하였으나, 3일과 3주 운동 후에는 대조군 수준으로 회귀하였다.

둘째, 항산화 방어체계 중 세포질에 주로 존재하는 SOD1과 catalase의 경우 3일 운동 후 증가하였으나, 3주 운동 후에는 대조군 수준으로 회귀하였다. 그리고 미토콘드리아에 존재하는 항산화 효소인 SOD2의 경우 3일과 3주 운동 후 대조군에 비해 증가하였다.

셋째, 미토콘드리아 생합성은 1일, 3일 그리고 3주 운동에 의해 모두 증가하였으며, 3주 운동 후에는 1일 운동에 비해 더욱 증가하였다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 산화스트레스는 골격근 적응이 완벽히 이루어지지 않아 미토콘드리아 생합성이 충분히 이루어지지 않은 단기간 운동 시 생성되며, 이런 상황에서 생성된 산화스트레스는 세포질과 미토콘드리아에 존재하는 다양한 항산화 효소에 의해 항산화 방어능력이 증가하여 조절된 것으로 판단된다. 그리고 이와는 반대로 지구성운동에 의해 골격근 적응이 완벽히 이루어진 장기간 운동과 같은 상황에서는 미토콘드리아 생합성이 충분히 이루어져 산화스트레스 생성자체가 감소되고, 산화스트레스가 생성 되더라도 미토콘드리아에 존재하는 항산화 효소인 SOD2에 의한 항산화 방어능력의 증가로 인해 조절된 것으로 판단된다.

참고문헌

전종귀, 윤아람, 권순미, 이영란, 이왕록(2010). 장기간의 지구성트레이닝이 자연발생 고혈압쥐의 골격근

Mn-SOD, HSP 70, PPAR- γ 발현에 미치는 영향. 운동영양학회지, 14(3): 159-164.

Alessio, H., & Goldfarb, A. (1988). Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training. J. Appl. Physiol., 64: 1333-1336.

Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1995). Mitochondrial decay in aging. Biochem. Biophys. Acta., 1271: 165-170.

Booth, F. W., & Holloszy, J. O. (1977). Cytochrome c turnover in rat skeletal muscles. J. Biol. Chem., 252(2): 416-419.

Garcia-Roves, P. M., Han, D. H., Song, Z., Jones, T. E., Hucker, K. A., & Holloszy, J. O. (2003). Prevention of glycogen supercompensation prolongs the increase in muscle GLUT4 after exercise. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 285(4): E729-36.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1989). Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford: Clarendon Press, 86-122.

Higuchi, M., Cartier, L. J., Chen, M., & Holloszy, J. O. (1985). Superoxide dismutase and catalase in skeletal muscle: adaptive response to exercise. J. Gerontol., 40: 281-286.

Jenkins, R. R. (1988). Free radical chemistry: relationship to exercise. Sport Med., 5: 156-170.

Ji, L. L. (1998). Antioxidant enzyme response to exercise and training in skeletal muscle. In: Oxidative Stress in Skeletal Muscle, edited by A. Z. Reznick. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag., 105-127.

Johnson, B. D., Padilla J., Wallace J. P. (2011). The exercise dose affects oxidative stress and brachial artery flow-mediated dilation in trained men. Eur. J. Appl. Physiol., Published online: Apr 7.

Kiraly, M. A., Bates, H. E., Yue, J. T., Goche-Montes, D., Fediuc, S., Park, E., Matthews, S. G., Vranic, M., & Riddell, M. C. (2007). Attenuation of type2 diabetes mellitus in the male Zucker diabetic fatty rat: the effects of stress and non-volitional exercise. Metab., 56: 732-744.

Laughlin, M. H., Simpson, T., Sexton, W. L., Brown, O.

- R., Smith, J. K., & Korthuis, R. J. (1990). Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes, and exercise training. *J. Appl. Physiol.*, 68: 2337-2343.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193(1): 265-275.
- Meydani, M., Evans, W. J., Handelman, G., Biddle, L., Fielding, R. A., Meydani, S. N., Burrill, J., Fiatarone, M. A., Blumberg, J. B., & Cannon, J. G. (1993). Protective effect of vitamin E on exercise-induced oxidative damage in young and older adults. *Am. J. Physiol.*, 264(5 Pt 2): R992-8.
- Min, K., Smuder, A. J., Kwon, O., Kavazis, A. N., Szeto, H. H., & Powers, S. K. (2011). Mitochondrial-targeted antioxidants protect the skeletal muscle against immobilization-induced muscle atrophy. *J. Appl. Physiol.*, 111(5): 1459-66.
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.*, 417: 1-13.
- Ploug, T. B., Stallknecht, M., Pedersen, O., Kahn, B. B., Ohkuwa, T., Vinten, J., & Galbo, H. (1990). Effect of endurance training on glucose transport capacity and glucose transporter expression in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, 259(22): E778-E786.
- Powers, S. K., Ji, L. L., & Leeuwenburgh, C. (1999). Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 31(7): 987-997.
- Powers, S., Criswell, D., Lawler, J., Martin, D., Ji, L. L., Herb, R. A., & Dudley, G. (1994a). Regional training-induced alterations in diaphragmatic oxidative and antioxidant enzymes. *Respir. Physiol.*, 95: 227-237.
- Powers, S., Criswell, D., Lawler, J., Ji, L. L., Martin, D., Herb, R. A., & Dudley, G. (1994b). Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, 266: R375-R380.
- Revan, S., Balci, S. S., Pepe, H., Kurtoglu, F., Erol, A. E., & Akkus, H. (2010). Short duration exhaustive running exercise does not modify lipid hydroperoxide, glutathione peroxidase and catalase. *J. Sports Med. Phys. Fitness.*, 50(2): 235-240.
- Sen, C. K., Marin, E., Kretzschmar, M., & Hanninen, O. (1992). Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise, and immobilization. *J. Appl. Physiol.*, 73: 1265-1272.
- Slot, J. W., Geuze, H. J., Freeman, B. A., & Grapo, J. D. (1986). Intracellular localization of the copper- zinc and manganese superoxide dismutases in rat liver parenchymal cells. *Lab Invest.*, 55(3): 363-71.
- Wright, D. C., Han, D. H., Garcia-Roves, P. M., Geiger, P. C., Jones, T. E., & Holloszy, J. O. (2007). Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1alpha expression. *J. Biol. Chem.*, 282(1): 194-9.
- Yfanti, C., Nielsen, A. R., Akerstrom, T., Neilson, S., Rose, A. J., Richter, E. A., Lykkesfeldt, J., Fischer, C. P., & Pedersen, B. K. (2011). Effect of antioxidant supplementation on insulin sensitivity in response to endurance exercise training. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 300: E761-E770.
- Zembron-Lacny, A., Ostapiuk, J., Slowinska-Lisowska, M., Witkowski, K., & Szyszka, K. (2008). Pro-antioxidant ratio in healthy men exposed to muscle-damaging resistance exercise. *J. Physiol. Biochem.*, 64(1): 27-35.

논문투고일 : 2011. 08. 00

심사일 : 2011. 09. 06

심사완료일 : 2011. 11. 17