일회성 유산소 운동 후 회복기 동안 골격근 내 미토콘드리아 mitophagy 관련 인자의 변화

강윤석 · 김재철

전북대학교

Abstract

Kang, Yun-Seok, Kim, Jae-Cheol. The Change of Mitophagic Factors in Mitochondria of Skeletal Muscle during the Period of Recovery by an Acute Aerobic Exercise. *Exercise Science*, 23(1): 41-48, 2014. The aim of this study was to investigate the expression of mitophagy-related factors such as p53, NF- κ B and PGC-1 α protein in the skeletal muscle of Sprague-Dawley rats after an acute endurance exercise(20 m/min, 0°, 60 min, recovery 2 or 4 hours) at 70 % $\dot{V}O_2$ max intensity. The expression of p53, NF- κ B and PGC-1 α protein in skeletal muscle was analyzed through the method of Western blotting. The expression of p53 protein was significantly increased in both 2- and 4-hour recovery period groups compared with before exercise in each of the soleus and EDL muscle. RelA/p65 protein was significantly increased in the soleus muscle during the recovery period compared with before exercise, but not remarkably increased in EDL muscle. PGC-1 α protein was significantly increased in the soleus muscle in the only 2-hour recovery period group compared with before exercise, and increased in both 2- and 4-hour recovery period groups in EDL muscle. The results suggest that the acute endurance exercise may have induced mitochondrial mitophagy, leading to the expression of p53, NF- κ B and PGC-1 α in skeletal muscle.

Key words : p53, RelA/p65, PGC-1 α , acute exercise, mitophagy

초 록

강윤석, 김재철. 일회성 유산소 운동 후 회복기 동안 골격근 내 미토콘드리아 mitophagy 관련 인자의 변화. 운동과학, 제23권 제1호, 41-48, 2014. 본 연구의 목적은 70 % $\dot{V}O_2$ max 강도에서 일회성 트레드밀 운동(20 m/min, 0°, 60 min) 후 회복기 동안(2시간 집단, 4시간 집단) 쥐의 골격근 내 mitophagy 관련인자인 p53, NF- κ B 및 PGC-1 α 의 근섬유 형태에 따른 발현 양상을 확인하는데 있다. 골격근 내 p53, NF- κ B 및 PGC-1 α 의 단백질 발현은 Western blotting 방법을 통해 분석하였다. p53 단백질 발현은 가자미근과 장지신근에서 운동 전에 비해 회복기 2시간 및 4시간 집단 모두 발현이 증가하였다. RelA/p65 단백질 발현의 경우 가자미근에서는 운동 전에 비해 회복기 동안 발현이 증가하였지만 장지신근에서는 유의한 발현이 나타나지 않았다. PGC-1 α 단백질 발현의 경우 가자미근에서는 운동 전에 비해 회복기 2시간 집단에서만 발현이 증가하였으며, 장지신근에서는 회복기 2시간 및 4시간 집단 모두 발현이 증가하였다. 이러한 결과는 운동이 p53, NF- κ B 및 PGC-1 α 의 발현을 유도하여 골격근내 미토콘드리아 mitophagy를 유발하는 것으로 사료된다.

주요어 : p53, RelA/p65, PGC-1 α , 일회성 지구력 운동, mitophagy

I. 서론

골격근 내 미토콘드리아는 골격근 수축에 필요한 에너지 생산에 매우 중요한 역할을 담당하고 있으며, 미토콘드리아의 수와 크기에 의해 에너지 생산 능력은 변화하게 된다. 특히, 지구력 트레이닝에 의한 골격근내 적응 반응의 하나는 미토콘드리아 수와 크기의 변화이다. 이러한 변화는 골격근내 에너지 생산 능력의 향상에 따른 운동 수행능력이 향상되었음을 의미한다(Saltin & Rowell, 1980). 하지만 훈련되지 않은 상태에서의 일회성 운동은 골격근 세포에서 reactive oxygen species(ROS) 생성과 세포 내 칼슘농도 증가(Noble et al., 2006; Febbraio et al., 2002)와 같은 변화를 초래하여 세포내 소기관 특히, 미토콘드리아의 손상을 야기하게 된다(Bo et al., 2010). 손상된 미토콘드리아는 세포 내 항상성 유지를 위해 mitophagy 또는 macroautophagy라 불리는 미토콘드리아 자가소화작용(autophagy)에 의해 제거된다. 이렇게 손상된 미토콘드리아의 mitophagy에 의한 제거는 미토콘드리아의 생합성이나 골격근 기능 향상에 매우 긍정적인 효과를 미친다(Zhang, 2012).

p53은 핵 내 전사인자로서 세포사멸(apoptosis), 노화(senescence), DNA repair, 세포 증식 및 자가소화작용과 같은 다양한 세포의 기능에 관여한다(Vousden & Lane, 2007). 즉, p53의 발현은 ROS 및 산화적 스트레스에 의해 유도되어 ROS의 생성을 억제할 뿐만 아니라 손상된 세포의 제거에 관여함으로써 세포 내 항상성 유지에 중요한 역할을 담당한다(Crighton et al., 2006). 운동에 따른 p53의 발현은 mitophagy 관련인자인 Autophagy-related protein(Atg)과 LC3 그리고 Beclin-1의 활성을 유도하여 손상된 세포의 제거를 위한 autophagy나 mitophagy를 활성화시키는데 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려지고 있다(Erlach et al., 2007; Sandri, 2010a; Feng et al., 2011; Bartlett et al., 2012).

p53의 또 다른 기능은 peroxisomal proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α)의 발현과 관련되어 있음이 최근에 밝혀지고 있다. PGC-1 α 는 주로 미토콘드리아 생합성 및 지질산화에 주로 관여하는 것으로 알려지고 있지만 미토콘드리아의 분열 및 융합에도 관여하는 것으로 제안되고 있다(Saleem et al., 2009; Saleem et al., 2011). 정상적인 상태에서는 PGC-1 α 가 미토콘드리아의 생합성에 주로 관여하지만 미토콘드리아가 손상되었거나 수명이 다했을 경우에는 미토콘드리아의 제거 및 분열에도 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려지고 있다(Aquilano et al., 2013; Garnier et al., 2005;

Mootha et al., 2003; Schreiber et al., 2003). 특히, 일회성 운동에 의해 손상된 미토콘드리아의 분열을 촉진하여 미토콘드리아 기능 회복에 관여한다는 사실이 최근 연구에서 제시하고 있다(Chan, 2006).

미토콘드리아의 mitophagy와 관련된 또 다른 인자는 nuclear factor-kappaB(NF- κ B)이다. NF- κ B는 모든 종류의 세포에서 다양한 작용을 조절하는 핵 내 전사인자로서 cytokines, 염증반응(inflammation), 면역(immunity), 항원 제공 수용체(antigen presenting receptors), 급성반응성 물질(acute-phase response), 세포사멸, 근위축(atrophy), 생체방어(host defense), 세포내 산화-환원상태(redox status)의 조절 그리고 자가소화작용을 포함하여 150개 이상의 유전자 생성 및 조절에 관여하는 것으로 잘 알려져 있다(Pahl, 1999). 일반적인 상황에서 세포질 내 NF- κ B는 I κ B(inhibitory κ B)에 결합되어 비활성화 상태로 존재하지만 세포에 자극이 가해지면 IKK(I κ B kinase)에 의해 I κ B가 인산화 되고 NF- κ B는 핵 내로 이동하여 유전자의 전사를 조절하게 된다(Gilmore, 2006). NF- κ B는 p50, p52, cRel, RelA/p65와 RelB로 구성되어 있다(Hayden & Ghosh, 2004). 이들 중 RelA/p65가 운동과 관련하여 많이 연구되고 있는 인자이다. RelA/p65는 ROS 및 칼슘의 축적에 의해 생성된 세포의 사멸이나 제거에 핵심적으로 관여하고 있다(Hughes et al., 1998; Hughes et al., 2001; Kamata et al., 2002; Müller et al., 1997). 특히, 일회성 운동을 하는 동안 골격근 세포에서 높게 발현되어 미토콘드리아의 구조 변화에 영향을 미치는 것으로 알려지고 있어 RelA/p65가 운동에 따른 세포 내 ROS 및 칼슘 농도의 증가에 의해 발현이 유도되어 미토콘드리아 항상성 유지에 매우 긍정적인 영향을 미치고 있음을 시사한다(Ji et al., 2004; Ho et al., 2005; McKenzie & Goldfarb, 2007; Durham et al., 2004).

미토콘드리아의 mitophagy와 관련된 인자들이 운동 중에 발생하는 다양한 산화적 스트레스에 의해 발현이 유도되어 미토콘드리아 생합성 및 항상성 유지에 매우 긍정적인 효과를 미친다는 보고를 하고 있음에도 불구하고 운동 후 회복기 동안 이들 인자들의 발현 양상이나 상이한 특성을 가진 근섬유 형태에 따른 이들 인자들의 발현양상을 규명한 연구가 매우 부족한 실정이다.

따라서 본 연구의 목적은 일회성 운동 후 회복기 동안 골격근 내 미토콘드리아 mitophagy 조절인자들인 p53, RelA/p65 및 PGC-1 α 의 발현 양상을 규명하고 근섬유 형태에 따라 이들 인자들의 발현양상의 차이를 규명하며, 이들 인자들 간의 상호 관련성을 규명하는 데 있다.

II. 연구 방법

1. 실험동물

이 연구에서 사용된 실험동물은 출생 시기(8주령)가 동일한 Spargue-Dawley계 수컷($n=18$)을 중앙동물실험(주)에서 공급받아 10주령(321 ± 5.4 g)째에 무작위로 선정하여 각 6마리씩 3개 집단(통제집단, 일회성 운동 후 회복기 2시간, 4시간)으로 구분하였다.

2. 실험방법 및 분석

1) 실험동물 사육

실험동물은 J대학교 실험동물센터에서 plastic cage를 이용하여 2마리씩 사육하였으며, 사육실의 온도는 $23 \sim 25^\circ\text{C}$, 습도는 70~80 %, 명암은 12시간 주기로 조절하였다. 선정된 실험동물은 전 실험 기간을 통하여 사판되는 고형사료(단백질 22.5 %, 지방 3.5 %, 지섬유 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 일회성 운동집단에 무작위로 배정된 다음 일회성 운동집단은 실험 3일 전 $5 \sim 15$ m/min와 0° 의 경사에서 15분 동안 설치류용 트레드밀(Omnipacer model LC-4, Omni tech columbus)에서 적응 훈련을 실시하였다. 이러한 적응 훈련이 끝난 후 일회성 운동 집단은 $\dot{V}O_2\text{max}$ 의 약 70 %인 20 m/min의 속도와 0° 의 경사도에서 60분 동안 일회성 트레드밀 달리기를 실시하였고(Bedford et al., 1979), 운동 후 회복기 발현 양상을 확인하기 위해 일회성 운동 2시간 및 4시간 후 샘플을 적출하였다. 운동이 종료된 후 모든 실험동물은 경추탈골 후 가자미근(soleus)과 장지신근(extensor digitorum longus: EDL)을 적출하였으며, 적출된 골격근은 분석할 때까지 -80°C 에 보관하였다.

3. 분석방법

적출된 조직에서 단백질을 추출하기 위하여 각 조직 100 mg에 단백질 분해 용액[150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tri-HCl(pH 8.0), 1 % NP 40]에 단백질 분해 효소 억제제(1

mM aprotinin, 0.1 mM leupeptin, 1 mM pepstatin)가 함유된 용액(1 ml)을 첨가하여 분쇄기(Ultra-Turrax T8, Germany)를 이용하여 분쇄한 다음 원심분리기(Eppendorf, USA)를 이용하여 4°C 에서 14,000 rpm으로 30분 동안 원심 분리하였다. 원심 분리된 용액 중 상층액을 분리한 후 상층액 중 2 μl 를 단백질 분석 용액(Bio-Rad, USA) 998 μl 에 첨가한 다음 spectrophotometer(Eppendorf, USA)를 이용하여 560 nm의 흡광도에서 단백질량을 정량하였다. 정량화된 단백질에서 각 샘플당 동일한 단백질량(20 μg)을 SDS gel loading 용액에 총 20 μl 가 되도록 혼합한 다음 100°C 에서 5분간 변성시켰다. 변성된 단백질(20 μl)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 8~10 % SDS-polyacrylamide gel에 각 샘플을 주입한 다음 100 volt에서 2시간 동안 전기영동 하였다. 전기 영동된 gel을 PVDF membrane(Amersham, USA)에 전이시키기 위해 Mini trans-module(BioRad, USA)를 이용하여 transfer 용액(190 mM Glycine, 50 mM Tris-base, 20 % methanol, 0.05 % SDS)속에 단백질이 전기 영동된 젤과 PVDF membrane 및 3 M paper를 차례로 겹치도록 한 다음 100 volt에서 4시간 동안 전이 하였다. 단백질이 전이된 membrane은 Phosphate-buffered saline(PBS)(NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na_2HPO_4 1.44 g, KH_2PO_4 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 p53, NF- κB 및 PGC-1 α (Santacruz, Ca)가 첨가된 용액에서 12시간 동안 over-night한 후 PBST용액에서 1 $\times$ 15분, 2 $\times$ 5분 동안 세척되었다. 일차 항체에서 반응된 membrane은 anti-mouse 및 rabbit 1 gG conjugated 이차항체가 첨가된 용액에서 1시간 동안 반응시킨 다음 PBST 용액에서 1 $\times$ 15분, 2 $\times$ 5분 동안 세척되었다. 세척된 membrane은 ECL detection reagent(Amersham, USA) 용액 1 ml에 1분간 노출된 후 imaging system인 ChemiDoc XRS(Bio-Rad, USA)을 통해 immuno reactive bands의 상대적 강도를 정량화했다.

4. 자료처리 방법

측정된 자료는 SPSS Win 10.0 통계 프로그램을 이용하여 평균과 표준편차를 산출하였으며, 집단 간 평균 차 검증은 일원변량분석(one-way ANOVA)을 적용하였다. 가설의 수락 기준은 $p < .05$ 수준에 두었으며, 분석결과 통계적으로 유의

한 차이가 있을 경우 Student Newman-Keul 방식에 의해 사후검증을 실시하였다.

III. 연구 결과

1. 일회성 유산소 운동에 따른 회복기 동안 골격근 내 p53 protein의 발현

가자미근의 경우 운동 전(18.4 ± 2.23)보다 운동 후 회복기 2시간(26.03 ± 2.42) 및 4시간(37.72 ± 4.78) 모두 증가하는 것으로 나타났으며, 특히 회복기 4시간에서 현저하게 증가한 것으로 나타났다. 사후검증 결과 모든 집단 간에 유의한 차이($p < .05$)가 있는 것으로 나타났다. 장지신근의 경우에서도 운동 전(17.76 ± 1.34)보다 운동 후 회복기 2시간(21.62 ± 2.52) 및 회복기 4시간(32 ± 3.18) 모두 증가하는 것으로 나타났으며, 특히 회복기 4시간에서 현저하게 증가한 것으로 나타났다. 사후검증결과 운동 전과 회복기 4시간, 회복기 2시간과 4시간 간에 유의한 차이($p < .05$)가 있는 것으로 나타났다.

2. 일회성 유산소 운동에 따른 회복기 동안 골격근 내 RelA/p65 protein의 발현

가자미근의 경우 운동 전(18.23 ± 3.39)보다 운동 후 2시간(26.17 ± 1.24) 및 회복기 4시간(27.55 ± 2.57) 모두 증가하는 것으로 나타났으며, 특히 회복기 4시간에서 현저하게 증가한 것으로 나타났다. 사후검증 결과 운동 전과 회복기 2시간 및 4시간 간에 유의한 차이($p < .05$)가 있는 것으로 나타났다. 장지신근의 경우 운동 전(28.52 ± 1.5)보다 운동 후 회복기 2시간 집단(26.17 ± 1.24)에서는 낮게 발현된 반면에 회복기 4시간(30.87 ± 1.58)에서는 높게 발현되는 것으로 나타났다. 사후검증 결과 모든 집단 간에 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

3. 일회성 유산소 운동에 따른 회복기 동안 골격근 내 PGC-1 α protein의 발현

가자미근의 경우 운동전(23.64 ± 2.349)보다 운동 후 회복기 2시간(35.54 ± 4.3)에서만 현저하게 증가한 것으로 나타난 반면에 회복기 4시간(24.22 ± 3.24)에서는 유의하게 증가하지

Fig. 1. Effect of acute endurance exercise on p53 protein in soleus(SOL) and extensor digitorum longus(EDL). Control(CON), acute endurance exercise recovery 2h(AER2) and 4h(AER4). Values represents the mean $\pm$ SE; * indicate statistically significant difference compared with the between groups, at $p < .05$.

Fig. 2. Effect of acute endurance exercise on RelA/p65 protein in soleus(SOL) and extensor digitorum longus(EDL).

않았다. 사후검증 결과 운동 전과 회복기 2시간 및 회복기 2시간과 4시간 간에 유의한 차이($p < .05$)가 있는 것으로 나타났다. 장지신근의 경우 운동 전(23.1 ± 1.97)보다 운동 후 회복기 2시간(31.15 ± 3.02)과 회복기 4시간(28.23 ± 2.59) 모두 증가하는 것으로 나타났으며, 특히 회복기 2시간에서 현저하게 증가하는 것으로 나타났다. 사후검증 결과 운동 전과 회복기 2시간 및 4시간 간에 유의한 차이($p < .05$)가 있는 것으로 나타났다.

Fig. 3. Effect of acute endurance exercise on PGC-1 α protein in soleus (SOL) and extensor digitorum longus (EDL).

IV. 논의

본 연구의 목적은 일회성 유산소운동 후 회복기 동안 골격근 내 mitophagy 관련인자로 알려진 p53, RelA/p65 및 PGC-1 α 의 단백질 발현을 확인하기 위해 수행되었으며, 주요한 결과는 가자미근 내 이들 단백질의 발현은 운동 후 유의하게 증가하였고 장지신근에서는 p53과 PGC-1 α 의 단백질 발현이 유의하게 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 운동 중 발생한 ROS와 같은 산화적 스트레스가 미토콘드리아 구조 및 생합성에 영향을 미쳤으며, 운동 후 회복기 동안 미토콘드리아 mitophagy에 p53, RelA/p65 및 PGC-1 α 가 관여하여 미토콘드리아 기능 회복이나 운동 중 생성된 스트레스 요인을 제거하기 위한 하나의 기전으로 작용한 것으로 사료된다.

자가소화작용이란 자가포식소체 (autophagosome)에서 리소좀으로 이어지는 경로를 통해 세포 내에서 일어나는 분해 시스템으로서 (Mizushima & Levine, 2010), 손상되었거나 수명이 다한 단백질과 같은 소분자에서부터 미토콘드리아와 같은 거대분자에 이르기까지 다양한 세포 구성물질의 제거를 통해 세포의 생존을 돕고 세포의 에너지 수요를 충족시키는 데 도움을 준다 (Levine, 2007; Kuma & Mizushima, 2010; Sandri, 2010b). 자가소화작용에 의한 세포 내 물질의 제거 경로는 크게 세 가지로 구분할 수 있다. 먼저, chaperone 매개 자가소화작용 (chaperone-mediated autophagy)으로 chaperone이 결합한 물질들이 수용체를 통해 리소좀 내부로 들어가는 것으로써 세포 내부의 특정 단백질을 선택적으로 제거하는 과정이다. 두 번째 과정은 미세자가소화과정 (microautophagy)으

로 라이소솜 막의 일부가 안으로 함입되면서 단백질 및 지질과 같은 세포 구성 물질이 리소좀 내부로 들어가 제거되는 과정 (Santambrogio & Cuervo, 2011)이며, 마지막으로 거대자가소화과정 (macroautophagy)은 자가소화작용에서 가장 광범위하게 연구된 과정 (Klionsky & Saitel, 2012)으로 단백질과 지질 등의 소분자에서부터 미토콘드리아, 소포체, 핵, 지방소립, 리보솜과 같은 거대분자를 이중 막으로 감싸 분해하는 과정이다. 또한 거대자가소화과정 경로를 통해 미토콘드리아의 제거가 이루어져 mitophagy로 불리기도 한다 (Zhang, 2012).

p53은 핵 내 전사인자로서 다양한 세포의 기능에 관여하며 (Vousden & Lane, 2007), 특히 운동으로 증가된 ROS 및 산화적 스트레스와 같은 세포 내 여러 스트레스에 의해 활성이 증가하여 ROS의 생성을 억제하고 손상된 기관을 제거하여 세포 내 항상성 유지에 관여하게 된다 (Crichton et al., 2006). Bartlett 등 (2012)은 고강도 운동에 따른 스트레스 증가와 더불어 p53의 발현이 매우 높은 결과를 보고하고 있으며, Sandri (2010a)와 Erlich 등 (2007)은 고강도 운동을 실시한 후 손상된 세포와 조직 내에서 mitophagy 유도인자인 Atg와 LC3 그리고 Beclin-1의 발현 증가와 더불어 p53의 발현이 매우 높게 증가한다는 사실을 보고하고 있다. 이러한 결과는 p53이 운동 중 발생한 ROS와 같은 산화적 스트레스에 의해 손상되거나 수명이 다한 골격근 내 미토콘드리아의 제거에 관여하고 있음을 제시하고 있다. 특히, 하태균 (2012)은 운동을 하는 동안뿐만 아니라 운동 후 회복기 동안에서도 세포사멸과 더불어 p53의 발현이 높게 발현되어 운동하는 동안과 회복기 동안에서도 세포들의 항상성 유지를 위한 기전이 작용하고 있으며, 특히 손상된 미토콘드리아 제거 및 미토콘드리아 기능 회복을 위한 기전이 작용하고 있음을 제시하고 있다.

본 연구에서도 일회성 운동 후 회복기 가자미근과 장지신근에서 p53의 발현이 유의하게 증가하여 운동 중 생성된 스트레스에 의해 p53 발현이 증가한 결과는 p53이 회복기 동안에 손상된 미토콘드리아의 제거 및 기능회복에 중요한 역할을 담당한 것으로 사료된다.

정상적인 상태에서는 NF- κ B가 세포질 내 I κ B에 결합되어 비활성화 상태로 존재하지만 세포에 자극이 가해지면 IKK에 의해 I κ B가 인산화 되고 NF- κ B는 핵 내로 이동하여 유전자의 전사를 조절하게 된다 (Gillmore, 2006). NF- κ B는 5종류로 구분되며, 그 중 RelA/p65는 운동에 의한 세포내 칼슘농도 증가 (Hughes et al., 1998; Hughes et al., 2001)와 ROS 축적에 의해 활성이 증가 (Kamata et al., 2002; Müller et al., 1997)하여

Beclin-1을 통한 손상된 미토콘드리아를 제거하게 된다(Nivon et al., 2009). Ho 등(2005)과 Ji 등(2004)은 일회성 트레드밀 운동을 실시한 결과 쥐의 골격근에서 세포 손상과 더불어 I κ B 인산화와 RelA/p65 활성이 매우 높게 증가하였음을 보고하고 있으며, 하태균(2012)은 일회성 운동을 실시한 결과 운동 후 회복기 6시간 까지도 mitophagy 촉진 인자인 Beclin-1과 LC3 I/II의 발현 증가와 함께 RelA/p65의 발현이 증가하였음을 보고하고 있다. 이러한 연구들은 운동에 따른 RelA/p65의 발현이 운동에 의한 칼슘농도 증가와 ROS 축적 상황에 기인하며, mitophagy를 통한 세포 내 항상성 유지에 중요한 역할을 담당하고 있다는 사실을 제시하고 있다. 본 연구에서도 일회성 운동 후 회복기 2시간과 4시간에서 가자미근 내 RelA/p65의 발현이 점차 증가하는 것으로 나타나 RelA/p65가 운동에 따른 mitophagy에 중요한 역할을 담당하는 것으로 사료된다. 하지만 장지신근에서는 유의한 변화가 나타나지 않아 근섬유 형태 및 조성에 따라 상이하게 작용할 수 있는 가능성이 있는 것으로 사료된다.

골격근내 mitophagy 조절에 관여하고 있음이 제시되고 있는 인자가 PGC-1 α 이다. PGC-1 α 는 핵 내 전사인자로서 미토콘드리아 생합성뿐만 아니라 미토콘드리아 합성과 분열을 통한 형태변화, 근섬유 형태의 전환, 탄수화물 대사를 조절하는 여러 인자들의 co-activator로 알려져 있다(Garnier et al., 2005; Mootha et al., 2003; Schreiber et al., 2003). 특히 PGC-1 α 는 미토콘드리아의 합성과 분열을 적절하게 조절하여 미토콘드리아 항상성에 기여하게 된다(Chan, 2006). 그 중 미토콘드리아의 분열은 fission 1(Fis 1)과 dynamin-related protein 1(Drp 1)에 의해 조절되는 것으로 알려지고 있다. 미토콘드리아의 분열과정에서 PGC-1 α 가 이러한 분열조절인자의 발현에 밀접한 관련이 있음이 보고되고 있다. Kubli와 Gustafsson(2012) 및 김정하 등(2012)은 운동에 의해 손상된 미토콘드리아의 제거가 이루어지는 동안 Drp 1과 PGC-1 α 의 발현이 함께 증가하였을 뿐만 아니라 Gomes와 Scorrano(2008)는 일회성 운동 후 회복기 Drp 1과 PGC-1 α 의 발현이 동시에 증가하여 PGC-1 α 가 Drp 1을 통해 스트레스 요인에 의한 손상 및 방어기전에 관여하고 있음을 제시하였다. 본 연구결과에서도 PGC-1 α 의 발현이 회복기 2시간에서 모든 근섬유에서 유의하게 증가하는 것으로 나타나 운동 중 발생한 ROS 및 스트레스에 의해 손상된 미토콘드리아 기능회복 및 세포의 항상

성에 PGC-1 α 가 중요한 역할을 한 것으로 사료된다.

또한 p53의 발현이 미토콘드리아 기능 조절자 역할을 수행한다는 논문들이 발표되고 있다. 일회성 운동 후 회복기 3시간에서 p53과 PGC-1 α mRNA의 발현이 증가하였고(Bartlett et al., 2012), p53 발현이 억제된 쥐 모델에서 PGC-1 α protein의 발현과 미토콘드리아 수가 대조군에 비해 유의하게 감소하였음을 보고하여 p53이 PGC-1 α 와 함께 미토콘드리아 조절에 긍정적인 영향을 미치고 있다고 제시하였다(Park et al., 2009; Saleem et al., 2009). 또한 골격근세포에서의 PGC-1 α/β 의 발현이 NF- κ B 특히 RelA/p65의 발현을 제한하여 염증반응을 억제한다는 연구결과를 제시하였다(Eisele et al., 2013). 본 연구에서 PGC-1 α 의 발현은 가자미근에서 회복기 2시간 집단에서 유의한 증가를 보였으며 p53 및 RelA/p65의 발현은 회복기 2시간 집단에서 증가하여 4시간 집단에서 발현이 더욱 증가하였다. 일회성 운동에 의한 p53, RelA/p65 및 PGC-1 α 가 미토콘드리아 mitophagy에 관여하고 있을 가능성을 제시하지만 이들 단백질의 발현 양상만으로 상관관계를 논하기는 부족할 것으로 생각되며 추후 광범위하고 체계적인 연구를 통해 더 명확한 규명이 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

일회성 지구력 운동 후 회복기 골격근 내 mitophagy 관련 인자인 p53과 RelA/p65 그리고 PGC-1 α 의 발현을 규명하기 위하여 트레드밀 운동을 실시한 결과 p53 protein의 발현은 가자미근과 장지신근에서 회복기 2시간 집단과 4시간 집단에서 높게 발현되는 것으로 나타났다. RelA/p65 protein의 발현은 가자미근에서 운동 후 회복기 2시간 집단과 4시간 집단에서 높게 발현되었지만 장지신근에서는 유의한 변화가 나타나지 않았다. PGC-1 α protein의 발현은 가자미근에서는 운동 후 회복기 2시간 집단에서 유의하게 증가하였으며 장지신근에서는 회복기 2시간 집단과 4시간 집단에서 높게 발현된 것으로 나타났다.

이러한 결과들은 일회성 지구력 운동 후 회복기 p53, RelA/p65 및 PGC-1 α 가 미토콘드리아 mitophagy에 관여하고 있을 가능성을 제시하며, 보다 근본적인 요인분석이 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

- 김정하, 김재철, 박대령, 강윤석 (2012). 일회성 유산소 운동에 따른 흰쥐 비복근 내 미토콘드리아 기능 및 구조 조절 단백질의 발현, *운동과학*, 21(2): 191-200.
- 하태균 (2012). 운동강도 및 회복시간대에 따른 흰쥐 골격근 내 Apoptosis/Autophagy 관련 인자의 변화. 미간행 박사학위논문. 전북대학교.
- Aquilano, K., Baldelli, S., Pagliei, B., Cannata, S. M., Rotilio, G., & Ciriolo, M. R. (2013). p53 orchestrates the PGC-1 α -mediated antioxidant response upon mild redox and metabolic imbalance. *Antioxid. Redox Signal.*, 1, 18(4): 386-399.
- Bartlett, J. D., Hwa, Joo C., Jeong, T. S., Louhelainen, J., Cochran, A. J., Gibala, M. J., Gregson, W., Close, G. L., Drust, B., & Morton, J. P. (2012). Matched work high-intensity interval and continuous running induce similar increases in PGC-1 α mRNA, AMPK, p38, and p53 phosphorylation in human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, 112(7): 1135-1143.
- 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): 1278-1283.
- Bo, H., Zhang, Y., & Ji, L. L. (2010). Redefining the role of mitochondria in exercise: a dynamic remodeling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1201: 121-128.
- Chan, D. C. (2006). Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22: 79-99.
- Crichton, D., Wilkinson, S., O'Prey, J., Syed, N., Smith, P., Harrison, P. R., Gasco, M., Garrone, O., Crook, T., & Ryan, K. M. (2006). DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell*, 126(1): 121-134.
- Durham, W. J., Li, Y. P., Gerken, E., Farid, M., Arbogast, S., Wolfe, R. R., & Reid, M. B. (2004). Fatiguing exercise reduces DNA binding activity of NF-kappaB in skeletal muscle nuclei. *J. Appl. Physiol.*, 97(5): 1740-1745.
- Eisele, P. S., Salatino, S., Sobek, J., Hottiger, M. O., & Handschin, C. (2013). The peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α/β (PGC-1) coactivators repress the transcriptional activity of NF- κ B in skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 288(4): 2246-2260.
- Erlach, S., Mizrachy, L., Segev, O., Lindenboim, L., Zmira, O., Adi-Harel, S., Hirsch, J. A., Stein, R., Pinkas-Kramarski, R. (2007). Differential interactions between Beclin 1 and Bcl-2 family members. *Autophagy*, 3(6): 561-568.
- 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.*, 296(5): 1264-1266.
- Feng, Z., Bai, L., Yan, J., Li, Y., Shen, W., Wang, Y., Wertz, K., Weber, P., Zhang, Y., Chen, Y., & Liu, J. (2011). Mitochondrial dynamic remodeling in strenuous exercise-induced muscle and mitochondrial dysfunction: regulatory effects of hydroxytyrosol. *Free Radic. Biol. Med.*, 50(10): 1437-1446.
- Garnier, A., Fortin, D., Zoll, J., N'Guessan, B., Mettauer, B., Lampert, E., Veksler, V., & Ventura-Clapier, R. (2005). Coordinated changes in mitochondrial function and biogenesis in healthy and diseased human skeletal muscle. *FASEB J.*, 19(1): 43-52.
- Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25(51): 6680-6684.
- Gomes, L. C., & Scorrano, L. (2008). High levels of Fis1, a pro-fission mitochondrial protein, trigger autophagy. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1777(7-8): 860-866.
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.*, 18(18): 2195-2224.
- Ho, R. C., Hirshman, M. F., Li, Y., Cai, D., Farmer, J. R., Aschenbach, W. G., Witczak, C. A., Shoelson, S. E., & Goodyear, L. J. (2005). Regulation of I κ B kinase and NF- κ B in contracting adult rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 289(4): C794-C801.
- Hughes, K., Antonsson, A., & Grundström, T. (1998). Calmodulin dependence of NFkappaB activation. *FEBS Lett.*, 441(1): 132-136.
- Hughes, K., Edin, S., Antonsson, A., & Grundström, T. (2001). Calmodulin-dependent kinase II mediates T cell receptor/CD3- and phorbol ester-induced activation of IkappaB kinase. *J. Biol. Chem.*, 276(38): 36008-36013.
- Ji, L. L., Gomez-Cabrera, M. C., Steinhafel, N., & Vina, J. (2004). Acute exercise activates nuclear factor (NF)- κ B signaling pathway in rat skeletal muscle. *FASEB J.*, 18(13): 1499-1506.
- Kamata, H., Manabe, T., Oka, S., Kamata, K., & Hirata, H.

- (2002). Hydrogen peroxide activates IkappaB kinases through phosphorylation of serine residues in the activation loops. *FEBS Lett.*, 519(1-3): 231-237.
- Klionsky, D. J., & Saltiel, A. R. (2012). Autophagy works out. *Cell Metab.*, 15(3): 273-274.
- Kubli, D. A., & Gustafsson, Å. B. (2012). Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circ. Res.*, 111(9): 1208-1221.
- Kuma, A., & Mizushima, N. (2010). Physiological role of autophagy as an intracellular recycling system: with an emphasis on nutrient metabolism. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21(7): 683-690.
- Levine, B. (2007). Autophagy and cancer. *Nature*, 446(7137): 745-747.
- McKenzie, M. J., & Goldfarb, A. H. (2007). Aerobic exercise bout effects on gene transcription in the rat soleus. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 39(9): 1515-1521.
- Mizushima, N., & Levine, B. (2010). Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nature Cell Biology*, 12(9): 823-830.
- Mootha, V. K., Lindgren, C. M., Eriksson, K. F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstråle, 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-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Gene.*, 34(3): 267-273.
- Müller, J. M., Rupec, R. A., & Baeuerle, P. A. (1997). Study of gene regulation by NF-kappa B and AP-1 in response to reactive oxygen intermediates. *Methods*, 11(3): 301-312.
- Nivon, M., Richet, E., Codogno, P., Arrigo, A. P., & Kretz-Remy, C. (2009). Autophagy activation by NFkappaB is essential for cell survival after heat shock. *Autophagy*, 5(6): 766-783.
- Noble, E. G., Ho, R., & Dzialoszynski, T. (2006). Exercise is the primary factor associated with Hsp70 induction in muscle of treadmill running rats. *Acta. Physiol.*, 187(4): 495-501.
- Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF- kappaB transcription factors. *Oncogene*, 18(49): 6853-6866.
- Park, J. Y., Wang, P. Y., Matsumoto, T., Sung, H. J., Ma, W., Choi, J. W., Anderson, S. A., Leary, S. C., Balaban, R. S., Kang, J. G., & Hwang, P. M. (2009). p53 improves aerobic exercise capacity and augments skeletal muscle mitochondrial DNA content. *Circ. Res.*, 105(7): 705-712.
- Saleem, A., Adhihetty, P. J., & Hood, D. A. (2009). Role of p53 in mitochondrial biogenesis and apoptosis in skeletal muscle. *Physiol. Genomics*, 37(1): 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(5): 1506-1513.
- Sandri, M. (2010a). Autophagy in skeletal muscle. *FEBS Lett.*, 584(7): 1411-1416.
- Sandri, M. (2010b). Autophagy in health and disease. 3. Involvement of autophagy in muscle atrophy. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 298(6): 1291-1297.
- Santambrogio, L., & Cuervo, A. M. (2011). Chasing the elusive mammalian microautophagy. *Autophagy*, 7(6): 652-654.
- Schreiber, S. N., Knutti, D., Brogli, K., Uhlmann, T., & Kralli, A. (2003). The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha (ERRalpha). *J. Biol. Chem.*, 278(11): 9013-9018.
- Vousden, K. H., & Lane, D. P. (2007). p53 in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8(4): 275-283.
- Zhang, J. (2012). Autophagy and mitophagy in cellular damage control. *Redox Biol.*, 1(1): 19-23.

논문투고일 : 2013. 11. 24
심사일 : 2014. 01. 15
심사완료일 : 2014. 02. 21