

운동이 F344계 임신쥐에서 골격근의 VAMP-2 및 GLUT-4 단백질 발현과 혈중 인슐린, 렙틴 농도에 미치는 영향

윤진환* · 이희혁 · 김종오 · 오명진 · 박성태 · 지용석¹ · 서태범² · 남궁욱²

한남대학교 스포츠의학연구소, ¹청주대학교, ²대전대학교 한의대

Received May 9, 2007 / Accepted June 4, 2007

Effects of maternal exercise on expression of GLUT-4, VAMP-2 in skeletal muscle and plasma insulin and leptin levels in pregnant rats. Jin Hwan Yoon*, Hee Hyuk Lee, Jong Oh Kim, Myung Jin Oh, Seong Tae Park, Young Seok Jee¹, Tae Beom Seo² and Nam gung Uk². ¹Research Institute of Sports Medicine, Hannam University, Cheongju University, ²Department of Oriental Medicine, Daejeon University – The main objective of this study was to investigate the effects of exercise on serum insulin and leptin levels and GLUT-4 and VAMP-2 in skeletal muscles from the pregnant rats. F344 rats were randomly divided into four groups (n = 15 in each group): control group (CG), pregnant group (PG), pregnant running group (PR), and pregnant swimming group (PS). From the 15th day of pregnancy, animals in the running group were forced to run on treadmill for 30 min with a light intensity, while those in the swimming group were forced to swim in swimming pool for 10 min once a day for 6 consecutive days. The present result demonstrated that in pregnant rat group, serum insulin levels significantly increased and leptin levels significantly decreased. Skeletal GLUT-4 and VAMP-2 protein expression was significantly decreased in pregnant rats compared to non-pregnant rats. However, maternal running during gestational period alleviated pregnancy-induced changes in plasma insulin and leptin levels, and it significantly enhanced skeletal GLUT-4 and VAMP-2 protein expression. From those results, it can be suggested that running exercise during gestational period may improve glycemic control by up-regulating GLUT-4 and VAMP-2 protein expression.

Key words – maternal exercise, insulin, leptin, GLUT-4, VAMP-2

서 론

산모에서 인슐린 저항성과 고인슐린혈증의 발생은 임신에 따른 대사적 변화 가운데 잘 알려진 특징으로, 성장하고 있는 태아에게 모체의 영양소가 충분히 공급될 수 있도록 촉진하는 필요한 대사적 적응이다[7,12]. 출산 후 산모의 인슐린 민감성이 향상된다 하더라도[45], 임신 중 당대사의 손상은 출산 후에도 만성적인 당대사 질환을 유발시키게 된다[48]. 임신으로 인한 인슐린 저항성과 고인슐린혈증이 췌장 베타세포질량의 증가, 인슐린 합성의 증가, 그리고 글루코스로 유발되는 인슐린 분비의 증가로 유발됨이 관찰되었다[39]. 말초조직인 골격근에서는 인슐린 유발성 글루코스 처리(insulin-stimulated glucose disposal)가 임신으로 감소되어 인슐린 유발성 글루코스 처리의 주요 조직인 골격근이 인슐린 민감성 감소에 원인임이 보고된 바 있다[6,52].

운동은 인슐린 민감도 개선을 위한 효과적인 자극 원으로 글루코스 생성의 억제, 글루코스 유입과 글리코젠 합성의 증가[43] 그리고 인슐린 민감도에 이상을 초래하는 비만, 고지혈증, 그리고 혈액순환 장애와 같은 대사적 이상을 개선시킬

수 있기 때문이다[49]. 운동의 이러한 효과로 인해 글루코스 자극에 의한 췌장 β세포의 인슐린 분비가 감소되게 된다[6]. Steinberg 등[49]은 인슐린 저항성을 지닌 피험자들에서 운동 후 증상이 개선되었음을 보고하였다. 게다가 당뇨병환자를 대상으로 한 연구에서도 운동이 인슐린 민감성을 향상키는 것으로 나타났다[44]. 이들 연구들은 정상 상태뿐만 아니라 인슐린농도에 변화를 초래할 수 있는 다양한 조건하에서 운동을 실시한 경우 말초조직의 당 이용률 및 인슐린 감수성이 거의 정상으로 향상되는 것을 관찰하였다. 게다가 운동은 인슐린 유발성 당수송체(insulin-stimulated glucose transport)와 근수축 유발성 당수송체(contraction-stimulated glucose transport)의 발현을 모두 증가시킴으로써 당내성과 인슐린 작용을 향상시킬 수 있다[28]. 이것은 임신으로 발생하는 인슐린 유발성 글루코스 처리 손상이 운동으로 개선될 수 있음을 시사하는 것이다. 실제로 임신 흰쥐를 대상으로 골격근을 전기적 자극으로 수축활동[17]과 트레드밀 달리기 운동[53]을 적용한 결과 임신으로 유발되는 인슐린 저항성이 유의하게 감소되어 정상동물과 차이가 없음을 보고된 바 있다.

운동으로 인한 인슐린 저항성의 개선은 주로 근육조직에서 인슐린 신호전달의 변화와 당수송체(glucose transporter; GLUT)의 적응성 증가와 의해서 발생된다. Host 등[20]과 Kuo 등[27]은 운동으로 인한 골격근의 제4형 당수송체

*Corresponding author

Tel : +82-42-629-7990, Fax : +82-42-629-8402

E-mail : yoonjh@hannam.ac.kr

(glucose transporter-4; GLUT-4) mRNA 및 단백질의 발현증가와 함께 당의 세포막 투과성이 증가됨을 보고하였다. 골격근 제4형 당수송체(glucose transporter-4; GLUT-4)는 골격근과 같은 인슐린 자극을 받는 표적 조직에서 특이적으로 발현되며, 안정시 세포내에 소포(vesicle)의 형태로 존재하다가 근수축이나 인슐린에 반응하여 세포막 표면으로 이동, 즉 전위(translocation) 과정을 통해 당을 세포내로 유입시키게 된다[42]. 하지만, 인슐린 결핍과 인슐린 신호전달 체계 손상을 특징으로 하는 인슐린 저항성에서 GLUT-4의 발현뿐만 아니라 전위가 감소되는 것으로 알려져 있다[21].

최근 GLUT-4의 세포막으로의 전위와 관련된 신호전달 기전에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있는데, 특히, 인슐린 혹은 근수축 자극에 의해 GLUT-4가 세포내 저장소에서 세포막으로의 전위 단계에 관여하는데 v-SNARE vesicle-associated membrane protein-2 (VAMP-2)가 중요한 물질로 알려져 있다. 세포막으로의 GLUT-4 전위의 마지막 단계는 세포막과 이 단백질의 융합이며, 이 단계에 작용하는 소포관련 단백질 복합체를 soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor(SNARE)라고 하는데, VAMP-2, syntaxin A, B와 SNAP-25 등이 있다. 이 중 GLUT와 함께 같은 소포에 위치하고 있으면서 인슐린에 의해 활성화되어 세포막과 GLUT-4 소포와의 융합을 연결해 주는 단백질을 VAMP-2라고 한다[16]. 인슐린 자극에 의한 GLUT-4의 전위에 VAMP-2가 필수적인 단백질이라는 사실은 이미 확인되었다[41]. 운동이 인체 골격근의 VAMP-2 발현에 미치는 영향을 조사했던 연구에서 일회성 달리기 운동이 GLUT-4와 VAMP-2 발현을 증가시켰으며[26], Park 등[37]은 당뇨동물에서 감소된 골격근 GLUT-4와 VAMP-2 발현이 트레드밀 운동으로 증가될 수 있음을 보고한 바 있다. 이러한 결과들은 운동으로 증가되는 GLUT-4의 전위에 VAMP-2 발현증가가 중요한 기전임을 제시하고 있다.

지방세포에서 생성되는 렙틴 호르몬이 인슐린 신호전달계에 작용하여 글루코스 항상성의 조절에 관여하고 있음이 여러 연구에서 확인되었다[36,47,50]. 렙틴투여 및 렙틴발현이 증가된 동물에서 골격근을 포함한 말초조직에서 인슐린 신호전달의 향상과 함께 인슐린 민감성이 향상된 반면에 [36,47], 렙틴농도의 결핍으로 인슐린 민감성이 손상된 동물에서 렙틴투여가 인슐린 민감성을 향상시키는 것으로 관찰된 바 있다[13,18,34]. 렙틴은 또한 임신 중 당대사 조절에서도 중요한 호르몬으로 작용할 수 있음이 제시된 바 있다. Atawi 등[1]은 제 1형 당뇨를 지닌 임신여성에서 렙틴농도의 유의한 감소가 인슐린에 의한 당조절을 손상시키는 것으로 보고하였다. Salvatores 등[46]도 임신성 당뇨병을 지닌 여성에서 혈중 렙틴농도와 인슐린 농도간에 유의한 관련성을 보고하였다. 이처럼 임신 중 렙틴농도의 현저한 감소는 골격근에서 인슐린 신호전달계의 손상과 이후 당수송 단백질의 발

현에도 영향을 미치게 될 것이다.

현재 임신 중 운동이 산모의 건강에 매우 효과적인 것으로 알려져 있으나, 운동이 모체의 당대사에 미치는 영향과 관련되어서는 충분한 연구가 진행되지 못하고 있다. 이에 본 연구에서는 임신 흰쥐에서 달리기와 수영이 당 조절 호르몬인 인슐린과 렙틴 그리고 골격근에서 인슐린에 의한 당 유입 단백질인 GLUT-4와 GLUT-4 전위에 관여하는 단백질인 VAMP-2 발현에 미치는 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

실험 동물

본 실험에 사용된 동물은 7주령의 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐로 3일간의 환경 적응 기간을 거치게 하였고, 4마리당 한 개의 사육케이스(38cm×28cm×18cm)에 넣고 항온(20±2°C), 습도(60%)이 유지되며, 12시간 간격으로 낮과 밤을 교대시키는 동일한 실험실 환경에서 사육되었다. 본 실험에 사용되는 동물은 F344 계열의 임신된 흰쥐를 실험대상으로 하였다. 실험동물은 무작위 표본추출에 의하여 비임신군 (non-pregnancy group, n=15), 임신군 (pregnancy group, n=15), 임신 달리기군 (pregnancy and treadmill group, n=15), 그리고 임신 수영군 (pregnancy and swimming group, n=15)으로 분류하였다. 실험동물은 전 실험기간을 통하여 고품 사료와 물을 자유스럽게 섭취하도록 하였으며, 온도는 22 - 24°C, 습도는 60%가 유지되며 밤낮주기 (12시간 light/ 12시간 dark)가 조절되는 실험실 환경에서 사육하였다.

운동 방법

임신 중 달리기와 수영은 임신 14일째부터 21일까지 총 7일간 실시되었다. 임신 흰쥐에서 달리기 운동의 부하는 소형 동물용 트레드밀의 경사도를 10%로 고정된 상태에서 초기 5분간은 3 m/min 속도로 하다가 그 다음 5분간은 8 m/min 속도로, 그리고 20 m/min 속도에서 20분간 총 30분간 달리기를 하루 일회씩 적용하였다. 임신동물에서 분당 20m 속도로 20분에서 1시간의 달리기 운동은 모체의 인슐린 저항성을 유의하게 감소시키는 것으로 보고된 바 있다[35,31]. 임신 흰쥐에서 수영은 자동온도조절기를 이용한 소형동물용 수영장비(깊이 50cm, 지름 50cm)에서 수온을 37 °C로 유지하여 하루 일회씩 10분간 적용하였다. 임신 흰쥐에서 10분간의 수영은 태아의 발달에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 보고된 바 있다[30].

단백질 분석방법 (Western blotting)

골격근 GLUT-4와 VAMP-2 단백질 발현량을 측정하기 위하여 가자미근 조직을 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂PO₄, 2mM KH₂PO₄(pH 7.4)가 함유된 PBS로 씻은 후

결 과

50-200 μ l의 triton lysis buffer (20mM Tris, pH 7.4, 137 mM NaCl, 25 mM β -blycerophosphate, pH 7.14, 2 mM sodium pyrophosphate, 2 mM EDTA, 1mM Na₃VO₄, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 5 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml aprotinin, 3 uM benzamidine, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF)에 담그어 초음파 분해하였다. 그 후 각 sample에 대한 단백질을 정량하였으며, 그 중 10 μ g의 단백질을 western analysis에 사용하였다. 단백질의 발현은 anti-GLUT4 antibody(400064, Calbiochem, U.S.A)와 anti-VAMP2 (SantaCruz, Cat. No: sc-13992, U.S.A)를 이용하여 확인 하였다. Membrane proteins을 12% SDS-PAGE(1.5M Trizma base, 10% Sodium Dodecyl Sulfate, 30% Acrylamide, 10% Ammonium Sulfate, TEMED) 상에서 전기영동 시킨 후 PVDF membrane(Pall Corporation, U.S.A)에 전기이동 시켰다. membrane을 TBS 시약으로 10분씩 3차례 washing한 후 blocking buffer(TBS 34 ml, BSA 1.05g)에서 1시간동안 shaking시킨 후, 각각의 polyclonal antibody를 Blocking buffer에 1: 1000의 비율로 희석하여 상온에서 1시간 30분 동안 반응시켰다. 그 후 membrane을 씻어내고 anti-rabbit IgG(Santa Cruz, U.S.A)가 결합되어 있는 horseradish peroxidase를 1대 1000의 비율로 희석하여 상온에서 30분 동안 처리 하고 다시 한 번 씻어내었다. 마지막으로 Membrane에 부착 된 단백질을 Western blotting detection system을 이용하여 측정하였으며 density-meter(Sharp jx-330)를 이용하여 스캔한 후, 단백질의 정량분석은 이미지 분석 프로그램(Image Master ver. 3.0, Biotech pharmacia)을 이용하여 산출하였다.

인슐린 및 렙틴 분석

마지막 운동종료 24시간 후 실험동물을 Chloroform으로 호흡기를 통해 마취시킨 후 개복을 하지 않은 상태에서 10 ml(21 gage) 주사기로 심장의 좌심실에 침자 하여 약 5 ml의 혈액을 채혈하였다. 채혈된 혈액은 즉시 혈청 튜브에 넣어 3000rpm에서 3분간 원심 분리하여 혈청을 분리하여 -70이하에서 냉동하여 분석 전까지 보관하였다. 혈청 인슐린 농도는 효소면역 측정법(enzyme immunoassay)인 방사 면역 측정법(RIA, radio immunoassay)으로 분석하였고 혈청 렙틴 농도는 Linco leptin assay Kit(Linco research immunoassay, St. Charles, MO)를 이용하여 방사선 면역능으로 분석되었다.

자료처리

본 연구의 자료 처리는 SPSS 통계프로그램을 이용하여 각 항목별 평균(mean)과 표준편차(standard error mean, SEM)를 구하였고, 항목별 집단간 차이 검정은 일원변량 분산분석(one-way ANOVA)를 이용하였다. 유의차가 나타난 항목에 대한 사후검증은 Duncan의 방법을 이용하였다. 통계적 유의수준은 p<.05로 정하였다.

임신 중 운동이 혈중 인슐린 및 렙틴 농도에 미치는 영향
 임신 흰쥐에서 측정된 혈중 글루코스, 인슐린, 그리고 렙틴 농도는 <Table 1>과 같다. 비임신 흰쥐에 비해 임신 흰쥐의 혈당과 렙틴이 유의하게 낮은 것으로 나타났고, 인슐린 농도는 유의하게 증가된 것으로 나타났다. 임신 흰쥐에서 트레드밀 달리기를 적용한 결과 혈당에 유의한 변화를 주지 않으면서 인슐린 농도를 유의하게 감소시키고 렙틴 농도는 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다. 하지만 임신 중 수영은 인슐린 및 렙틴농도에 유의한 변화를 주지 못했다.

임신 중 운동이 골격근 GLUT-4 단백질 발현에 미치는 영향
 임신 흰쥐에서 트레드밀 달리기와 수영이 골격근의 GLUT-4 단백질 발현에 미치는 효과를 알아보기 위해 Western bolt를 실시하였다. 여기서 나타난 정성적 자료는 <Fig. 1>과 같은 발현량을 보였다.

이에 대한 <Fig. 3>에서의 정량적 분석결과 GLUT-4 단백질 발현은 비임신군의 GLUT-4 단백질 발현량을 100으로 하여 다른 집단과 백분율로 비교했을 때 임신군은 62.55±8.54%, 임신과 달리기군은 111.52±8.16%, 그리고 임신과 수영군은 45.54±6.58%이었다. 본 연구결과 임신흰쥐의 GLUT-4 발현이 비임신흰쥐에 비해 유의하게 감소되었고, 임신흰쥐에서 달리기 운동은 GLUT-4 발현을 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다. 하지만 임신과 수영군의 GLUT-4 단백질 발현이 임신군에 비해 유의하게 감소된 것으로 나타났다.

Table 1. Plasma insulin and leptin levels in pregnant rats

Parameters/ Animal group	Blood glucose (mg/dl)	Plasma insulin (μ IU/mL)	Plasma leptin (μ L/L)
CG	112.11±9.02 ^a	0.43±0.10 ^a	3.68±0.16 ^a
PG	78.32±6.42	0.63±0.18	2.10±0.60
PR	77.15±7.26	0.52±0.16	2.90±0.16 ^b
PS	77.17±5.27	0.60±0.14	2.07±0.91

All values are mean \pm standard deviations(SD). ^a P < 0.05 compared to the pregnant group, the pregnant and running group, and the pregnant and swimming group. ^b P < 0.05 compared to the pregnant group. (CG) control group; (PG) pregnant group; (PR) pregnant and running group; and (PS) pregnant and swimming group.

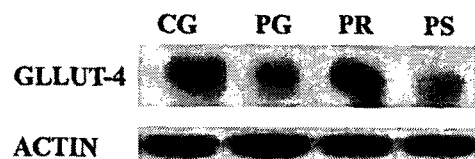


Fig. 1. Western blotting on expression of GLUT-4 protein in soleus muscles.

임신 중 운동이 골격근 VAMP-2 단백질 발현에 미치는 영향
 임신 흰쥐에서 트레드밀 달리기와 수영이 골격근의 VAMP-2 단백질 발현에 미치는 효과를 알아보기 위해 Western blotting를 실시하였다. 여기서 나타난 정성적 자료는 <Fig. 2>과 같은 발현량을 보였다.

이에 대한 <Fig. 3>에서의 정량적 분석결과 VAMP-2 단백질 발현은 비임신군의 VAMP-2 단백질 발현량을 100으로 하여 다른 집단과 백분율로 비교했을 때 임신군은 75.15±12.17%, 임신과 달리기군은 114.92±11.58%, 그리고 임신과 수영군은 29.90±6.22%이었다. 본 연구결과 VAMP-2 발현이 비임신흰쥐에 비해 임신흰쥐에서 유의하게 감소된 반면에 임신과 달리기군에서 유의하게 증가되는 것으로 나타났다. 하지만 임신과 수영군의 GLUT-4 단백질 발현은 유의하게 감소된 것으로 나타났다.

고 찰

본 연구에서 비임신 흰쥐에 비해 임신 흰쥐에서 혈중 인슐린은 유의하게 증가된 반면에, 렙틴 농도는 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. 게다가 임신 흰쥐에서 골격근의 GLUT-4와 VAMP-2 단백질 발현도 비임신 흰쥐에 비해 상당히 감소되는 것으로 나타났다. 이러한 결과들은 임신에 따른 당대사에 변화를 보여주는 것이다. 임신 흰쥐에서 운동의 효

과를 관찰한 본 연구결과 트레드밀 달리기 운동이 혈중 인슐린을 유의하게 감소시키면서 렙틴을 증가시켰고 GLUT-4와 VAMP-2 단백질 발현량도 유의하게 증가되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 임신에 따른 당대사의 변화가 달리기 운동을 통해 개선될 수 있음을 보여주는 것이다. 하지만 비체중부하 운동인 수영을 임신흰쥐에게 적용한 결과에서는 이러한 변인들에 유의한 변화를 미치지 못하는 것으로 나타났다. 일반적으로 수영으로 인한 당대사의 개선효과를 위해 1시간에서 3시간이 이용되고 있으나[51], 본 연구에서는 임신조건으로 인해 10분간만 실시하였는데 추후 수영시간에 대한 연구가 수행되어야 될 것으로 생각된다.

임신 중 췌장 β-세포에 급격한 세포분열이 발생하고, 글루코스에 의한 β-세포의 인슐린 분비역치가 낮아짐으로써 혈중 인슐린 농도가 상당히 증가하게 된다[40]. 태반 락토킨, 프로락틴, 성장호르몬이 β-세포 분열을 촉진시키며, 태반 락토킨은 또한 β-세포의 인슐린 분비를 촉진시키는 것으로 알려져 있다[4,22]. 임신 흰쥐에서 인슐린 농도를 측정한 본 연구결과 이전 연구들과 일치하게 인슐린 농도가 비임신 흰쥐보다 유의하게 높았고, 이것은 모체의 인슐린 저항성을 의미하는 것이다[25]. 이러한 인슐린 저항성은 산모의 건강뿐만 아니라 태아 성장에 이상을 초래하는 것으로 알려져 있다[8].

운동은 인슐린 민감도 개선을 위한 효과적인 자극원으로 알려져 있다. 이것은 운동을 통해 글루코스 생성의 억제, 글루코스 유입과 글리코젠 합성의 증가[43], 그리고 비만, 고지혈증, 혈액순환이 개선되기 때문이다[49]. 실제로 운동은 글루코스 자극에 의한 췌장 β-세포의 인슐린 분비를 감소시키는 효과를 지니고 있다[11]. 인슐린 저항성 또는 당뇨를 지닌 피험자들을 대상으로 한 연구에서도 운동은 인슐린 민감성을 향상시키는 것으로 알려져 있다[44,49]. 임신성 당뇨병을 지닌 산모에서도 운동은 인슐린 치료효과 만큼의 인슐린 저항성 개선효과가 보고된 바 있다[3,5]. Avery와 Walker[2]은 인슐린 저항성을 지닌 산모에서 30분간의 일회성 달리기 운동으로 혈당과 인슐린 수치 모두 유의하게 감소되어 고인슐린 혈증을 개선하는 효과를 보고하였다. 본 연구결과에서도 달리기 운동이 임신으로 인한 인슐린 농도의 증가를 완화시킬 수 있음을 확인할 수 있었다. 본 연구와 유사하게 임신흰쥐에서 달리기 운동의 효과를 조사했던 연구에서도 운동이 혈중 인슐린 농도를 감소시켜 인슐린 저항성을 거의 정상수준까지 개선시킴을 관찰하였다[31].

임신 중 렙틴분비의 변화로 인한 인슐린 신경전달의 손상이 골격근에서 인슐린에 의한 당 유입에 장애를 초래하는 것으로 알려져 있다. Szanto와 Kahn[50]은 렙틴이 인슐린 신호전달계에 관여함으로써 정상뿐만 아니라 임신 중에도 당대사 조절에 중요한 호르몬으로 작용할 수 있음을 보여주었다. 동물실험에서도 렙틴농도의 감소가 인슐린 결핍과 인슐린 저항성을 유발시킨바 있고[18], 반대로 렙틴발현 증가가 말

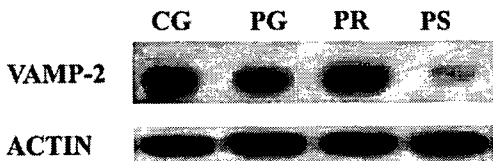


Fig. 2. Western blotting on expression of VAMP-2 protein in soleus muscles.

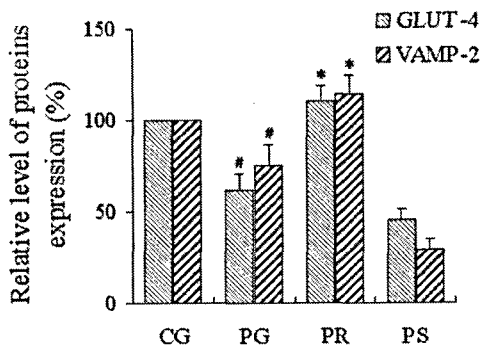


Fig. 3. Quantitative analysis on expression of GLUT-4 and VAMP-2 proteins in soleus muscle. The data are presented as the mean ± S.E.M. * represents p<.05 compared to PG and PS. # represents p<.05 compared to PS. (CG) Control group; (PG) Pregnant group; (PR) Pregnant and running; and (PS) Pregnant and swimming.

초조직에서 인슐린 민감성을 향상시킨 바 있다[13]. 이것은 본 연구의 임신흰쥐에서 관찰된 렙틴농도의 감소가 골격근의 인슐린 저항성과 관련되어 있음을 보여주는 것이다. Toyoda 등[52]도 흰쥐에서 임신 말기 골격근의 인슐린에 의한 당유입이 28%나 감소됨을 보고한 바 있다. 이러한 골격근의 인슐린 민감성의 손상은 당수용체 그리고 당수용체와 관련된 신호전달 장애와 관련된 것으로 알려져 있다[40]. Zisman 등[54]은 인슐린 민감성 손상이 GLUT-4와 밀접하게 연관되어 있음을 관찰하였고, 본 연구에서도 렙틴의 감소 그리고 인슐린 증가를 보인 모체의 골격근에서 GLUT-4 단백질 발현이 유의하게 감소된 것으로 나타났다. 하지만 인슐린 signaling을 향상시키는 것으로 알려진 달리기 운동을 임신흰쥐에게 적용한 결과 모체의 골격근에서 GLUT-4 단백질 발현이 유의하게 증가되는 것으로 나타났다. 운동은 렙틴과 인슐린의 민감성을 모두 향상시키는 것으로 알려져 있다[15]. 게다가 인슐린 저항성을 지닌 동물에서도 운동은 렙틴 생성의 감소를 거의 정상수준으로 개선시키고[9], 대뇌피질과 시상하부에서 인슐린과 렙틴의 작용을 향상시켜 골격근의 당대사를 개선시킨 바 있다[38].

골격근은 인슐린에 의한 당 처리의 주요한 조직으로 제 4형 당수용체인 GLUT-4 단백질이 인슐린에 의한 당 유입에 주요한 기전으로 알려져 있다[10]. 운동에 의한 당대사의 향상도 골격근의 인슐린 유발성 글루코스 동원 증가로 발생되게 된다[14]. 선행 연구들에 의하면, 운동에 의한 골격근 GLUT-4 mRNA 및 단백질의 발현이 증가함과 더불어 당의 세포막 이동과 투과성이 증가한다고 하였다[23]. 운동은 또한 정상뿐만 아니라 당뇨를 지닌 골격근에서도 GLUT-4 mRNA와 단백질 발현을 증가시킬 수 있다[10]. 이처럼 본 연구의 달리기 운동으로 인한 GLUT-4 발현의 증가가 결과적으로 임신으로 인한 혈중 인슐린 농도의 증가를 완화시키는 효과를 유도할 수 있는 배경으로 생각된다.

인슐린과 근축에 의한 GLUT-4 전위와 글루코스 흡수 기전은 서로 독립적인데, 인슐린에 의한 GLUT-4 전위 신호 기전은 분비된 인슐린이 insulin receptor(IR), IR substrate-1(IRS-1), phosphatidylinositol3-kinase PI3-kinase) phosphoinositide-dependent kinases(PDK), Akt/protein kinase B (Akt/PKB)에 이르는 일련의 하방경로의 활성화를 통해 GLUT-4를 세포막으로 전위시킨다. 하지만, 근수축에 의한 글루코스 수송은 인슐린 자극 경로와는 다른 것이라는 사실이 이 경로의 마지막 단계인 PKB 활성화에 대하여 억제 작용을 하는 wortmannin을 통한 실험에서 밝혀졌다. 즉, 근수축에 의한 PKB 활성이 wortmannin에 의해 억제되지만, 글루코스 수송에 대한 수축의 효과는 wortmannin에 의해 억제되지 않았다[29]. 근수축에 의한 GLUT-4 자극 경로는 근형질 세망(SR)에서 탈분극시 방출되는 Ca²⁺에 의한 calmodulin kinase(CAMK)와 대사 에너지의 조절인자인 AMP kinase

(AMPK), 그리고 Mitogen-activated protein kinase(MAPK) 등이 근수축에 의해 활성화되고, 최종적으로 GLUT-4의 전위를 통한 글루코스 흡수를 증가시키는 것으로 알려져 있다[19]. 이러한 기전적 원리를 고려해 볼 때, 인슐린 분비가 증가된 모체에서 GLUT-4 단백질 발현이 감소된 것은 인슐린의 자극에 대한 GLUT-4 전위 경로의 전체적인 활성이 감소되어 결국 GLUT-4 단백질 발현도 감소된 것으로 생각되며, 운동을 통해 인슐린 농도가 감소했음에도 GLUT-4 단백질 발현이 증가된 것은 인슐린 자극 경로와는 독립적으로 근수축 경로를 자극하여 GLUT-4 전위 과정의 활성을 유도함으로써 GLUT-4 단백질의 발현이 보다 증가한 것으로 생각된다.

VAMP-2는 GLUT-4 소포가 인슐린 자극에 의해 전위되어 세포막에 융합되는데 관여하는 SNARE 복합체로 세포막의 target SNARE인 syntaxin-4와 결합함으로써 GLUT-4 단백질을 세포막에 침투시켜 글루코스 흡수를 담당하게 된다[16]. GLUT-4 소포에 VAMP-2가 공유하는 비율은 Martin 등[33]이 GLUT-4 소포의 25% 만이 VAMP-2를 가지고 있다고 한 반면, Malide 등[32]은 두 단백질의 50%가 같은 소포를 공유한다고 보고하였는데, 이것은 실험 방법의 차이와 세포 균질화 과정에서 얻어진 소포의 차이에 기인한다고 하였다. 본 연구에서는 GLUT-4와 동일한 소포에 포함되어 GLUT-4의 세포막 전위에 관여하는 VAMP-2 단백질이 임신과 운동에 따라 어떻게 변화하는지를 조사한 결과 모체 골격근의 VAMP-2 단백질 발현은 상당히 감소되었지만, 달리기 운동에 의해 증가된 것으로 나타났다. 임신조건에서 운동에 따른 VAMP-2 단백질의 발현 양상을 보고한 연구는 거의 없었으며, Kristiansen 등[26]이 인간의 근육 골격근에서 운동으로 GLUT-4와 VAMP-2 단백질 발현의 증가와 두 단백질 간에 정적 상관이 있음을 보고하였다. 인슐린 저항성 동물에서도 운동수행이 골격근 GLUT-4와 VAMP-2 단백질 발현을 증가시킨 바 있다[37]. 이 연구들과 함께 본 연구 결과를 통해 운동에 따른 GLUT-4와 VAMP-2 단백질의 발현이 유의하게 증가하며 VAMP-2가 GLUT-4 함유 소포에 함께 결합되어 인슐린 혹은 근수축 자극에 의해 전위되어 세포막과의 융합에 이용된다는 SNARE 가설[33]을 간접적으로 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구를 통해 임신 흰쥐에서 달리기 운동이 당을 근조직으로 흡수하는 신호 전달 경로의 향상과 당수용체의 발현을 향상시킴으로써 인슐린 저항성을 개선시킬 수 있는 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 임신흰쥐에서 운동이 혈중 인슐린과 렙틴 농도, 그리고 골격근의 GLUT-4와 VAMP-2 단백질 발현에 변화를 조사하기 위하여 수행되었다. 본 연구에서 비임신 흰쥐에 비해 임신 흰쥐에서 혈중 인슐린 농도가 유의하게 증가되었고, 렙틴 농도는 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. 임신흰쥐

에게 달리기 운동을 적용한 결과 임신으로 증가된 인슐린 농도를 유의하게 감소시키면서 렙틴 농도의 감소를 억제시키는 것으로 나타났다. 골격근에서 GLUT-4와 VAMP-2 단백질 발현량을 조사한 결과 비임신 흰쥐에 비해 임신 흰쥐에서 이러한 단백질 발현이 유의하게 감소되었지만, 임신 중 달리기 운동을 경험한 흰쥐에서 GLUT-4와 VAMP-2 발현 모두 유의하게 증가되는 것으로 나타났다. 이와 같이 임신으로 인한 혈중 인슐린 및 렙틴의 변화가 골격근에서 당을 근조직으로 흡수하는 신호 전달 경로와 수송체의 발현 손상과 연관되어 있음을 보여주는 것이다. 하지만 임신 흰쥐에서 달리기 운동은 인슐린과 렙틴 농도의 변화를 완화시킴으로써 골격근의 GLUT-4와 VAMP-2 발현을 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2005년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2005-041-G00122).

참고 문헌

- Atawi, F. A., A. S. Warsy, Z. Babay and M. Addar. 2004. Leptin concentration during different stages of pregnancy. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* **31**, 211-216.
- Avery, M. D. and A. J. Walker. 2001. Acute effect of exercise on blood glucose and insulin levels in women with gestational diabetes. *J. Matern. Fetal. Med.* **10**, 52-58.
- Brankston, G. N., B. F. Mitchell, E. A. Ryan and N. B. Okun. 2004. Resistance exercise decreases the need for insulin in overweight women with gestational diabetes mellitus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **190**, 188-193.
- Brelje, T. C., D. W. Scharp, P. E. Lacy, L. Ogren, F. Talamantes, M. Robertson, H. G. Friesen and R. L. Sorenson. 1993. Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. *Endocrinology* **132**, 879-887.
- Bung, P., R. N. Artal, N. Khodiguian and S. Kjos. 1991. Exercise in gestational diabetes: An optional therapeutic approach?. *Diabetes* **40**, 182-185.
- Catalano, P. M., E. D. Tyzbir and R. R. Wolfe. 1993. Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subject and women with gestational diabetes. *Am. J. Physiol.* **264**, 60-67.
- Catalano, P. M., L. Huston, S. B. Amini and S. C. Kalhan. 1999. Longitudinal change in glucose metabolism during pregnancy in obese women with normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **180**, 903-916.
- Catalano, P. M., N. M. Drago and S. B. Amini. 1995. Maternal carbohydrate metabolism and its relationship to fetal growth and body composition. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **172**, 1464-1470.
- Cong, L. and J. Chen. 2001. Effect of exercise on leptin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Wei. Sheng. Yan. Jiu.* **30**, 158-159.
- Dela, F., T. Ploug, A. Handberg, L. N. Petersen, J. J. Larsen, K. J. Mikines and H. Galbo. 1994. Physical training increases muscle GLUT4 protein and mRNA in patients with NIDDM. *Diabetes* **43**, 862-865.
- Despres, J. P., M. C. Pouliot, S. Moorjani, A. Nadeau, A. Tremblay, P. J. Lupien, G. Theriault and C. Bouchard. 1991. Loss of abdominal fat and metabolic response to exercise training in obese women. *Am. J. Physiol.* **261**, 159-167.
- Di Cianni, G., R. Miccoli, L. Volpe, C. Lencioni and S. Del Prato. 2003. Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **19**, 259-270.
- Ebihara, K., Y. Ogawa, H. Masuzaki, M. Shintani, F. Miyayama, M. Aizawa-Abe, T. Hayashi, K. Hosoda, G. Inoue, Y. Yoshimasa, O. Gavrilova, M. L. Reitman and K. Nakao. 2001. Transgenic overexpression of leptin rescues insulin resistance and diabetes in a mouse model of lipotrophic diabetes. *Diabetes* **50**, 1440-1448.
- Etgen, G. J., J. T. Brozinick, H. Y. Kang and J. L. Ivy. 1993. Effects of exercise training on skeletal muscle glucose uptake and transport. *Am. J. Physiol.* **264**, 723-733.
- Flores, M. B., M. F. Fernandes, E. R. Ropelle, M. C. Faria, M. Ueno, L. A. Velloso, M. J. Saad and J. B. Carvalheira. 2006. Exercise improves insulin and leptin sensitivity in hypothalamus of Wistar rats. *Diabetes* **55**, 2554-2561.
- Foster, L. J. and A. Klip. 2000. Mechanism and regulation of GLUT-4 vesicle fusion in muscle and fat cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **279**, 877-890.
- Gorski, J., D. Hood, H. Kaciuba-Uscilko and R. L. Terjung. 1986. Effects of muscle stimulation in situ in pregnant rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* **55**, 390-394.
- Havel, P. J. 2002. Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin. *Curr. Opin. Lipidol.* **13**, 51-59.
- Hayashi, T., J. F. Wojtaszewski and L. J. Goodyear. 1997. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* **273**, 1039-1051.
- Host, H. H., P. A. Hansen, L. A. Nolte, M. M. Chen and J. O. Holloszy. 1998. Glycogen supercompensation masks the effect of a training-induced increase in GLUT-4 on muscle glucose transport. *J. Appl. Physiol.* **85**, 133-138.
- Ishihara, H., T. Asano, H. Katagiri, J. L. Lin, K. Tsukuda, K. Inukai, Y. Yazaki and Y. Oka. 1993. Expression of GLUT-4 and glucose transporter in unweighted soleus muscle of normal and STZ-induced diabetic rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **264**, 301-307.
- Kawai, M. and K. Kishi. 1997. In vitro studies of the stim-

- ulation of insulin secretion and B-cell proliferation by rat placental lactogen-II during pregnancy in rats. *J. Reprod. Fertil.* **109**, 145-152.
23. Kawanaka, K., I. Tabata, S. Katsuta and M. Higuchi. 1997. Changes in insulin-stimulated glucose transport and GLUT-4 protein in rat skeletal muscle after training. *J. Appl. Physiol.* **83**, 2043-2047.
 24. Kim, C. H., Y. H. Leem, I. H. Cho, S. C. Kim, S. S. Bang, J. Y. Cho and K. S. Lee. 2003. The effect of exercise training and catechins supplementation on skeletal muscle GLUT-4, VAMP-2 and Syntaxin-4 protein expression in obese Zucker rats. *Exercise Science* **12**, 633-678.
 25. Kirwan, J. P., S. Hauguel-De Mouzon, J. Lepercq, J. C. Challier, L. Huston-Presley, J. E. Friedman, S. C. Kalhan and P. M. Catalano. 2002. TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes* **51**, 2207-2213.
 26. Kristiansen, S., M. Hargreaves and E. A. Richter. 1996. Exercise-induced increase in glucose transport, GLUT-4, and VAMP-2 in plasma membrane from human muscle. *Am. J. Physiol.* **270**, 197-201.
 27. Kuo, C. H., D. G. Hunt, Z. Ding and J. L. Ivy. 1999. Effect of carbohydrate supplementation on postexercise GLUT-4 protein expression in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **87**, 2290-2295.
 28. Kuo, C. H., H. Hwang, M. C. Lee, A. L. Castle and J. L. Ivy. 2004. Role of insulin on exercise-induced GLUT-4 protein expression and glycogen supercompensation in rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **96**, 621-627.
 29. Lee, A. D., P. A. Hansen and J. O. Holloszy. 1995. Wortmannin inhibits insulin-stimulated but not contraction-stimulated glucose transport activity in skeletal muscle. *FEBS* **361**, 51-54.
 30. Lee, H. H., H. Kim, J. W. Lee, Y. S. Kim, H. Y. Yang, H. K. Chang, T. H. Lee, M. C. Shin, M. H. Lee, M. S. Shin, S. Park, S. Baek and C. J. Kim. 2005. Maternal swimming during pregnancy enhances short-term memory and neurogenesis in the hippocampus of rat pups. *Brain Dev.* **28**, 147-154.
 31. Lopez-Luna, P., M. A. Iglesias, C. Munoz and E. Herrera. 1998. Aerobic exercise during pregnancy reverts maternal insulin resistance in rats. *Med. Sci. Sports Exerc.* **30**, 1510-1514.
 32. Malide, D., N. K. Dwyer, D. J. Blanchette-Mackie and S. W. Cushman. 1997. Immunocytochemical Evidence that GLUT4 Resides in a Specialized Translocation Post-endosomal VAMP2- positive Compartment in Rat Adipose Cells in the Absence of Insulin. *J. Histochem. Cytochem.* **45**, 1083-1096.
 33. Martin, S., J. Tellam, C. Livingstone, J. W. Slot, G. W. Gould and D. E. James. 1996. The glucose transporter (GLUT-4) and vesicle-associated membrane protein-2 (VAMP-2) are segregated from recycling endosomes in insulin-sensitive cells. *J. Cell Biol.* **134**, 625-635.
 34. Masuzaki, H., Y. Ogawa, M. Aizawa-Abe, K. Hosoda, J. Suga, K. Ebihara, N. Satoh, H. Iwai, G. Inoue, H. Nishimura, Y. Yoshimasa and K. Nakao. 1999. Glucose metabolism and insulin sensitivity in transgenic mice overexpressing leptin with lethal yellow agouti mutation: usefulness of leptin for the treatment of obesity-associated diabetes. *Diabetes* **48**, 1615-1622.
 35. Munoz, C., P. Lopez-Luna and E. Herrera. 1999. Treadmill training enhances glucose tolerance more in pregnant than in virgin rats. *Biol. Neonate.* **75**, 337-342.
 36. Ogawa, Y., H. Masuzaki, K. Hosoda, M. Aizawa-Abe, J. Suga, M. Suda, K. Ebihara, H. Iwai, N. Matsuoka, N. Satoh, H. Odaka, H. Kasuga, Y. Fujisawa, G. Inoue, H. Nishimura, Y. Yoshimasa and K. Nakao. 1999. Increased glucose metabolism and insulin sensitivity in transgenic skinny mice overexpressing leptin. *Diabetes* **48**, 1822-1829.
 37. Park, S. T., T. B. Seo, S. S. Baek, Y. S. Chung, M. J. Oh, J. O. Kim, H. H. Lee, I. G. Jeong and J. H. Yoon. 2005. The effect of running exercise training on GLUT4 and VAMP2 protein expression in muscle of streptozotocin-induced diabetes rats. *Exercise Science* **14**, 545-554.
 38. Park, S., J. S. Jang, D. W. Jun and S. M. Hong. 2005. Exercise enhances insulin and leptin signaling in the cerebral cortex and hypothalamus during dexamethasone-induced stress in diabetic rats. *Neuroendocrinology* **82**, 282-293.
 39. Parsons, J. A., A. Bartke and R. L. Sorenson. 1995. Number and size of islets of Langerhans in pregnant, human growth hormone-expressing transgenic, and pituitary dwarf mice: effect of lactogenic hormones. *Endocrinology* **136**, 2013-2021.
 40. Parsons, J. A., T. C. Brelje and R. L. Sorenson. 1992. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology* **130**, 1459-1466.
 41. Randhawa, V. K., P. J. Bilan, Z. A. Khayat, N. Daneman, Z. Liu, T. Ramlal, A. Volchuk, X. R. Peng, T. Coppola, R. Regazzi, W. S. Trimble and A. Klip. 2000. VAMP2, but not VAMP3/cellubrevin, mediates insulin-dependent incorporation of GLUT4 into the plasma membrane of L6 myoblasts. *Mol. Biol. Cell.* **11**, 2403-2417.
 42. Rea, S. and D. E. James. 1997. Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. *Diabetes* **46**, 1667-1677.
 43. Rodnick, K. J., W. L. Haskell, A. L. Swislocki, J. E. Foley and G. M. Reaven. 1987. Improved insulin action in muscle, liver, and adipose tissue in physically trained human subjects. *Am. J. Physiol.* **253**, 489-495.
 44. Ronnema, T., K. Mattila, A. Lehtonen and V. Kallio. 1986. A controlled randomized study on the effect of long-term physical exercise on the metabolic control in type 2 diabetic patients. *Acta. Med. Scand.* **220**, 219-224.
 45. Ryan, E. A., M. J. O'Sullivan and J. S. Skyler. 1985. Insulin action during pregnancy. Studies with the euglycemic clamp technique. *Diabetes* **34**, 380-389.
 46. Salvatores, M., G. Gennarelli, G. Menato, M. Massobrio and M. 2006. Leptin as a possible marker of augmented

- metabolic risk during pregnancy. *Minerva. Ginecol.* **58**, 1-10.
47. Shi, Z. Q., A. Nelson, L. Whitcomb, J. Wang and A. M. Cohen. 1998. Intracerebroventricular administration of leptin markedly enhances insulin sensitivity and systemic glucose utilization in conscious rats. *Metabolism* **47**, 1274-1280.
 48. Sivan, E., X. Chen, C. J. Homko, E. A. Reece and G. Boden. 1997. Longitudinal study of carbohydrate metabolism in healthy obese pregnant women. *Diabetes Care* **20**, 1470-1475.
 49. Steinberg, G. R., A. C. Smith, S. Wormald, P. Malenfant, C. Collier and D. J. Dyck. 2004. Endurance training partially reverses dietary-induced leptin resistance in rodent skeletal muscle. *Am. J. Endo. Metab.* **286**, 57-63.
 50. Szanto, I. and C. R. Kahn. 2000. Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 2355-2360.
 51. Thomas, H. R., T. B. Joseph, M. L. Lisa and W. C. Samuel. 2000. Transient enhancement of GLUT-4 levels in rat epitrochlearis muscle after exercise training. *J. Appl. Physiol.* **88**, 2240-2245.
 52. Toyoda, N., T. Deguchi, K. Murata, T. Yamamoto and Y. Sugiyama. 1991. Postbinding insulin resistance around parturition in the isolated rat epitrochlearis muscle. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **165**, 1475-1480.
 53. Treadway, J. L. & J. C. Young. 1989. Decreased glucose uptake in the fetus after maternal exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* **21**, 140-145.
 54. Zisman, A., O. D. Peroni, E. D. Abel, M. D. Michael, F. Mauvais-Jarvis, B. B. Lowell, J. F. P. Wojtaszewski, M. F. Hirshman, A. Virkamaki and L. Goodyear. 2000. Targets disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat. Med.* **6**, 924-928.