12주간의 고지방 식이가 지방내 혈관 함량에 미치는 영향

이혁종

Cornell University

Abstract

Lee, Hyuek-Jong. The effect of 12 weeks high fat diet treatment on adipose tissue blood vessel content, *Exercise Science*, 22(2) : 173-181, 2013. Adipose tissue specific ablation of VEGF induces less vasculature in mouse epididymal fat(Epi. fat) and deteriorates inflammation and insulin resistance under high fat diet condition. But it has not been evaluated whether obesity itself directly regulates blood vessel content in adipose tissue yet. The purposes of this study are to identify blood vessel content between lean and obese Epi. fat and to provide a justification for the study about exercise training effect on fat vasculature in the future. For the analysis of vascular pattern in adipose tissue, Epi. fats of 1 day, 2 weeks, 3 weeks and 4 weeks of age were observed under confocal microscope after staining with PECAM-1. With near infrared fluorescence conjugated lectin and VE-cadherin antibody, blood vessel content was evaluated in Epi fat from the mice fed low (control) or high fat (obesity) diet for 12 weeks. Also mRNA expression of VEGF and angiopoietin were analyzed. At the postnatal one day, the filopodia, which indicated angiogenic process, was found in Epi. fat and strong angiogenic process was going on up to 3 weeks of age. Then the vessels had uniformed size and structure at 4 weeks of age. The lectin fluorescence concentration was significantly decreased in obese Epi. fat ($p<.05$). Also VE-cadherin protein expression was significantly less in obese Epi. fat ($p<.01$). In parallel with less blood vessel content, VEGF mRNA expression in obese Epi. fat was significantly down-regulated ($p<.01$), but angiopoietin was up-regulated ($p<.001$). Correctively, these findings suggest that the obese Epi. fat has less blood vessel content by down regulation of VEGF mRNA. These results will be useful information for interrogating the effect of exercise on obese fat blood vessel content in the future.

Key words : Obesity, High fat diet, Vasculature content, Epididymal fat, VE-cadherin

초 록

이혁종. 12주간의 고지방 식이가 지방내 혈관 함량에 미치는 영향. 운동과학, 제22권 제2호, 173-181, 2013. 지방내 혈관을 감소시킨 마우스는 비만 환자의 지방에서 흔히 관찰되는 허혈(ischemia)의 증가, 대식세포의 유입 증가, 지방내 염증성 싸이토카인의 발현 및 인슐린 저항성의 증가를 동반하는 것으로 알려져 있다. 그러나 비만이 지방내 혈관 함량에 직접적인 영향을 미치는지에 대한 연구결과는 보고된 바가 없다. 이에 본 연구는 저지방 또는 고지방 식이를 섭취한 마우스의 지방내 혈관 함량을 비교하고, 지구성 운동이 비만군의 지방내 혈관 함량을 조절하는지에 대한 연구의 타당성 검증을 위한 기초자료를 제공하기 위하여 수행되었다. 지방의 성장이 혈관 형성을 동반하는지 확인하기 위해 생후 1일, 2주일, 3주일 그리고 4주일된 마우스의 지방 전체의 혈관을 염색하여 분석하였다. 12주간의 저지방 식이(통제군) 또는 고지방 식이(비만군)를 섭취한 마우스를 대상으로 지방내 혈관의 함량을 알아보기 위해, 혈관에 특이적으로 부착하는 lectin에 형광물질을 결합시켜 혈관 주입한 후 형광물질의 농도를 분석하였고, 재확인을 위해 혈관에서 특이적으로 발현하는 단백질 중 하나인 VE-cadherin의 발현량을 비교하였다. 지방내 혈관의 신생은 생후 1일부터 활발히 진행되어 생후 4주에는 모든 혈관이 일정한 굵기를 가지고 지방 전체에 분포됨을 확인하였다. 12 주간의 식이 처치 후 통제군과 비만군에서 혈관의 형태적 차이는 발견하지 못했으나, 비만군의 지방내의 주입된 lectin의 농도가 유의하게 감소하였으며($p<.05$), VE-cadherin의 발현량 역시 유의하게 감소하였다($p<.01$). 비만군의 지방내 혈관 함량감소의 기전을 밝히기 위해 혈관 신생에 관여하는 유전자인 VEGF와 angiopoietin의 mRNA의 발현을 비교한 결과, VEGF의 mRNA 발현량은 약 61 % 감소하였으나($p<.01$), angiopoietin의 mRNA 발현량은 약 70 % 증가하였다($p<.001$). 이와 같은 결과는 비만이 지방내 혈관의 함량을 감소시킨다는 것을 의미하며, 이는 VEGF의 mRNA 발현량의 감소에 의해 기인한 것으로 사료된다. 이 결과는 향후 지구성 운동과 지방내 혈관의 함량관계를 연구하기 위한 기초자료로서 중요한 의미를 갖는다.

주요어 : 비만, 고지방 식이, 혈관, 부고환 지방, VE-cadherin

I. 서론

지구성 운동은 인간 및 실험동물에서 근육의 모세혈관을 증가시키고 심장의 주요 동맥 크기를 증대시킨다(Hudlica et al., 1996; White et al., 1998). 또한 지구성 운동은 경동맥 내 중막 두께의 감소, 수축기 혈압의 감소 및 평균 동맥압의 저하 등을 가져와 혈관 질환의 치료적 효과 및 기능적 향상성을 증가시킨다(제세영 등, 2011; 제세영 등, 2010; 남상남 등, 2010).

혈관의 증가는 기존의 혈관에서 새로운 혈관이 생겨나는 혈관신생(血管新生, angiogenesis)의 과정을 통해 이루어지며 혈관신생에 관여하는 대표적인 단백질은 VEGF(vascular endothelial cell growth factor)와 Ang1(angiopoietin-1)으로 알려져 있다(Saaristo et al., 2000). 특히 VEGF 및 그 수용체의 유전자는 장기간의 운동 또는 일회성 중등도의 운동을 통해 인간 및 쥐의 근육에서 그 발현이 증가된다(Gavin et al., 2008; Annex et al., 1998). 따라서 운동에 의한 근육내 혈관의 증가는 VEGF 발현에 의한 결과로 인식되고 있다.

한편, 비만환자에 있어 운동의 중요한 기능은 체중 감소를 야기하는 것이다(김종식 등, 2011; 이신희 등, 2012). 체중의 감소는 체지방량의 감소를 동반하며 지방의 크기와 반비례한다. 지방은 지방세포들로부터 구성된 단순한 조직이 아니라 지방세포, 혈관내피세포 그리고 면역세포 등을 포함한다(Wisse, 2004). 비만환자의 지방에서, 혈관의 역할은 림프구와 대식세포를 지방내로 유입하는 통로로써 지방조직의 염증을 유발하는데 기여한다는 사실 외에는 알려진 바가 거의 없었다(Ferri et al., 1999). 그러나 최근 지방세포에서 VEGF의 발현을 증대시켜 지방내 혈관의 수를 증가시킨 마우스는 고지방 식이 섭취 후에도 통제군에 비해 비만 및 인슐린 저항성이 감소하며, 반대로 지방세포에서 VEGF의 발현을 감소시킨 쥐는 지방내 혈관 수를 감소시킴으로써 고지방 식이 섭취시 인슐린 저항성을 증가시킨다는 혈관의 새로운 역할이 밝혀졌다(Sung et al., 2013; Elias et al., 2012). 이처럼 지방세포에서 VEGF의 발현을 감소시켜 혈관의 수를 감소시킨 쥐에서 발생한 지방내 염증증가를 동반한 인슐린 저항성의 증가는 일반적으로 비만환자의 지방에서도 동일하게 관찰된다(Dandona et al., 2004; Ouchi et al., 2011). 이는 비만환자의 지방은 정상체중을 가진 사람의 지방보다 혈관의 함량이 적을 수 있다는 가능성을 제시하는 결과이다. 이와 같은 가능성은 비만 마우스의 지방내 허혈(hypoxia)이 증

가하며 이러한 허혈은 지방세포로부터 염증성 사이토카인의 분비를 증가시킨다는 선행연구로(Hosogai et al., 2007; Wang et al., 2007)부터도 유추가 가능하다. 또한, 비만 환자의 지방내 혈관함량이 정상인에 비하여 적다면, 지방세포에서 VEGF의 발현을 증대시켜 지방내 혈관의 수를 증가시킨 마우스에서 인슐린 민감도가 증가한 것과 같이 비만환자에 있어도 지방내 혈관의 증가를 유도하여 혈관의 수를 증가시키는 것이 비만 및 제 2형 당뇨병의 예방 및 치료에 유용한 방법으로 사용될 수 있음을 시사한다.

지구성 운동은 비만환자 및 마우스 모델에서 지방의 만성적 염증의 발현을 감소시키고, 인슐린 민감도를 증가시키는 것으로 알려져 있으며(Bruun et al., 2006; Vieira et al., 2009), 또한 지구성 운동은 운동에 직접적으로 관여하는 근육 및 심장 뿐만 아니라 운동에 직접적으로 관여하지 않는 뇌와 같은 장기에서도 혈관의 수를 증가시킨다(Zhang et al., 2013). 따라서 지구성 운동이 근육내 모세혈관의 수를 증가시키는 것과 같이 비만군의 지방내 혈관 수를 증가시켜 인슐린 민감도 및 염증 발현을 조절한다면, 이는 비만 및 제 2형 당뇨병에 있어 지구성 운동의 예방적 그리고 치료적 효과를 설명할 수 있는 새로운 기전을 제시할 수 있다는 점에서 운동생리학적으로 중요한 의미를 가진다. 이와 같은 관점에서, 지구성 운동이 비만군의 지방내 혈관함량을 증가시켜 염증 발현 및 인슐린 저항성에 영향을 주는 지를 알아보기 위해서는 비만군의 지방내 혈관함량이 정상군에 비해 감소한다는 가설에 대한 입증의 선행되어야만 한다. 이는 비만군의 지방내 혈관함량이 정상군과 차이가 없다면 혈관의 양과 비만군의 지방에서 발생하는 염증 발현을 비롯한 병리학적 현상들 사이에는 상관성을 없음을 의미하기 때문이다.

그러나 비만군의 지방내 혈관함량을 정상군의 지방과 비교한 연구는 전무하며 또한 운동이 지방내 혈관의 변화에 기여한다는 연구결과 역시 국내·외에서 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구는 지구성 운동이 비만군의 지방내 혈관 함량에 미치는 영향을 규명하기에 앞서, 비만군의 지방은 통제군의 지방보다 혈관의 함량이 적을 수 있다는 가설을 증명하기 위하여 고지방 식이를 섭취한 마우스의 지방내 혈관의 함량을 저지방 식이를 섭취한 통제군 마우스의 지방과 비교하고, 향후 본 연구결과를 바탕으로 지구성 운동이 비만군의 지방내 혈관 수를 증가시킬 수 있는지에 대한 연구의 타당성을 검증하기 위한 기초자료를 제공하는데 그 목적이 있다.

II. 연구 방법

1. 연구 대상

본 연구는 수컷 C57BL/6J 마우스를 대상으로 실시하였다. 부고환(epididymal) 지방 조직(이하 지방으로 명명)내 혈관의 유·무 및 혈관 신생을 관찰하기 위해 생후 1일, 2주일, 3주일 그리고 4주일 마우스를 대상으로 하였다(N=5). 지방 내 혈관 함량을 비교하기 위하여 4주령 마우스 32마리를 두 개의 집단(통제군과 비만군)에 각각 16마리씩 무선 할당하여 6주령부터 통제군은 저지방 식이(10 % fat diet; D12492i, Research Diets)를 그리고 비만군은 고지방 식이(60 % fat diet; D12492i, Research Diets)를 12주 동안 섭취 시켰다. 각 집단의 8마리는(통제군 N=8, 비만군 N=8) 형광물질 정량에 사용되었고 나머지 각 집단의 8마리는(통제군 N=8, 비만군 N=8) 단백질 및 mRAN 분석에 사용되었다. 본 실험이 진행되는 동안 모든 마우스는 일정한 온도 및 습도가 유지되며 12시간 간격으로 명암이 조절되는 Weill Cornell Medical College의 동물실에서 사육되었으며 물과 사료는 제한 없이 충분히 주었다.

2. 분석 방법

1) 혈중 글루코스 및 인슐린 측정

저지방 및 고지방 식이 처치 12주후, 체중의 차이를 알아보기 위해 마우스의 체중을 저울을 이용해 측정하였고, 혈중 인슐린 및 글루코스의 농도를 알아보기 위해 6시간 금식 후 혈관으로부터 5 μ L의 혈액을 채취하여 글루코미터(Contour, Bayer, NY)로 혈중 글루코스를 측정하였다. 금식 후 혈중 인슐린은 마우스의 꼬리에서 25 μ L의 혈액을 채취한 후 serum separator tube(BD bioscience, California)를 이용해 원심 분리하고(1000 rpm, 1분, 4 $^{\circ}$ C), 분리된 혈청의 5 μ L을 사용하여 ELISA kit(Ultra sensitive mouse insulin ELISA kit, Crystal CHEM INC., IL)로 측정하였다.

2) 형광 염색

모든 마우스는 CO₂ 가스를 이용해 희생시켰으며 혈관의 이미지를 촬영하기 위해 모든 지방은 채취 후 4 %의 formalin 으로 12시간 동안 4 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 이후 5 %의 염소 혈청으로 1시간 동안 실온에서 차단하고 지방내 혈관의 형태를 관찰하기 위해 혈관 및 일부 혈구 세포에서 특이적으로

발현하는 anti-PECAM-1 antibody(Chemicon International, Temecula, California) 또는 지방 세포에서 특이적으로 발현되는 anti-perilipin antibody(Fitzgerald, MA) 항체와 함께 12시간 동안 4 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 이후 인산염완충식염수(PBS)로 세척 후 FITC-conjugated anti-hamster IgG antibody 또는 cy3-conjugated anti-guinea pig IgG antibody(Jackson Immuno-Research Laboratories, West Grove, PA)와 함께 4시간 동안 상온에서 배양하였다. 혈관의 형태적 분석을 위한 이미지는 Fluoview FV10i confocal microscope(Olympus, Center Valley, PA)를 이용하여 촬영하였다.

3) 형광물질의 측정

지방내 혈관의 함량을 알아보기 위해 near infrared 형광물질을 결합시킨 griffonia simplicifolia lectin(15 μ g/kg; Vector Laboratories, Inc, Burlingame, Calif)을 혈관 주사하였고, 20 분 후 PBS를 이용하여 혈액에 남아있는 lectin을 제거하기 위해 5 분간 관류(perfusion) 시켰다. 이후 지방내 혈관에 부착된 형광물질을 분리하기 위하여 좌측 지방 전체를 채취한 후 동일한 양(300 μ L)의 라이시스 버퍼 (1 % Nondiet P-40, 50 mM NaCl, 0.1 % SDS, 50 mM HEPES pH 7.9, 1 mM EDTA, 100 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 100 mM glycerophosphate, 1 g/ml aprotinin, 2.5 g/ml leupeptin, and 0.7 g/ml pepstatin)를 이용하여 지방 전체를 완전히 분쇄하고, 형광물질의 완전 분리를 위해 분쇄된 용액을 nitro nitrogen을 이용하여 5회 동결 및 해동 하였다. 이후 모든 샘플을 원심 분리한(13,000 rpm, 15분, 4 $^{\circ}$ C)후 상층액의 형광 물질의 양을 fluorescence spectrometer로 측정하였다. 지방 채취의 모든 과정은 형광물질의 보전을 위해 암실에서 시행하였다.

4) 면역 블롯팅 (Immunoblotting)

혈관에서 특이적으로 발현하는 VE-cadherin 및 β -actin 단백질량을 지방에서 측정하기 위하여 좌측 지방 전체를 라이시스 버퍼를 이용하여 분쇄한 후 얼음에서 20분간 배양하였다. 그 후 원심분리기를 이용해 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하고 잔해를 제거한 후 Bradford법(Bradford, 1976)을 이용하여 단백질 정량을 시행하였다. 모든 샘플(30 μ g)은 단백질 변성(denature)을 위해 100 $^{\circ}$ C에서 5분간 끓인 후 SDS 겔을 이용하여 단백질 분리를 시행하였다. 이후 nitrocellulose 흡착지로 옮기고 5 % non-fat milk와 3 % albumin, bovine으로 차단하였다. 차단 후 흡착지를 12시간 동안 VE-cadherin(1 :

1000, Santa Cruz, CA) 또는 β -actin(1 : 5000, Sigma, MO) 항체와 함께 4 °C에서 배양하였다. TBST 완충제로 10분간 3회 세척하고 horseradish peroxidase가 결합된 anti-goat 항체(1 : 1000, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)와 anti-mouse 항체(1 : 4000, Amersham, Buckinghamshire, England)로 각각 2시간 동안 상온에서 배양하였다. 모든 결과는 densitometric scanning(Chemidoc MP, Biolad)으로 분석하였다.

5) RNA 발현 측정

지방의 mRNA를 측정하기 위하여 미세저울을 이용해 50 mg의 우측 지방을 정량하고 500 μ L의 TRIzol Reagent (Invitrogen, NY)를 이용하여 분쇄하였다. 분쇄된 샘플은 원심분리후(1300 rpm, 10분, 4 °C), 상층액으로부터 RNeasy Mini columns (Qiagen, MD)을 이용해 Qiagen에서 제공한 분리 방법에 따라 mRNA를 분리하였다. mRNA의 분리 후 cDNA 합성 kit(Clontech, CA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. VEGF

와 Ang1의 mRNA 발현량을 측정하기 위해 VEGF primer (forward : GCCAGCACATAGAGAGAGTGGC, reverse : CTGCCGATCTTGGACAAACA)와 Ang1 primer (forward : CCATGCTTGAGATAGGAACCAG, reverse : TTCAAGTCGGGATGTTTGATTT)를 이용하여 real time PCR(Applied biosystems, NY)을 시행하였다. 결과의 정량은 18s tachman probe(Applied biosystems, NY)를 이용하였다.

3. 자료 분석

모든 변인은 평균과 표준편차 (mean $\pm$ SD)로 표기하였다. 본 연구에서는 통제군과 비만군의 모든 변인에 대한 통계적 유의성은 유의수준 .05에서 paired T-test를 이용한 통계분석을 실시하여 구하였다.

III. 연구 결과

1. 연령에 따른 지방 혈관의 형태적 변화

지방에서의 혈관의 유무 및 연령에 따른 혈관 전체의 발달과정을 형태학적으로 확인하기 위하여 생후 1일, 1주일, 2주일 그리고 4주일이 된 마우스의 지방을 채취하여 혈관에서 특이적으로 발현하는 PECAM-1 항체로 염색하였다. (Fig. 1)의 A에서처럼 생후 1일된 지방의 혈관은 이미 지방 전체에 걸쳐 분포하고 있으며 그 굵기가 다른 비교 연령의 지방 혈관보다 굵았으며 초기 혈관 신생시 발견되는 것으로 알려진 축수(filopodia)를 관찰할 수 있었다(화살표). 그러나 생후 2주일된 생쥐의 지방 혈관은 굵은 혈관에서 파생된 가는 혈관의 수가 급격히 증가하며 이와 같은 현상은 생후 3주일까지 지속적으로 관찰되었다(Fig. 1B, 1C). 생후 4주째 지방의 혈관은 지방세포와의 조화를 이루며 그 굵기가 일정해지는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 1D). 이러한 형태학적 변화는 각 주령 당 5마리씩 관찰하였으며 혈관의 형태는 각 연령대에서 동일하였다.

2. Lectin을 이용한 지방내 혈관 함량 측정

저지방 및 고지방 식이 처치 12주후, 통제군과 비만군의 체중, 혈중 인슐린 및 혈중 글루코스 농도는 통제군에 비해

Fig. 1. Vascular structure in Epi. fat.

A. Postnatal 1 day. B. 2 weeks of age. C. 3 weeks of age. D. 4 weeks of age. E. 18 weeks old control mouse. F. 18 weeks old obese mouse. PECAM-1 (green), Perilipin (red), 10X image

Table 1. Body weight, fasting glucose and insulin

	Control	Obesity	p value
Body Weight (g)	26.91±1.27	40.30±2.29	<i>p</i> <.001
Fasting glucose (mg/dL)	82.36±13.77	124.86±27.65	<i>p</i> <.001
Fasting insulin (ng/mL)	0.92±0.11	2.89±0.93	<i>p</i> <.001

mean±SD, N=16 in each group

유의하게 증가하였다(Table 1). 통제군과 비만군의 지방에서의 혈관의 형태는 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 1E, 1F). 통제군 및 비만군 지방에서의 혈관의 함량을 비교하기 위해 혈관내벽에 부착되는 것으로 알려진 lectin에 near infrared 형광물질을 결합시켜 혈관주사로 투여하고(Inai et al., 2004), 20 분후 지방내 혈관에 부착된 형광물질의 농도를 fluorescence meter로 정량하였다(Fig. 2A). 형광물질의 양은 통제군에 비하여 비만군의 혈관에서의 적게 검출되었으며(826.23±85.46 vs 611.72±72.71, *p*<0.05) 이는 혈관의 함량이 비만군의 지방에서 적다는 것을 의미한다(Fig. 2B).

3. VE-cadherin 단백질의 발현

Fig. 2. Lectin fluorescence content in Epi. fat.

A. Fluorescence concentration measurement from Epi. fat between control and obese groups.
B. Values are Mean±SD of 8 mice in each group.
*, *p*<.05 vs control.

형광물질을 이용한 혈관의 함량을 측정하였으나, 형광물질의 바인딩 효율의 차이가 두 집단에서 발생할 수 있는 가능성을 배제할 수 없고 혈관에서 특이적으로 발현되는 단백질을 측정하지 않으면 혈관의 함량 차이를 직접적으로 증명할 수 없으므로, 혈관에서 특이적으로 발현하는 VE-cadherin 단백질을 이용하여 면역 블롯팅을 시행하였다. Fluorescence meter의 결과와 동일하게 비만군 지방에서의 VE-cadherin 단백질의 발현량이 통제군에 비해 현저하게 감소하였음을 관찰하였다(1.84±0.73 vs 0.55±0.31, *p*<0.01)(Fig. 3).

4. VEGF 및 Ang1의 mRNA 발현

혈관의 신생 및 안정화에 관여하는 대표적인 단백질로는 VEGF와 Ang1이 알려져 있다. 비만군 지방의 혈관 함량이 통제군에 비해 적은 것이 혈관 신생에 관여하는 유전자의 발현 감소에 따른 것인지를 알아보기 위해 VEGF와 Ang1의 mRNA 발현량을 real time PCR로 분석하였다. 통제군에 비해 비만군의 지방에서 VEGF의 mRNA 발현량은 약 61 % 감소하였으나(1.14±0.14 vs 0.44±0.37, *p*<0.01)(Fig. 4A), Ang1의

Fig. 3. VE-cadherin expression in Epi. fat.

A. VE-cadherin protein expression from immunoblotting assay.
B. Values are Mean±SD of 8 mice in each group.
*, *p*<.05 vs control.

Fig. 4 mRNA expression of VEGF and ANG1.

A, mVEGF expression in Epi. fat between groups.
B, mANG1 expression in Epi. fat between groups. Values are Mean±SD of 8 mice in each group.
#, $p < 0.01$ vs control.

mRNA 발현량은 70 % 증가하였다(1.04 ± 0.213 vs 1.78 ± 0.30 , $p < 0.01$) (Fig. 4B).

IV. 논의

본 연구는 지방에서 혈관의 형성과정을 알아보고 고지방 식이가 지방의 혈관 함량의 변화를 가져오는지를 알아보기 위해 시행되었다. (Fig. 1)에서 나타나듯이 생후 1일된 마우스의 지방에서는 초기 혈관 형성시 나타나는 축수가 관찰되었고, 생후 2주 및 3주에 걸쳐 기존에 존재하던 혈관에서부터 파생된 많은 모세혈관들이 자라나는 것을 관찰할 수 있었다. 배아(embryo) 시기의 혈관 형성(vasculogenesis)은 원시적(primitive) 수준의 혈관 튜브(tube)로부터 보다 복잡한 혈관 구조로 진화되며 이때 신생 혈관들은 기존혈관으로부터 축수를 형성하여 자라나기 시작한다(Wilting & Christ, 2007). 생후 1일된 마우스의 지방에서는 흥미롭게도 혈관 신생시 나타나는 축수가 발견되었으며 이는 이미 배아 시기에 지방 내에서도 활발한 혈관 형성 및 혈관 신생이 나타난다

는 것을 의미하는 것이며, 지방의 혈관 또한 혈관 신생 과정을 통해 연령에 따라 증가함을 의미하는 결과이다. 혈관 형성 및 혈관 신생 과정은 모두 VEGF와 Ang1 등에 의해 조절된다. VEGF는 세 개의 수용체(VEGFR1, VEGFR2 그리고 VEGFR3)를 통하여 혈관내피세포의 증식을 유도하고 혈관의 수를 증가시키며, Ang1은 두 개의 수용체(Tie-1 그리고 Tie-2) 중 Tie-2 수용체를 통하여 혈관내피세포의 증식을 동반한 혈관신생, 혈관의 안정성 및 혈관의 항상성에 기여한다(Saaristo et al., 2000). VEGF 유전자를 제거한 마우스는 심장 혈관 신생과정에 문제가 생겨 배아 단계에서 치사(lethal)한다. VEGF는 혈관 신생에만 관여하는 것이 아니라 혈관내피세포의 증식 및 생존에 기여하며 혈관내피세포의 세포사멸을 억제하는 단백질을 발현시키는 역할을 한다(Jussila & Alitalo, 2002). 지방 세포에서 VEGF의 발현을 억제한 마우스의 지방은 혈관의 수가 현저히 감소하며, 혈관의 감소는 지방내에 저산소증(ischemia)을 유발하여 정상 식이에서조차도 지방내 염증성 사이토카인인 TNF- α (tumor necrosis factors- α)의 발현을 증가시키며 아디포넥틴의 발현을 감소시킨다. 반면 고지방 식이하에서 이 마우스는 체중의 증가가 감소되어 지방의 크기는 작아지나, 지방세포의 괴사 증가에 따른 대식세포의 지방내 유입이 증가하고 지방내 염증성 사이토카인의 발현이 증가하여 결과적으로는 인슐린 저항성을 가져온다(Sung et al., 2003). 대식세포의 증대, 염증성 사이토카인의 증가, 허혈의 증가, 지방세포의 괴사 및 인슐린 저항성의 발생은 비만 환자의 지방에서 공통적으로 일어나는 현상이다(Dandona et al., 2004; Ouchi et al., 2011). 따라서 이러한 현상의 발생 기전의 일부는 비만한 지방내 혈관의 수가 감소하기 때문이라는 가설을 내릴 수 있었고 본 연구의 실험결과를 통해 고지방 식이를 섭취한 마우스의 지방은 통제군의 지방에 비해 혈관의 형태에는 큰 차이를 보이지 않았으나 혈관의 함량이 유의하게 적어졌음을 증명하였다(Fig. 2), (Fig 3). 비만군의 지방내 혈관 함량의 감소의 기전을 알아보기 위해 본 연구에서는 VEGF와 Ang1의 mRNA 발현량을 조사하였다. 흥미롭게도 비만군의 지방에서 통제군에 비해 VEGF의 mRNA 발현이 현저하게 감소하는 것을 관찰하였다(Fig. 4A). 따라서 혈관 신생에 중요한 역할을 하는 VEGF mRNA 발현량의 감소가 비만군의 지방의 혈관 신생을 억제하는 기전으로 사료된다. 그러나 혈관 신생에 관여하는 또 다른 단백질인 Ang1의 mRNA 발현량은 비만군의 지방에서 증가하였다(Fig 4B). Ang1은 혈관 신생에 관여하기도 하지만 혈관의 염증 반응을 감소시키고 혈관의 안정성

을 유지하며 염증 및 VEGF에 의해 유발되는 혈관의 누수(leakage)를 감소시키는 역할을 한다(Thurston et al., 1999; Thurston et al., 2000; Zhang et al., 2002; Nambu et al., 2004). 따라서 비만군의 지방에서 Ang1의 증가는 혈관 수의 증가에 관여한다기 보다는 첫째, VEGF 감소에 의한 혈관 함량 감소를 방지하기 위한 보상적 메커니즘으로 증가하였거나, 둘째, 비만지방에서 발생하는 염증성 반응을 감소시키기 위한 자가 방어(self defence)적 수단의 결과이거나, 셋째, 혈관의 안정성을 유지하기 위해 증가한 것으로 사료된다.

지구성 운동은 근육 및 혈청내 VEGF의 농도를 증가시킨다(Czarkowska-Paczek et al., 2006; Arany et al., 2008). 지구성 운동을 통한 근육내 VEGF의 증가는 $ERR\alpha$ (estrogen-related receptor- α)를 통한 PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α)에 의해 조절되며(Arany et al., 2008), PGC-1 α 는 지구성 운동에 의해 근육내에 그 발현이 유의하게 증가한다(Baar et al., 2002). 한편, 비만군의 지방에서는 체중 증가에 비례하여 PGC-1 α 의 발현이 정상군의 지방에서 보다 감소된다(Sutherland et al., 2008).

혈관의 형성 및 증가를 조절하는 또 다른 기전은 혈관내 혈류량(blood flow) 및 속도에 의해 결정되는 혈류자극(shear stress)이다. 혈류자극은 특히 VEGF 및 angiopoietin의 수용체를 자극하여 라이간드(ligand)의 결합 없이도 수용체의 자발적 인산화(auto-phosphorylation)를 유도하여 혈관내피세포의 증식 및 안정화에 기여한다(Lee & Koh, 2003). 특히 비만군의 지방은 정상군에 비하여 지방내 혈류량이 유의하게 감소한다(Summers et al., 1996). 그러나 엘리트 선수들의 지방내 혈류량은 비운동군에 비하여 유의하게 증가되어 있으며, 또한 16주의 지구성 트레이닝은 젊은 비만군의 지방내 혈류량을 유의하게 증가시킨다(Stallknecht et al., 2000; Moro et al., 2005). 이처럼 비만군의 지방은 정상군의 지방에 비해 혈관형성에 기여하는 다양한 인자들이 결여되어 있다. 그러나 혈관형성에 기여하는 장기간의 지구성 운동이 근육 및 심장에서 혈관 신생을 유도하듯이 정상군에 비해 감소된 비만군의 지방내 혈관 함량을 증가시킴으로써 염증 발현을 감소시키고 인슐린 민감도를 증가시키는지에 대해서는 보고되지 않았다. 따라서 본 연구의 결과를 바탕으로 장기간의 지구성 운동이 첫째, 비만군의 지방내의 PGC-1 α 의 발현을 증가시켜 직접적으로 지방내 VEGF를 증가시켜 혈관형성을 유도하는지, 둘째, 지방내 혈류 증가를 통해 지방내 혈관형성에 관여하는 라이간드 수용체를 활성화 시킴으로써 혈관의 양을 증가시킬 수 있는지, 셋째, 근육에서 발현된 VEGF를 혈

청내로 유입시켜 간접적으로 지방의 혈관 함량에 영향을 미칠 수 있는지 등에 대해서는 추후 연구를 통해 규명되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구는 지방에서 혈관의 형성과정을 알아보고 고지방 식이가 지방의 혈관 함량의 변화를 가져오는지를 알아보기 위해 시행되었으며 그 결과는 다음과 같다. 지방내 혈관은 생후 1일부터 3주까지 활발한 혈관신생의 과정을 거쳐 4주령에서는 지방과의 조화를 이루며 일정한 굵기의 안정화된 혈관을 형성한다. 12주간 고지방 식이를 섭취한 비만군의 지방내 혈관은 통제군의 지방의 혈관과 형태학적으로 차이를 보이지 않았으나, 비만군의 지방내 혈관은 통제군의 지방에 비하여 외부에서 주입한 lectin의 바인딩 양이 유의하게 감소하였고 혈관에서 발현되는 VE-cadherin의 단백질 양 역시 감소하였다. 또한 비만군의 지방에서의 VEGF mRNA 발현량이 통제군의 지방보다 유의하게 감소하였으며 반면 Ang1의 mRNA 발현량은 현저히 증가하였다. 이상의 결과는 고지방 식이는 지방내 혈관의 함량을 감소시키며 이는 VEGF의 mRNA 발현량 감소에 의해 야기된다고 사료된다. 이 연구 결과는 지구성 운동이 비만군의 지방내 혈관함량의 감소를 억제 또는 혈관함량을 증가시킴으로써, 비만 및 제 2형 당뇨의 예방 및 치료적 목적을 가질 수 있는지에 대한 추후 연구의 기초자료를 제시한다는 점에서 그 의의가 있다.

참고문헌

- 김종식, 조현철, 강희성(2011). 12주간 복합운동이 비만 청소년의 지방세포에 미치는 영향. *운동과학*, 20(3) : 329-338.
- 남상남, 김상엽, 안정훈(2010). 장거리 육상 훈련이 심혈관 기능에 미치는 효과. *운동과학*, 19(1) : 59-68.
- 이신호, 진영윤, 강현식(2012). 복합운동 트레이닝에 따른 체중 감량이 중년여성의 혈관 신생 인자에 미치는 영향. *운동과학*, 21(1) : 79-88.
- 제세영, 윤은선, 정수진(2010). 운동 프로그램 참여가 비만

- 청소년의 혈관 구조 및 기능에 미치는 영향. *운동과학*, 19(2) : 165-174.
- 제세영, 정수진, 윤은선, 손태열(2011). 레크리에이션형 댄스 운동이 노인여성의 혈관 구조와 기능에 미치는 영향. *운동과학*, 20(1) : 35-46.
- Annex, B. H., Torgan, C. E., Lin, P., Taylor, D. A., Thompson, M. A., Peters, K. G., & Kraus, W. E. (1998). Induction and maintenance of increased VEGF protein by chronic motor nerve stimulation in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, 274 : H860-867.
- Arany, Z., Foo, S. Y., Ma, Y., Ruas, J. L., Bommi-Reddy, A., Girmun, G., Cooper, M., Laznik, D., Chinsomboon, J., Rangwala, S. M., Baek, K. H., Rosenzweig, A., & Spiegelman, B. M. (2008). HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1 α . *Nature*, 451 : 1008-1012.
- 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.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytic Biochemistry*, 7(72) : 248-254
- Bruun, J. M., Helge, J. W., Richelsen, B., & Stallknecht, B. (2006). Diet and exercise reduce low-grade inflammation and macrophage infiltration in adipose tissue but not in skeletal muscle in severely obese subjects. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 290(5) : E961-E967.
- Czarkowska-Paczek, B., Bartlomiejczyk, I., & Przybylski, J. (2006). The serum levels of growth factors : PDGF, TGF- β and VEGF are increased after strenuous physical exercise. *J. Physiol. Pharmacol.*, 57(2) : 189-197.
- Dandona, P., Aljada, A., & Bandyopadhyay, A. (2004). Inflammation : the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends in Immunology*, 25 : 4-7.
- Elias, I., Franckhauser, S., Ferré, T., Vilà, L., Tafuro, S., Muñoz, S., Roca, C., Ramos, D., Pujol, A., Riu, E., Ruberte, J., & Bosch, F. (2012). Adipose tissue overexpression of vascular endothelial growth factor protects against diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 61 : 1801-1813.
- Ferri, C., Desideri, G., Valenti, M., Bellini, C., Pasin, M., Santucci, A., & De Mattia, G. (1999). Early upregulation of endothelial adhesion molecules in obese hypertensive men. *Hypertension*, 34 : 568-573.
- Gavin, T. P., Robinson, C. B., Yeager, R. C., England, J. A., Nifong, L. W., & Hickner, R. C. (2003). Angiogenic growth factor response to acute systemic exercise in human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, 96 : 19-24.
- Hosogai, N., Fukuhara, A., Oshima, K., Miyata, Y., Tanaka, S., Segawa, K., Furukawa, S., Tochino, Y., Komuro, R., Matsuda, M., & Shimomura, I. (2007). Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*, 56(4) : 901-911.
- Hudlicka, O., Brown, M., & Egginton, S. (1992). Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiol. Rev.*, 72 : 369-417.
- Inai, T., Mancuso, M., Hashizume, H., Baffert, F., Haskell, A., Baluk, P., Hu-Lowe, D. D., Shalinsky, D. R., Thurston, G., Yancopoulos, G. D., & McDonald, D. M. (2004). Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. *Am. J. Pathol.*, 165(1) : 35-52.
- Lee, H. J., & Koh, G. Y. (2003). Shear stress activates Tie2 receptor tyrosine kinase in human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 304(2) : 399-404.
- Moro, C., Pillard, F., De Glisezinski, I., Harant, I., Rivièrè, D., Stich, V., Lafontan, M., Crampes, F., & Berlan, M. (2005). Training enhances ANP lipid-mobilizing action in adipose tissue of overweight men. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 37(7) : 1126-1132.
- Nambu, H., Nambu, R., Oshima, Y., Hackett, S. F., Okoye, G., Wiegand, S., Yancopoulos, G., Zack, D. J., & Campochiaro, P. A. (2004). Angiopoietin 1 inhibits ocular neovascularization and breakdown of the blood-retinal barrier. *Gene Ther.*, 11 : 865-873.
- Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., & Walsh, K. (2011).

- Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 11(2) : 85-97.
- Saaristo, A., Karpanen, T., & Alitalo, K. (2000). Mechanisms of angiogenesis and their use in the inhibition of tumor growth and metastasis. *Oncogene*, 19 : 6122-6129.
- Stallknecht, B., Larsen, J. J., Mikines, K. J., Simonsen, L., Bülow, J., & Galbo, H. (2000). Effect of training on insulin sensitivity of glucose uptake and lipolysis in human adipose tissue. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 279(2) : E376-E385.
- Summers, L. K., Samra, J. S., Humphreys, S. M., Morris, R. J., & Frayn, K. N. (1996). Subcutaneous abdominal adipose tissue blood flow : variation within and between subjects and relationship to obesity. *Clin. Sci (Lond)*, 91(6) : 679-683.
- Sung, H. K., Doh, K. O., Son, J. E., Park, J. G., Bae, Y., Choi, S., Nelson, S. M., Cowling, R., Nagy, K., Michael, I. P., Koh, G. Y., Adamson, S. L., Pawson, T., & Nagy, A. (2013). Adipose vascular endothelial growth factor regulates metabolic homeostasis through angiogenesis. *Cell Metab.*, 17 : 61-72.
- Sutherland, L. N., Capozzi, L. C., Turchinsky, N. J., Bell, R. C., & Wright, D. C. (2008). Time course of high-fat diet-induced reductions in adipose tissue mitochondrial proteins : potential mechanisms and the relationship to glucose intolerance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 295(5) : E1076-1083.
- Thurston, G., Rudge, J. S., Ioffe, E., Zhou, H., Ross, L., Croll, S. D., Glazer, N., Holash, J., McDonald, D. M., & Yancopoulos, G. D. (2000). Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat. Med.*, 6 : 460-463.
- Thurston, G., Suri, C., Smith, K., McClain, J., Sato, T. N., Yancopoulos, G. D., & McDonald, D. M. (1999). Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science*, 286 : 2511-2514.
- Vieira, V. J., Valentine, R. J., Wilund, K. R., Antao, N., Baynard, T., & Woods, J. A. (2009). Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications in obese mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 296(5) : E1164-E1171.
- Wang, B., Wood, I. S., & Trayhurn, P. (2007). Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes. *Pflugers Arch.*, 455(3) : 479-492.
- White, F. C., Bloor, C. M., & McKimman, M. D. (1998). Exercise training in swine promotes growth of arteriolar bed and capillary angiogenesis in heart. *J. Appl. Physiol.*, 85 : 1160-1168.
- Wisse, B. E. (2004). The inflammatory syndrome : the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 15 : 2792-2800.
- Zhang, P., Yu, H., Zhou, N., Zhang, J., Wu, Y., Zhang, Y., Bai, Y., Jia, J., Zhang, Q., Tian, S., Wu, J., & Hu, Y. (2013). Early exercise improves cerebral blood flow through increased angiogenesis in experimental stroke rat model. *J. Neuroeng. Rehabil.*, 10(1) : 43.
- Zhang, Z. G., Zhang, L., Croll, S. D., & Chopp, M. (2002). Angiopoietin-1 reduces cerebral blood vessel leakage and ischemic lesion volume after focal cerebral embolic ischemia in mice. *Neuroscience*, 113 : 683-687.

논문투고일 : 2013. 02. 27
 심사일 : 2013. 03. 24
 심사완료일 : 2013. 05. 15