일회성 유산소 운동에 따른 흰쥐 비복근 내 미토콘드리아 기능 및 구조 조절 단백질의 발현

김정하 · 김재철 · 박대령 · 강윤석

전북대학교

Abstract

Kim, J. H., Kim, J. C., Park, D. R., Kang, Y. S. The effect of acute exercise on the expression of mitochondria function and content protein in rat skeletal muscle. *Exercise Science*, 21(2): 191-200, 2012. The aim of this study was to investigate the expression of Drp 1, Mfn 2, PGC-1 α , p53 and α B-crystallin protein in the skeletal muscle of Sprague-Dawley rats by endurance exercise(26 m/min, 10°, 45 min, 90 min, recovery 12 h). The expression of Drp 1, Mfn 2, PGC-1 α , p53 and α B-crystallin protein in skeletal muscle analyzed by western blotting. The expression of Drp 1, Mfn 2 and PGC-1 α protein significantly were increased in red gastrocnemius during exercise(45 min) and recovery 12 h. The expression of B-crystallin protein significantly were increased in red gastrocnemius during exercise(45 min). The expression of p53 protein in both red and white gastrocnemius was increased in all periods. These findings suggest that Drp 1, Mfn 2, PGC-1 α , p53 and α B-crystallin protein plays a role of mitochondrial homeostasis in skeletal muscle by endurance exercise.

Key words : acute endurance exercise, skeletal muscle, Drp 1, Mfn 2, PGC-1 α , p53, α B-crystallin

초 록

김정하, 김재철, 박대령, 강윤석. 일회성 유산소 운동에 따른 흰쥐 비복근 내 미토콘드리아 기능 및 구조 조절 단백질의 발현. 운동과학, 제21권 제2호, 191-200, 2012. 일회성 유산소 운동(26 m/min, 10°)에 따른 운동 중(45, 90 min)과 회복기(12 h) 시 흰쥐 비복근 내 Drp 1, Mfn 2, PGC-1 α , p53 및 α B-crystallin 단백질의 발현을 규명하는데 연구의 목적이 있으며, 골격근 내 단백질 발현은 western blotting 방법을 통해 분석하였다. 미토콘드리아 기능 및 구조와 관련된 인자인 Drp 1, Mfn 2, PGC-1 α 의 발현이 적색 비복근에서 운동 45분과 회복기 12시간에서 높게 증가한 반면 백색 비복근에서는 증가하지 않는 것으로 나타났다. α B-crystallin은 적색 비복근에서 운동 45분에 증가하였고 p53의 경우 적색 비복근과 백색 비복근 모두 운동 45분과 90분, 회복기 12시간에서 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Drp 1, Mfn 2, PGC-1 α , p53, 및 α B-crystallin이 운동 중 골격근내 미토콘드리아 기능과 구조의 변화에 적응을 유도하여 미토콘드리아의 항상성 유지에 긍정적으로 작용하고 있는 것으로 사료된다.

주요어 : 일회성 유산소 운동, 골격근, Drp 1, Mfn 2, PGC-1 α , p53, α B-crystallin

I. 서론

골격근 내 미토콘드리아는 골격근 수축에 필요한 에너지 생산에서 매우 중요한 역할을 담당하고 있기 때문에 미토콘드리아의 수와 크기에 의해 에너지 생산 능력은 증가하거나 감소하게 된다. 특히 규칙적인 유산소 운동은 골격근의 적응은 미토콘드리아 수와 크기를 증가시켜 지질대사 능력뿐만 아니라 운동 능력향상에 긍정적인 영향을 미치게 된다(Saltin & Rowell, 1980). 하지만 비규칙적인 일회성 유산소 운동은 젖산축적, 체내 온도 상승, 대사성 스트레스 증가, reactive oxygen species (ROS) 생성, 세포 내 칼슘증가, 세포막 손상(Noble 등, 2006; Febbraio 등, 2002)과 같은 스트레스를 유발하고 골격근 내 여러 기관 특히, 미토콘드리아의 손상을 야기하게 된다. 이처럼 운동 중 생성된 스트레스에 의해 손상된 미토콘드리아는 산화적 인산화 능력 및 ATP 생산 능력이 저하되고 결국 운동 지속능력에 부정적인 영향을 미치게 된다(Bo et al., 2010). 따라서 골격근 세포의 항상성 유지를 위해 손상된 미토콘드리아의 빠른 제거와 미토콘드리아 생합성을 통한 미토콘드리아 수와 밀도 증가(Hood et al., 2006) 그리고, 융합과 분열을 통한 미토콘드리아의 형태 및 기능적 변화가 유도되어야 한다(Chan, 2006). 미토콘드리아의 융합은 미토콘드리아 내막과 외막의 결합뿐만 아니라 미토콘드리아 물질(material)의 통합도 함께 이루어지는 과정이며(Chen et al., 2005) 미토콘드리아의 분열은 보다 작은 미토콘드리아로 분리되는 과정으로 기능적 결합을 야기하게 된다(Saleem et al., 2011). 그 중 미토콘드리아의 분열은 fission 1(Fis 1)과 dynamin-related protein 1(Drp 1)에 의해 조절된다고 알려져 있다. 그 중 Drp 1은 GTPase로써 미토콘드리아 분열지점에 결합하여 미토콘드리아 외막을 분리하고 미토콘드리아 분열을 촉진하게 된다. 골격근에서의 과도한 Drp 1의 활성화는 미토콘드리아의 분열을 촉진하여 대사적 장애를 야기하고 결국 세포사멸(apoptosis)을 유발하게 된다(Tanaka & Youle, 2008).

미토콘드리아의 융합은 Mitofusin(Mfn) 1과 2에 의해 조절된다. Mfn 1과 2는 미토콘드리아 융합뿐만 아니라 미토콘드리아의 기능 및 형태 조절에 중요한 역할을 수행한다. 특히 Mfn 2는 미토콘드리아 외막에 존재하며 글루코스와 지방산 산화(oxidation), 막 전위(membrane potential) 그리고 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)에 관여한다(Cartoni et al., 2005). 이러한 Mfn 2의 억제는 미토콘드리아 분열을 촉진하고 세포의 산소 소비 및 ATP 생산을 감소시키게 된다(Bach

et al., 2003; Santei et al., 2003; Koshiba et al., 2004; Bach et al., 2005).

미토콘드리아의 생합성은 peroxisomal proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α)에 의해 조절된다고 알려져 있다. 골격근에서의 PGC-1 α 는 운동과 같은 대사적 스트레스에 의한 반응으로 활성이 증가하여(Baar et al., 2002; Koves et al., 2005; Norrbom et al., 2004) 미토콘드리아 생합성, 에너지 대사 조절, 미토콘드리아 DNA 복제 및 전사과정에 관여하게 된다(Mootha et al., 2003; Lin et al., 2002).

운동 중 발생하는 여러 스트레스에 의한 골격근의 손상은 heat shock protein(HSP)27과 α B-crystallin과 같은 small heat shock proteins (small HSP)의 발현을 촉진하게 된다(Kostenko & Moens, 2009). small HSP 안정시 200-800kDa의 세포내 복합체 형태를 이루다가 산화적 스트레스에 의해 인산화되어 molecular chaperone을 형성 근 손상을 예방하고 단백질 구조의 안정성 유지에 관여한다(Ferns et al., 2006). 따라서 α B-crystallin 발현 증가는 운동 중 발생한 스트레스에 대한 방어기전으로 작용하게 된다.

운동에 의한 손상된 근세포 내 기관 및 미토콘드리아의 제거에 관여하는 단백질로 p53이 알려져 있다. p53은 전사 인자 (transcription factor)로서 일반적인 상황에서 세포내 p53 수준은 낮게 유지되지만 스트레스에 의해 급격하게 증가하여(Zhang 등, 2005) 유전자 보호 및 에너지 항상성 유지에 관여하게 된다(Maddocks & Vousden, 2011). 특히 손상된 세포의 증식을 억제하고 자가소화작용 및 세포사멸 그리고 미토콘드리아 분열을 통해 손상된 세포 내 기관을 분해하게 된다(Saleem et al., 2011).

운동은 미토콘드리아 기능향상과 크기 및 수의 증가를 유도하는 강력한 유도체로 잘 알려져 있다. 특히 운동 자극에 의해 활성이 증가하는 PGC-1 α 는 미토콘드리아 생합성뿐만 아니라 분열과 융합을 조절하는 Drp 1과 Mfn 2의 발현에 영향을 미쳐 미토콘드리아 형태 변화와 기능향상에 관여하게 된다(Liesa et al., 2008). 또한 small HSP 발현증가를 통해 산화적 스트레스에 대한 저항력 증가와 p53 단백질의 활성화로 세포의 항상성 유지 능력을 향상시킬 수 있는 것으로 제안되고 있다.

따라서 일회성 유산소 운동이나 회복기 동안 다양한 생리 생화학적 반응들에 의해 미토콘드리아의 기능 및 구조가 영향을 받을 수 있기 때문에 이를 조절하는 인자들의 발현 양상과 이를 조절하는 인자들 간의 관련성이 매우 중요하다. 그러나, 이를 규명하고자 하는 연구는 거의 이루어지지 않

고 있어 이들 인자들의 발현양상과 관련성을 규명하는 것이 매우 중요하다 하겠다.

본 연구에서는 일회성 유산소 운동 중과 운동 후 회복기에 근섬유 특성에 따른 미토콘드리아 분열, 융합 및 생합성 조절인자들인 Drp 1, Mfn 2, PGC-1 α 와 미토콘드리아 손상 예방 및 항상성 유지에 작용하는 α B-crystallin 그리고 p53의 발현 양상과 이들 인자들 간의 상호 관련성을 규명하는데 그 목적이 있다.

II. 연구 방법

1. 실험동물

이 연구에서 사용된 실험동물은 출생 시기(8주령)가 동일한 Spargue-Dawley계 수컷 (n=24)을 중앙동물실험(주)에서 공급받아 10주령 (321 $\pm$ 5.4g)째에 무작위로 선정하여 각 6마리씩 4개 집단 (통제집단, 운동 45분, 90분, 운동 후 회복기 12시간)으로 구분하였다.

2. 실험방법 및 분석

1) 실험동물 사육

실험동물은 J대학교 실험동물센터 (2011-2-0041)에서 plastic cage를 이용하여 2마리씩 사육하였으며, 사육실의 온도는 23~25 $^{\circ}$ C, 습도는 70~80%, 명암은 12시간 주기로 조절하였다. 선정된 실험동물은 전 실험 기간을 통하여 사판되는 고형사료 (단백질 22.5%, 지방 3.5%, 저섬유 7.0%, 회분 9.0%, 칼슘 0.7%, 인 0.5%; 대한동물)와 충분한 물을 공급하였다.

2) 운동방법

본 실험을 하기 전 모든 실험동물은 통제집단과 트레이닝 집단에 무작위로 배정된 다음 실험 3일 전 5~15 m/min와 10 $^{\circ}$ 의 경사에서 15분 동안 설치류용 traedmill (Omnipacer model LC-4, Omni tech columbus)에서 적응 훈련을 실시하였다. 이러한 적응 훈련이 끝난 후 운동 집단은 $\dot{V}O_2$ max의 약 70%인 26 m/min의 속도와 10 $^{\circ}$ 의 경사도에서 각각 45분과 90분 동안 일회성 트레드밀 달리기를 실시하였고(Bedford 등, 1979) 운동 후 회복기 발현양상을 확인하기 위해 일회성 운동 12시간 후 샘플을 추출하였다. 운동이 종료된 후 모든 실험동물

은 sodium pentobarbital (60mg/kg)(Sigma, U.S.A)을 복강에 주입하여 마취한 후 비복근을 type I 섬유의 분포가 높은 적색 비복근과 type II 섬유의 분포가 높은 백색 비복근으로 구분하여 적출한 다음 분석할 때 까지 -80 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

3. 분석방법

1) Western blotting 분석

적출된 조직에서 단백질을 추출하기 위하여 각 조직 100 μ g에 단백질 분해 용액 [150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tri-HCl(pH8.0), 1%-NP 40]에 단백질 분해 효소 억제제 (1mM aprotinin 0.1 mM leupeptin, 1mM pepstatin)가 함유된 용액 (1ml)을 첨가하여 분쇄기 (Ultra-Turrax T8, Germany)를 이용하여 분쇄한 다음 원심분리기 (Eppendorf, USA)를 이용하여 4 $^{\circ}$ C에서 14,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하였다. 원심 분리된 용액 중 상층액을 분리한 후 상층액 중 2 μ l를 단백질 분석 용액 (Bio-Rad, USA) 998 μ l에 첨가한 다음 spectrophotometer (Eppendorf, USA)를 이용하여 560 nm의 흡광도에서 단백질량을 정량하였다. 정량화된 단백질에서 각 샘플 당 동일한 단백질량 (20 μ g)을 SDS gel loading 용액에 총 20 μ l가 되도록 혼합한 다음 100 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성시켰다. 변성된 단백질 (20 μ l)을 스탠다드 단백질 마커 (SDS-PAGE molecular weight maker, Bio-Rad, USA)와 함께 Mini-protein II dual-slab apparatus (Bio-Rad, USA)에 의해 만들어진 10% SDS-polyacrylamide gel에 각 샘플을 주입한 다음 100 volt에서 2시간 동안 전기영동 하였다. 전기 영동된 gel를 PVDF membrane (Amersham, USA)에 전이시키기 위해 Mini trans-module (Bio-Rad, USA)를 이용하여 transfer 용액 (190 mM Glycine, 50 mM Tris-base, 20% methanol, 0.05% SDS)속에 단백질을 전기 영동된 젤과 PVDF membrane 및 3M paper를 차례로 겹치도록 한 다음 200 volt에서 4시간 동안 전이 하였다. 단백질이 전이된 membrane은 Phosphate-buffered saline (PBS) (NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ 1.44 g, KH₂PO₄ 0.24 g, PH 7.4)에 5% skim milk가 첨가된 용액에서 1시간 동안 blocking 하였다. 그 다음 membrane은 PBS에 0.1% tween 20이 함유된 용액 (PBST)에서 10분간 3번 세척되었으며, 세척된 membrane은 일차항체인 Drp 1 (SantaCruz, Ca), Mfn 2 (SantaCruz, Ca), PGC-1 α (SantaCruz, Ca), α B-crystallin (SantaCruz, Ca), p53 (SantaCruz, Ca)이 첨가된 용액에서 1시간 동안 반응시킨 후 PBST용액에서 1x15분, 2x5분 동안 세척되

었다. 일차 항체에서 반응된 membrane은 anti-mouse 및 rabbit IgG conjugated 이차항체가 첨가된 용액에서 1시간 동안 반응시킨 다음 PBST 용액에서 1x15분, 2x5분 동안 세척되었다. 세척된 membrane은 ECL detection reagent (Amersham, USA) 용액 1 ml에 1분간 노출된 후 imaging system인 LAS-3000 (FUJIFILM, Japan)을 통해 immunoreactive bands의 상대적 강도가 정량화되었다.

4. 자료처리 방법

측정된 자료는 SPSS Win 10.0 통계 프로그램을 이용하여 평균과 표준편차를 산출하였으며, 집단간 평균 차 검증은 일원 변량분석 (one-way ANOVA)을 적용하였다. 가설의 수락기준은 $p < .05$ 수준에 두었으며, 분석결과 통계적으로 유의한 차이가 있을 경우 Student Newman-Keul 방식에 의해 사후 검증을 실시하였다.

III. 연구 결과

1. 일회성 트레드밀 운동 및 운동 후 회복기 골격근 내 Drp 1 단백질의 발현

일회성 트레드밀 운동을 실시한 결과 적색 비복근 내 Drp 1 단백질의 발현은 운동 전(12.57 ± 0.97)에 비해 운동 45분(25.28 ± 1.70)과 운동 후 회복기 12시간(28.38 ± 1.98)에서 높게

Fig 1. Western blot analyses of Drp 1 protein in rat skeletal muscle by acute treadmill exercise; R(rest), E45(exercise 45 minutes), E90(exercise 90 minutes), 12H(recovery 12 hours). Values represents the mean $\pm$ SE of 6 rats per each group; * $p < .05$: different between R(rest) groups.

발현된 반면에 운동 90분(8.14 ± 1.12)에서는 발현이 감소하였다. 사후 검증 결과 운동 전과 운동 45분, 90분 그리고 회복기 12시간에서 유의한 차이($p < .05$)가 있는 것으로 나타났다. 백색 비복근 내 Drp 1 단백질의 발현은 운동 전(6.62 ± 0.99)에 비해 운동 45분(8.61 ± 1.97)증가를 나타냈고 운동 90분(5.97 ± 0.72) 회복기 12시간(4.82 ± 0.75)에는 통제군에 비해 감소하는 것으로 나타났다(Fig 1).

2. 일회성 트레드밀 운동 및 운동 후 회복기 골격근 내 Mfn 2 단백질의 발현

일회성 트레드밀 운동을 실시한 결과 적색 비복근 내 Mfn 2 단백질의 발현은 운동 전(9.33 ± 1.13)에 비해 운동 45분(32.88 ± 0.59)과 회복기 12시간(39.72 ± 1.03)에서 높게 발현된 반면 운동 90분(2.76 ± 0.30)에서는 통제군에 비해 감소하였다. 특히, 회복기 12시간에서 현저하게 증가하는 것으로 나타났다. 사후 검증 결과 운동 전과 운동 45분, 운동 후 회복기 12시간에서 유의한 차이($p < .05$)가 있는 것으로 나타났으며 운동 90분에서는 유의($p < .05$)하게 감소하였다. 백색 비복근 내 Mfn 2 단백질의 발현은 운동 전(4.71 ± 0.72)에 비해 운동 90분(4.71 ± 0.56)에서 변화가 관찰되지 않았지만 운동 45분(3.66 ± 0.73)과 회복기 12시간(2.72 ± 0.44)에는 다소 감소하였다. 사후 검증 결과 운동 전과 회복기 12시간에서 유의한 차이($p < .05$)가 있는 것으로 나타났다(Fig 2).

Fig 2. Western blot analyses of Mfn 2 protein in rat skeletal muscle by acute treadmill exercise.

3. 일회성 트레드밀 운동 및 운동 후 회복기 골격근내 PGC-1 α 단백질의 발현

일회성 트레드밀 운동을 실시한 결과 적색 비복근 내 PGC-1 α 단백질의 발현은 운동 전(7.63 ± 0.94)에 비해 운동 45분(33.71 ± 1.95)과 회복기 12시간(39.78 ± 1.28)에서 높게 발현된 반면, 운동 90분(5.37 ± 1.16)에서는 발현이 감소하였다. 특히, 운동 후 회복기 12시간에서 현저하게 증가하는 것으로 나타났다. 사후 검증 결과 운동 전과 운동 45분, 회복기 12시간에서 운동 집단 간에 유의한 차이($p < .05$)가 있는 것으로 나타났다. 백색 비복근 내 PGC-1 α 단백질의 발현은 운동 전(4.72 ± 0.71)에 비해 운동 45분(2.51 ± 0.62)과 90분(4.15 ± 0.80) 그리고 회복기 12시간(2.92 ± 0.58)에서 감소하는 것으로 나타났다(Fig 3).

Fig 3. Western blot analyses of PGC-1 α protein in rat skeletal muscle by acute treadmill exercise.

4. 일회성 트레드밀 운동 및 운동 후 회복기 골격근내 α B-crystallin 단백질의 발현

일회성 트레드밀 운동을 실시한 결과 적색 비복근 내 α B-crystallin 단백질의 발현은 운동 전(13.49 ± 1.51)에 비해 운동 45분(20.50 ± 1.75) 증가하였고 운동 90분(10.65 ± 0.44)에서는 감소하였고 회복기 12시간(13.66 ± 1.19)에서 운동 전 수준을 유지하였다. 특히, 운동 45분에서 현저하게 증가하는 것으로 나타났다. 사후 검증 결과 운동 전에 비해 운동 45분 유의한($p < .05$) 증가를 보였으며 운동 90분에서 유의하게 감소하였다. 백색 비복근 내 α B-crystallin 단백질의 발현은 운동 전(12.23 ± 0.50)에 비해 운동 45분(10.17 ± 0.55), 90분(10.37 ± 0.75) 그리고 회복기 12시간(8.76 ± 1.01)에서 낮게 발현되었다. 사후 검증 결과 운동 전보다 회복기 12시간에서

유의한 차이($p < .05$)가 있는 것으로 나타났다(Fig 4).

Fig 4. Western blot analyses of α B-crystallin protein in rat skeletal muscle by acute treadmill exercise.

5. 일회성 트레드밀 운동 및 운동 후 회복기 골격근 내 p53 단백질의 발현

일회성 트레드밀 운동을 실시한 결과 적색 비복근 내 p53 단백질의 발현은 운동 전(8.46 ± 1.10)에 비해 운동 45분(17.75 ± 1.19)과 운동 90분(11.25 ± 1.01) 그리고 회복기 12시간(12.48 ± 0.89)에서 높게 발현되었으며 특히, 운동 45분에서 현저하게 증가하는 것으로 나타났다. 사후 검증 결과 운동 45분과 90분 그리고 회복기 12시간에서 통제집단에 비해 유의한 차이($p < .05$)를 나타냈다. 백색 비복근 내 p53 단백질의 발현은 운동 전(5.40 ± 0.64)에 비해 운동 45분(20.24 ± 1.89)과 운동 90분(10.98 ± 0.91) 그리고 회복기 12시간(12.05 ± 0.75)에서 높게 발현되었으며 특히, 운동 45분에서 높은 발현증가를 나타냈다. 사후 검증 결과 운동 45분과 90분 그리고 회복기 12시간에서 통제집단에 비해 유의한 차이($p < .05$)를 나타냈다(Fig 5).

Fig 5. Western blot analyses of p53 protein in rat skeletal muscle by acute treadmill exercise.

IV. 논의

이 연구의 주요한 결과는 미토콘드리아 분열과 융합 그리고 생합성을 조절하는 Drp 1, Mfn 2, PGC-1 α 의 발현이 적색 비복근에서 운동 전 보다 운동 45분과 회복기 12시간에서 유의하게 증가하는 것으로 나타났으며, 골격근 손상을 예방하는 α B-crystallin의 발현은 운동 중 45분에서 유의하게 증가되는 것으로 나타났다. 손상된 미토콘드리아의 분해를 조절하는 p53의 발현은 운동 45분과 90분 그리고 운동 후 12시간에서 증가하는 것으로 나타났다. 하지만 백색 비복근에서는 p53을 제외한 Drp 1, Mfn 2, PGC-1 α 와 α B-crystallin은 유의한 증가는 나타나지 않았다. 이러한 결과는 일회성 유산소 운동을 하는 동안 주로 동원되는 근섬유의 특성에 기초한 것으로서 type I 섬유의 분포가 높은 적색 비복근이 주로 사용되었음을 의미한다. 이러한 결과는 이들 인자들이 운동 중 생성된 다양한 스트레스 반응에 대하여 미토콘드리아 기능 및 구조에 긍정적으로 작용하고 있을 뿐만 아니라 회복기 12시간에서의 증가된 발현은 근세포 내 손상된 미토콘드리아의 회복과 치료에 긍정적 영향을 미치는 것으로 사료된다.

운동을 하는 동안 반복적으로 일어나는 골격근의 수축은 높은 에너지 동원을 요구하게 되고 미토콘드리아에서 지방과 산소를 이용한 산화적 인산화 과정을 통해 많은 에너지를 생산하게 되지만 산화적 인산화 과정 중 사용된 산소는 완전 연소되지 못하고 부산물인 ROS를 생성하게 된다(Naqui et al., 1986). 일상생활 또는 저강도 운동에 의해 생성된 ROS는 체내 항산화 방어시스템에 의해 제거되지만 과도한 운동에 의해 생성된 ROS는 항산화 방어 시스템의 능력을 초과하게 되고 결국 미토콘드리아의 손상을 야기하게 된다(Gonenc et al., 2000). 따라서 손상된 미토콘드리아는 세포사멸, 자가소화작용 및 미토콘드리아 분열을 통해 제거되고 미토콘드리아 융합과 생합성을 통한 미토콘드리아 형태와 기능의 변화 그리고 미토콘드리아 수와 밀도의 증가를 통해 미토콘드리아 및 세포 내 환경 그리고 에너지 생산 능력은 항상성을 유지하게 된다(Saleem et al., 2009; Saleem et al., 2011).

미토콘드리아의 분열을 조절하는 단백질은 Fis 1과 Drp 1로 알려져 있다. 그 중 Drp 1은 주로 세포질에 존재하며 미토콘드리아에 결합하여 외막의 분해를 촉진하고 미토콘드리아 분열을 야기하게 된다(Smirnova et al., 1998; Smirnova et al., 2001). 분열된 미토콘드리아는 형태적 변화뿐만 아니

라 산화능력 저하와 같은 미토콘드리아 기능저하를 유도하게 된다(Saleem et al., 2011). 또한 골격근에서의 Drp 1의 발현 증가는 세포사멸 관련인자인 Bax의 활성화와 cytochrome-c 방출을 증가시켜 세포사멸에도 관여하게 된다(Tanaka & Youle, 2008). Li(2010)등은 hydrogen peroxide로 유도된 골격근 세포에서의 산화적 스트레스로 인해 Drp 1의 발현과 미토콘드리아 분열이 증가하였음을 보고하였고 다양한 자극에 의한 세포사멸에서 Drp 1이 미토콘드리아 분열의 시작을 유도한다고 제시하였다. 본 연구결과 운동 45분에서 Drp 1의 발현 증가는 산화적 스트레스로부터 미토콘드리아 항상성 유지를 위한 미토콘드리아 기능과 구조의 변화에 긍정적으로 작용하고 있음을 의미한다.

미토콘드리아 융합을 조절하는 단백질은 Mfn 1과 2로 알려져 있다. 미토콘드리아 융합은 두 개의 다른 미토콘드리아의 외막과 내막의 결합뿐만 아니라 미토콘드리아내 물질의 융합을 촉진하여 세포성장과 미토콘드리아 막 전위(membrane potential), 세포호흡 등의 기능향상을 촉진하게 된다(Sheridan & Martin, 2010; Chen et al., 2005). 이러한 Mfn 2의 결핍은 미토콘드리아의 산화적 능력과 글루코스 산화의 저하를 유도하여 미토콘드리아의 정상적인 기능을 억제하게 된다(Bach et al., 2003). Cartoni(2005) 등은 10km 사이클 운동 후 회복기 24시간 외측광근에서 Mfn 2 및 미토콘드리아 기능과 관련된 단백질의 발현이 증가하여 운동에 의한 미토콘드리아 기능 향상과 구조변화는 회복기에 이루어지고 있음을 보고하였다. 본 연구에서도 회복기 12시간에서 Mfn 2 발현이 증가한 것은 운동으로 미토콘드리아 기능향상 및 손상된 미토콘드리아의 회복과 치료를 위해 하나의 결과로써 사료되며, 운동 중 45분에서의 유의한 증가는 운동 중 생성된 스트레스에 의한 미토콘드리아 기능과 구조의 변화를 긍정적 방향으로 유도하기 위한 하나의 결과로 사료된다.

운동에 의한 미토콘드리아 생합성은 미토콘드리아의 기능 및 구조 변화에 중요한 역할을 담당하며 이를 조절하는 인자는 PGC-1 α 이다. PGC-1 α 는 핵내 전사조절 도움인자로서 미토콘드리아 생합성, 순응성 열생성(adaptive thermogenesis), 세포 호흡, 당신생합성과 같은 대사적 과정을 조절하는 중요한 인자로 잘 알려져 있다(Knutti & Kralli, 2001; Puigserver & Spiegelman, 2003; Kelly & Scarpulla, 2004). 골격근에서의 PGC-1 α 의 발현은 운동과 같은 대사적 스트레스에 의한 반응으로 활성이 증가하여(Goto et al., 2000; Baar et al., 2002; Pilegaard et al., 2003; Russell et al., 2003) 미토콘드리아 생합

성 및 산화적 인산화와 관련된 유전자의 발현을 촉진하게 된다(Wu et al., 1999; Lin et al., 2002; Mootha et al., 2004; Schreiber et al., 2004). 수영운동을 실시한 Wright(2006)등의 연구에서 운동 직후 유의한 증가를 보이지 않았지만 운동 후 회복기 3시간부터 18시간 까지 PGC-1 α 단백질의 발현이 증가하였고 트레드밀 운동을 실시한 Leick(2008) 등의 연구에서도 운동 후 PGC-1 α 의 발현과 미토콘드리아 생합성 및 호흡체인 관련인자들의 발현이 증가하여 운동으로 인한 미토콘드리아의 생합성과 산화적 능력이 증가하였음을 보고 하였다. 본 연구결과에서도 적색 비복근에서 PGC-1 α 의 발현이 운동 45분과 회복기 12시간에서 유의한 증가를 나타냈는데 특히, 회복기 12시간에서 유의한 증가는 운동 중 손상된 미토콘드리아의 회복 및 기능 향상을 위해 발현이 증가된 것으로 사료되며, 운동 45분에서의 발현은 운동 중 생성된 스트레스에 대한 미토콘드리아의 방어기전 및 기능유지를 위한 항산화 반응으로 발현이 증가된 것으로 사료된다.

본 연구의 중요한 결과 중 하나는 운동과 운동 후 회복기에서 미토콘드리아 구조 및 기능 조절에 관여하는 Drp 1, Mfn 2, PGC-1 α 의 발현양상에 관련성이 높다는 점이다. 운동 후 회복기에서 이들 인자들의 유의한 증가는 많은 연구에서 논의 되어왔지만 운동 45분에서의 이들 인자들의 발현 증가와 비슷한 발현 양상에 따른 관련성은 매우 의미있는 결과로 사료된다. 본 연구와 유사한 일회성 운동을 실시한 Bo(2010) 등의 연구에서 Mfn 2 mRNA의 발현은 150분 운동과 운동 후 회복기 6시간까지 감소하였고 12시간이후 증가하였지만 Drp 1과 유사한 Fis 1의 발현은 운동과 운동 후 회복기 모두 증가하여 운동을 하는 동안 발현양상이 상이하게 나타났다. 하지만 본 연구 결과 일회성 운동 자극에 대한 미토콘드리아 분열과 융합이 동시에 일어나고 있음을 의미하며, 특히 운동 45분에서의 급격한 발현 증가와 운동 후 회복기 12시간에서의 발현 증가는 운동 중 생성된 스트레스에 의한 미토콘드리아의 산화적 손상에 대한 방어와 미토콘드리아 구조 및 기능 유지 및 회복기 손상된 미토콘드리아의 회복과 치료과정에 상호연관되어 긍정적으로 작용하고 있는 것으로 사료된다.

운동 중 발생된 스트레스에 의한 골격근 손상을 방어하기 위해 small HSP인 HSP27과 α B-crystallin의 발현이 증가하게 된다(Kostenko & Moens, 2009). small HSP은 안정시 200~800kDa의 세포내 복합체 형태를 이루다가 산화적 스트레스에 의해 인산화 되어 molecular chaperone을 형성 근 손상을 예방하고 단백질 구조의 안정성 유지에 관여한다(Ferns et

al., 2006). 따라서 운동에 의한 골격근 내 α B-crystallin 발현의 증가는 운동으로 야기된 스트레스가 증가하고 있음을 의미한다. 본 연구 결과 적색 비복근에서 α B-crystallin의 발현이 운동 45분에서 유의하게 증가 하였다. 이러한 결과는 고강도 트레드밀 운동 중 발생된 스트레스에 의해 골격근 손상이 이루어지고 있고 있음을 의미한다.

운동 중 손상된 기관의 분해 및 제거를 통한 항상성 유지는 p53에 의해 이루어진다. p53은 핵내 전사인자로서 스트레스 상황에서 활성이 증가하여 세포순환 억제, 세포사멸, 자가소화작용, 항산화, DNA repair, 세포 분화, 노화 등의 기능을 수행한다고 알려져 있다(Vogelstein et al., 2000). 그 중 p53의 대표적인 기능은 손상된 세포 및 기관의 분해를 억제하여 추가적인 손상을 방지하고 세포사멸과 자가소화작용의 촉진으로 손상이 진행된 세포 및 기관을 제거하여 세포의 항상성 유지에 기여하게 된다(Olovnikov et al., 2009). 골격근에서의 p53 발현 증가는 Bax 활성화와 미토콘드리아에서 cytochrome c 방출을 유도하여 세포사멸을 촉진하게 된다(Miyashita & Reed, 1995). 또한 스트레스 상황에서 발현이 증가하여 AMPK와 TSC(tuberous sclerosis complex)를 통한 자가소화작용을 촉진하여 손상된 세포 및 세포 내 기관을 제거하게 된다(Maiuri et al., 2010). 본 연구 결과에서도 적색 비복근과 백색 비복근 모두 운동 45분과 90분, 회복기 12시간 유의한 증가를 보여 운동 중 발생한 스트레스에 의해 손상된 미토콘드리아의 분해를 유도하고 세포의 항상성유지에 관여하는 것으로 사료된다.

또한 최근 연구에서 p53의 활성이 미토콘드리아 형태 및 기능 유지에도 관여하고 있다고 제시하였다. Li(2010)등은 hydrogen peroxide 처치에 의해 미토콘드리아 분열이 증가하였고 p53과 Drp 1 활성이 증가를 나타냈다. 하지만hydrogen peroxide와 p53RNAi를 함께 처치한 그룹에서는 Drp 1의 발현과 미토콘드리아 분열은 감소하였다. 따라서 p53의 활성은 Drp 1을 경유하여 미토콘드리아 분열에 관여하고 있음을 제시하였다. 또한 본 연구 결과에서 p53과 Drp 1의 발현이 운동 45분과 회복기 12시간에서 증가하여 두 단백질의 발현과 미토콘드리아 분열에 상관관계가 있을 거라 사료되지만 추후 형질 전환 및 활성 억제를 이용한 좀 더 명확하고 체계적인 연구로 운동 상황에서 Drp 1 발현과 미토콘드리아 분열 그리고 p53발현의 상관관계를 규명하는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

일회성 유산소 운동과 운동 후 회복기 골격근 내 Drp 1, Mfn 2, PGC-1 α , α B-crystallin 및 p53 단백질의 발현을 구명하기 위해 일회성 트레드밀 운동을 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 미토콘드리아 분열, 융합, 생합성에 관여하는 Drp 1, Mfn 2, PGC-1 α 단백질의 발현은 적색 비복근에서 운동 45분과 회복기 12시간에서 유의하게 증가한 반면 백색 비복근에서는 증가하지 않는 것으로 나타났다.
2. α B-crystallin 단백질의 발현은 적색 비복근에서 운동 45분에서 유의하게 증가하였으며, 백색 비복근에서는 유의하게 증가하지 않는 것으로 나타났다.
3. p53 단백질의 발현은 적색 및 백색 비복근에서 운동 45분과 90분, 회복기 12시간에서 유의하게 증가하는 것으로 나타났다.

이러한 결과들은 일회성 트레드밀 운동에 의한 미토콘드리아 분열과 융합 그리고 생합성에 관여하는 Drp 1, Mfn 2, PGC-1 α 의 발현이 동시에 일어나 미토콘드리아 형태 및 기능 변화에 관여하고 있으며 α B-crystallin과 p53 발현에 의해 미토콘드리아 손상 예방 및 항상성 유지에 작용하는 것으로 사료된다.

참고문헌

- Baar, K., Wende, A. R., Jones, T. E., Marison, M., Nolte, L. A., Chen, M., Kelly, D. P., & Holloszy, J. O. (2002). Adaptations of skeletal muscle to exercise : rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1, FASEB J., 16 : 1879-1886.
- Bach, D., Pich, S., Soriano, F. X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., Daugaard, J. R., Lloberas, J., Camps, M., Zierath, J. R., Rabasa-Lhoret, R., Wallberg-Henriksson, H., Laville, M., Palacin, M., Vidal, H., Rivera, F., Brand, M., & Zorzano, A. (2003). Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity., J Biol Chem., 278 : 17190-17197.
- Bach, D., Naon, D., & Pich, S., et al. (2005). Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle : effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6., Diabetes, 54 : 2685-2693.
- Bedford, T. G., Tipton, C. M., Wilson, N. C., Oppliger, R. A., & Gisolfi, C. V. (1979). Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures. J Appl Physiol, 47(6) : 1278-83.
- Bo, H., Zhang, Y., & Ji, L. L. (2010). Redefining the role of mitochondria in exercise : a dynamic remodeling., Ann N Y Acad Sci, 1201 : 121-8.
- Cartoni, R., Léger, B., Hock, M. B., Praz, M., Crettenand, A., Pich, S., Ziltener, J. L., Luthi, F., Dériaz, O., Zorzano, A., Gobelet, C., Kralli, A., & Russell, A. P. (2005). Mitofusins 1/2 and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise., J Physiol., 15;567 : 349-58.
- Chan, D. C. (2006). Mitochondrial fusion and fission in mammals. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 22 : 79-99.
- Chen, H., Chomyn, A., & Chan, D. C. (2005). Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. J. Biol. Chem., 280 : 26185-26192.
- Febbraio, M. A., Steensberg, A., Fischer, C. P., Keller, C., Hiscock, N., & Pedersen, B. K. (2002). IL-6 activates HSP72 gene expression in human skeletal muscle., Biochem Biophys Res Commun., 6;296(5) : 1264-6.
- Ferns, G., Shams, S., & Shafi, S. (2006). Heat shock protein 27 : its potential role in vascular disease. Int J Exp Pathol., 87(4) : 253-74.
- Gonenc, S., Acikgoz, O., Semin, I., & Ozgonul, H. (2000). The effect of moderate swimming exercise on antioxidant enzymes and lipid peroxidation levels in children. Indian J Physiol Pharmacol., 44(3) : 340-344.
- Goto, M., Terada, S., Kato, M., Katoh, M., Yokozeki, T., Tabata, I., & Shimokawa, T. (2000). cDNA Cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle in swimming-exercised rats. Biochem Biophys Res Commun., 274 : 350-354.
- Hood, D. A., Irrcher, I., Ljubcic, V., & Joseph, A. M. (2006).

- Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J Exp Biol.*, 209 : 2265–75.
- Kelly, D. P., & Scarpulla, R. C. (2004). Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev.*, 18 : 357–368.
- Knutti, D., & Kralli, A. (2001). PGC-1, a versatile coactivator. *Trends Endocrinol Metab.*, 12 : 360–365.
- Koshiba, T., Detmer, S. A., Kaiser, J. T., Chen, H., McCaffery, J. M., & Chan, D. C. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science*, 305 : 858–862.
- Kostenko, S., & Moens, U. (2009). Heat shock protein 27 phosphorylation : kinases, phosphatases, functions and pathology. *Cell Mol Life Sci.*, 66(20) : 3289–307.
- Koves, T. R., Li, P., An, J., Akimoto, T., Slentz, D., Ilkayeva, O., Dohm, G. L., Yan, Z., Newgard, C. B., Muoio, D. M. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator 1 α -mediated metabolic remodeling of skeletal myocytes mimics exercise training and reverses lipid-induced mitochondrial inefficiency. *J Biol Chem*, 30;280 : 33588–98.
- Leick, L., Wojtaszewski, J. F., Johansen, S. T., Kiilerich, K., Comes, G., Hellsten, Y., Hidalgo, J., & Pilegaard, H. (2008). PGC-1 α is not mandatory for exercise- and training-induced adaptive gene responses in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 294(2) : E463–74.
- Li, J., Donath, A. M., Li, Y., Qin, D., Prabhakar B. S., & Li, P. (2010). miR-30 Regulates Mitochondrial Fission through Targeting p53 and the Dynamin-Related Protein-1 Pathway. *PLoS Genet.*, 6(1) : e1000795.
- Liesa, M., Borda-d'Agua, B., Medina-Gómez, G., Lelliott, C. J., Paz, J. C., Rojo, M., Palacín, M., Vidal-Puig, A., & Zorzano, A. (2008). Mitochondrial fusion is increased by the nuclear coactivator PGC-1 β . *PLoS One.*, 3(10) : e3613.
- Lin, J., Wu, H., Tarr, P. T., Zhang, C. Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L. F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E. N., Lowell, B. B., Bassel-Duby, R., & Spiegelman, B. M. (2002). Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*, 418 : 797–801.
- Maddocks, O. D., & Voutsden, K. H. (2011). Metabolic regulation by p53. *J. Mol. Med.*, 89 : 237–45.
- Maiuri, M. C., Galluzzi, L., Morselli, E., Kepp, O., Malik, S. A., & Kroemer, G. (2010). Autophagy regulation by p53. *Curr Opin Cell Biol.*, 22(2) : 181–5.
- Miyashita, T., & Reed, J. C (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.*, 80 : 293–299.
- Mootha, V. K., Lindgren, C. M., Eriksson, K. F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstrale, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M. J., Patterson, N., Mesirov, J. P., Golub, T. R., Tamayo, P., Spiegelman, B., Lander, E. S., Hirschhorn, J. N., Altshuler, D., & Groop, L. C. (2003). PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature Genet.*, 34 : 267–273.
- Mootha, V. K., Handschin, C., Arlow, D., Xie, X., St Pierre, J., Sihag, S., Yang, W., Altshuler, D., Puigserver, P., Patterson, N., Willy, P. J., Schulman, I. G., Heyman, R. A., Lander, E. S., & Spiegelman, B. M. (2004). PGC-1 α and Gabpa/b specify PGC-1 α -dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 101 : 6570–6575.
- Naqui, A., Chance, B., & Cadenas, E. (1986). Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Annu Rev Biochem.*, 55 : 137–166.
- Noble, E. G., Ho, R., & Dzaliszynski, T. (2006). Exercise is the primary factor associated with Hsp70 induction in muscle of treadmill running rats. *Acta Physiol (Oxf.)*, 187(4) : 495–501.
- Norrbom, J., Sundberg, C. J., Ameln, H., Kraus, W. E., Jansson, E., & Gustafsson, T. (2004). PGC-1 α mRNA expression is influenced by metabolic perturbation in exercising human skeletal muscle. *J Appl Physiol.*, 96(1) : 189–94.
- Olovnikova, I. A., Julia, E., Kravchenko, J. E., & Chumakov, P. M. (2009). Homeostatic functions of the p53 tumor suppressor : Regulation of energy metabolism and antioxidant defense. *Seminars in Cancer biology.*, 19 :

- 32-41.
- Pilegaard, H., Saltin, B., & Neufer, P. D. (2003). Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle., *J Physiol.*, 546 : 851-858.
- Puigserver, P., & Spiegelman, B. M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α) : transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev.*, 24 : 78-90.
- Russell, A.P., Feilchenfeldt, J., Schreiber, S., Praz, M., Grettenand, A., Gobelet, C., Meier, C. A., Bell, D. R., Kralli, A., Giacobino, J. P., & Deriaz, O. (2003). Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor- α in skeletal muscle. *Diabetes.*, 52 : 2874-2881.
- Saleem, A., Adhietty, P. J., & Hood, D. A. (2009). Role of p53 in mitochondrial biogenesis and apoptosis in skeletal muscle. *Physiol Genomics.*, 37 : 58-66.
- Saleem, A., Carter, H. N., Iqbal, S., & Hood, D. A. (2011). Role of p53 within the regulatory network controlling muscle mitochondrial biogenesis. *Exerc Sport Sci Rev.*, 39(4) : 199-205.
- Saltin, B., & Rowell, L. B. (1980). Functional adaptations to physical activity and inactivity. *Fed Proc.*, 39 : 1506-1513.
- Santel, A., Frank, S., Gaume, B., Herrler, M., Youle, R. J., & Fuller, M. T. (2003). Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci.*, 116 : 2763-2774.
- Sheridan, C., & Martin, S. J. (2010). Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis. *Mitochondrion*, 10(6) : 640-8.
- Smirnova, E., Shurland, D. L., Ryazantsev, S. N., & van der Bliek, A. M. (1998). A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J Cell Biol.*, 143 : 351-358.
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D. L., & van der Bliek A. M. (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell.*, 12 : 2245-2256.
- Schreiber, S. N., Emter, R., Hock, M. B., Knutti, D., Cardenas, J., Podvinec, M., Oakeley, E. J., & Kralli, A. (2004). The estrogen-related receptor α (ERR α) functions in PPAR γ coactivator 1 α (PGC-1 α)-induced mitochondrial biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 101 : 6472-6477.
- Tanaka, A., & Youle, R. J. (2008). A chemical inhibitor of DRP1 uncouples mitochondrial fission and apoptosis. *Mol Cell.*, 29 : 409-410.
- Vogelstein, B., Lane, D., & Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature.*, 408(6810) : 307-10.
- Wright, D. C., Han, D. H., Garcia-Roves, P. M., Geiger, P. C., Jones, T.E., & Holloszy, J. O. (2006). Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1 α expression., *J Biol Chem.*, 5;282(1) : 194-9.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R. C., & Spiegelman, B. M. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1., *Cell*, 98 : 115-124.
- Zhang, Y., Fong, C. C., Wong, M. S., Tzang, C. H., Lai, W. P., Fong, W. F., Sui, S. F., & Yang, M. (2005). Molecular mechanisms of survival and apoptosis in RAW 264.7 macrophages under oxidative stress. *Apoptosis*, 10(3) : 545-56.

논문투고일 : 2012. 02. 29
 심사일 : 2012. 03. 31
 심사완료일 : 2012. 05. 13