

# 紅景天이 강제유영 흰쥐의 항피로 및 시상하부 IEGs 발현에 미치는 영향

류사현<sup>1</sup>, 김선여<sup>1</sup>, 정혁상<sup>2</sup>, 손낙원<sup>1</sup>, 손영주<sup>3\*</sup>

1: 경희대학교 동서의학대학원 신경과학 및 뇌질환전공 2: 경희대학교 한의과대학 해부학교실, 한의학연구소  
3: 상지대학교 한의과대학 부인과학교실

## Effects of *Rhodiola Rosea* on Anti-Fatigue and Hypothalamic IEGs Expressions of Forced Swimming Rats

Sa-Hyun Ryu<sup>1</sup>, Sun Yeou Kim<sup>1</sup>, Hyuk-Sang Jung<sup>2</sup>, Nak-Won Sohn<sup>1</sup>, Youngjoo Sohn<sup>3\*</sup>

1: Dept. of Neuroscience and Brain Disease, Graduate School of East-West Medicine, Kyung Hee University  
2: Dept. of Anatomy & Institute of Oriental Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University  
3: Dept. of Gynecology, College of Oriental Medicine, Sangji University

### ABSTRACT

**Objectives** : In this study the authors investigated effects of the ethanolic extract of *Rhodiola Rosea* (HKC) on fatigue and hypothalamic IEG expression in rat forced swimming (FS) model.

**Methods** : Sprague-Dawley rats were administered HKC extract (25 mg/100g, p.o.) for 3 days prior to FS, some rats underwent 10 min FS and others exhaustive forced swimming (EFS). In addition, other rats were administered extract at different times after EFS over 3 consecutive days.

**Results** : When HKC administered before 10 mins of FS, serum lactate dehydrogenase (LDH) and creatine phosphokinase (CPK) activities were significantly lower than control group. When HKC administered prior to EFS, blood lactate was significantly lower versus control group. When HKC was administered after EFS, blood lactate (at 6 and 24 hours after EFS) were significantly lower and serum LDH, CPK activities (at 24 hours after EFS) were significantly lower versus control group. When HKC was administered after EFS, c-Fos positive neurons in hypothalamic periventricular area (PVA), medial part (mPVN) and anterior hypothalamic nucleus caudal part (AHC) were significantly lower at 24 hours after EFS than in control group. HSP-72 positive neuron numbers in hypothalamus were significantly lower at 24 hours after EFS than in control group. Finally, when HKC was administered prior to 10 mins FS, HIF-1 $\alpha$  expression in the gastrocnemius muscle was significantly increased.

**Conclusions** : These results suggest that HKC extract has an anti-fatigue effect, and it reduces neuronal cell stress responses induced by physical stress by having a beneficial effect on lactate metabolism.

**Key words** : *Rhodiola Rosea*; LDH; CPK; c-Fos; HSP-72; HIF-1 $\alpha$

\* 교신저자 : 손영주, 강원도 원주시 우산동 283 상지대학교 한의과대학 부인과학교실  
· Tel : 033-741-9303 · E-mail : q701@chollian.net  
· 접수 : 2008년 9월 25일 · 수정 : 2008년 12월 12일 · 채택 : 2008년 12월 22일

## 서론

홍경천(紅景天, *Rhodiola Rosea*, "golden root")은 유럽과 아시아의 고산지대에 널리 분포되어 서식하는 식물로서, 신경계통의 자극, 우울증의 감소, 작업능력의 향상, 피로회복, 고산병의 예방 등에 유효한 전통 약물로 동유럽과 아시아에서 오래전부터 사용되어 왔다.<sup>1,2)</sup>

1970년대부터 러시아의 연구자들이 홍경천의 각종 화학적, 생물학적 및 신체적 스트레스인자들에 대한 저항력의 증강 효능을 연구하였으며, 그 결과 홍경천을 다양한 생리기능의 변화에 대하여 유효한 효능을 발휘하는 고려인삼이나 가시오가피와 같은 adaptogen의 일종으로 설명하고 있다<sup>3)</sup>. 최근에는 홍경천의 항산화 효능<sup>4)</sup>, 신경세포손상 보호<sup>5)</sup> 등 다양한 효능이 보고된 바 있다.

중추신경계에서는 다양한 자극이 IEGs 발현을 유발시키는데, 정상적인 상태에서는 IEGs 발현이 일반적으로 아주 낮고, 생리적인 자극일 경우 자극에 관련된 뇌부위에서만 IEGs 발현의 증가가 나타난다<sup>6)</sup>. 한편 병리적 조건, 즉 경련이나 허혈과 같은 조건은 중추신경계의 광범위한 부위에서 IEGs 발현의 증가를 유발하며 직접적으로 손상 받은 부위는 물론 손상부위 바깥영역에서도 발현이 증가된다<sup>7)</sup>. 그러므로 IEGs는 다양한 스트레스에 대한 신경-내분비계통 세포들의 반응을 관찰하는 매우 유용한 지표이다<sup>8)</sup>. Heat-shock protein (HSP)은 열충격, 허혈 또는 각종 스트레스 등에 대한 반응으로 그 발현이 증가된다<sup>9)</sup>.

골격근의 운동능력과 피로회복은 근육수축에 필요한 에너지대사와 밀접한 관련이 있다. Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)은 저산소 상태에서 특이적으로 발현되는 전사인자(transcription factor)로서 근육내 산소 대사 조절에 중요한 역할을 담당한다<sup>10)</sup>. 운동시 골격근세포들은 적절한 에너지공급을 위해서 산소요구량이 급격히 증가한다. 이때 근육세포들의 구조와 대사가 이러한 산소요구량을 충족시키지 못하면 근육세포에는 일시적인 저산소상태(hypoxia)가 유발되어 무산소대사(anaerobic metabolism)에 의한 에너지공급 상태가 된다<sup>11)</sup>. 무산소대사에 의한 지속적인 에너지공급은 lactate의 생성과 축적으로 인하여 근육피로를 유발한다는 것은 잘 알려진 사실이다<sup>12)</sup>. 이때 HIF-1은 저산소상태의 근육에서 발현되어 2차적으로 적혈구 생성인자인 erythropoietin,<sup>13)</sup> 모세혈관 생성인자인 vascular endothelial growth factor (VEGF)<sup>14)</sup>, 포도당의 이동과 대사에 관여하는 glucose transporter-1과

glycolytic genes<sup>15)</sup> 등의 발현을 촉진하여 근육내 저산소상태의 개선과 적응력을 높이는데 중추적인 역할을 한다.

본 연구에서는 실험동물을 사용하여 홍경천의 운동스트레스에 대한 항피로 효과와 운동스트레스에 의한 시상하부 신경핵의 immediate-early genes (IEGs) 발현 및 비복근에서의 HIF-1 $\alpha$ 에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다. 흰쥐에게 강제유영(forced swimming, FS)을 실시하여 운동스트레스를 부과하고, 강제유영 이전과 이후에 각각 홍경천 에탄올추출물을 경구투여한 다음 혈중 lactate 함량, 혈청 lactate dehydrogenase (LDH) 및 creatine phosphokinase (CPK) 활성도를 생화학적 방법으로 측정하였으며, 시상하부 신경핵들에서 IEGs인 c-Fos와 heat shock protein (HSP)-72가 발현된 신경세포를, 또한 비복근에서 발현되는 HIF-1 $\alpha$  양성반응 세포 수의 변화를 면역조직화학염색을 통하여 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

실험동물은 바이오지노믹스(주)에서 구입한 12주령, 약 280g 전후의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 흰쥐는 온도(21-23°C), 습도 (40-60%), 조명(12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균음수와 사료가 자유롭게 공급되었으며, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

### 2. 약물의 조제 및 투여

본 실험에 사용한 약물은 홍경천(紅景天, *Rhodiola Rosea*)으로, 조말한 홍경천 300 g을 2,000 ml의 에탄올에서 5일간 추출하고, 추출액을 rotary evaporator로 감압 농축한 후 동결건조하여 112.5 g의 에탄올추출액기스를 얻었다. 실험동물에의 투여량은 건조 홍경천 4 g에 대한 체중비례로 계산하여 체중 100g 당 25.0 mg을 1회 경구투여량으로 하였다.

### 3. 강제유영의 부여

체중의 5%인 약 14 g의 무게추를 꼬리에 매단 흰쥐를 온도(23 $\pm$ 1°C)를 가득 채운 원통형 스테인레스 수조(직경 90 cm, 높이 32 cm)에 넣어 강제유영을 시켰다<sup>16)</sup>.

#### 4. 실험군의 구분

홍경천 에탄올추출물(HKC)을 강제유영 이전에 투여한 실험(Pre-Treat)과 이후에 투여한 실험(Post-Treat)으로 구분하였다. Pre-Treat 실험에서는 강제유영 실시 이전에 1일 1회 3일간 HKC를 경구 투여한 다음 마지막 투여 3시간 후에 10분간 강제유영(10 mins swimming)을 부여한 군과 흰쥐의 머리가 3초 이상 물속에 잠기기를 3회 할 때까지 최대한의 강제유영(고강도유영, exhaustive swimming)을 부여한 군으로 나누었으며, 각각 HKC를 투여하지 않은 대조군과 비교하였다. Post-Treat 실험에서는 3일간 1일 1회씩 고강도유영을 부여한 다음 마지막 고강도유영 이후 3시간에 HKC를 1회 경구투여한 군(after 6 hrs)과 고강도유영 이후 3시간과 21시간에 2회 경구 투여한 군(after 24 hrs)으로 나누었으며, HKC를 투여하지 않은 대조군과 각각 비교하였다.

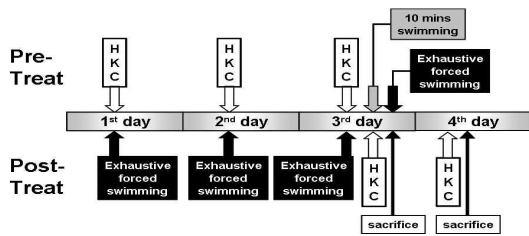


Fig 1. Schematic diagram of experimental schedule

#### 5. 혈액의 채취

Pre-Treat 실험에서는 10분간 유영 및 고강도유영 1시간 후에, Post-Treat 실험에서는 HKC 투여 3시간 후에 실험동물을 pentobarbital sodium으로 마취한 다음 개흉하고, 심장으로부터 약 3 ml의 혈액을 채취하였다. 곧바로 혈청분리관에 담고 원심분리기로 4℃, 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다.

#### 6. 혈액지표의 측정

분리된 혈청으로부터 lactate 함량과 LDH 및 CPK 활성도를 각각의 전용 측정kit (아산제약, 한국)를 사용하여 생화학적으로 측정하였다.

#### 7. 뇌조직의 처리

Post-Treat 실험의 24시간군에서 실험동물을 pentobarbital

sodium으로 마취한 다음 개흉하고 심장을 통하여 0.05M phosphate buffered saline (PBS)과 4% paraformaldehyde로 충분히 관류하였다. 이후 뇌를 적출한 다음 동일 용액으로 24시간 정도 post-fixation 하고, sucrose 용액에 담귀 침전시켰다. 그리고 뇌를 -40℃의 dry ice- isophentan 용액으로 동결시키고 cryocut으로 50 μm 두께의 관상절편으로 제작하여 염색에 사용하였다.

#### 8. c-Fos 및 HSP-72의 면역조직화학염색

뇌조직 절편을 0.05M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 10-15분 정도 반응시킨 다음 다시 3회 씻어낸 뒤 10% normal horse serum (Vectastain)과 bovine serum albumin (Sigma)을 PBS에 섞은 blocking solution에 한 시간 정도 반응시켰다. 이후 3회 씻어 낸 후, primary antibody를 처리하였다. Primary antibody는 c-Fos (anti-mouse, 1 : 200, Oncogene Science, USA)와 HSP-72 (anti-mouse, 1 : 200, Oncogene Science, USA)으로, PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4℃에서 12시간 반응시켰다<sup>17)</sup>. 이후 조직을 PBS로 씻어내고, abidin-biotin immunoperoxidase의 방법(ABC Vectastain Kit)에 따라 각각 한 시간씩 반응시켰다. 다음 NiCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (Sigma, USA)를 섞은 diaminobenzidine-tetrachloride (Sigma, USA)에서 5-10분간 발색 반응시키고, 조직을 poly-L-lysine 코팅된 슬라이드에 붙인 후 2-3시간 건조시킨 다음 탈수, 봉합하여 조직표본을 제작하였다.

#### 9. 근육조직의 채취

Pre-Treat 실험의 10분간 강제유영군과 Post-Treat 실험의 24시간군에서 실험동물을 pentobarbital sodium으로 마취한 다음 하퇴 후방의 피부를 제거하고 비복근(gastrocnemius)을 분리 채취하였다. 즉시 -40℃의 dry ice-isophentan 용액으로 동결시켰다.

#### 10. 근육조직 HIF-1α의 역조직화학염색

근육조직을 cryocut을 사용하여 20 μm 두께의 절편으로 제작한 다음 poly-L-lysine 코팅된 슬라이드에 붙인 후 염색에 사용하였다. 절편을 0.05M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 10-15분 정도 반응시킨 다음 다시 3회 씻어낸 뒤 10% normal horse serum (Vectastain)과 bovine serum albumin (Sigma)

를 PBS에 섞은 blocking solution에 한 시간 정도 반응시켰다. 이후 3회 씻어 낸 후, primary antibody를 처리하였다. Primary antibody는 HIF-1 $\alpha$  (anti-mouse, 1:500, Novus Biological, USA)로, PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 반응시켰다<sup>18)</sup>. 이후 조직을 PBS로 씻어내고, abidin-biotin immuno-peroxidase의 방법(ABC Vectastain Kit)에 따라 각각 한 시간씩 반응시켰다. 다음 NiCl $_2$ ·H $_2$ O (Sigma, USA)를 섞은 diaminobenzidine-tetrachloride (Sigma, USA)에서 5-10분간 발색 반응시키고 건조시킨 다음 탈수, 봉합하여 조직표본을 제작하였다.

### 11. 면역조직화학염색 양성반응 세포 수의 관찰

시상하부 신경핵에서 c-Fos, HSP-72 및 HIF-1 $\alpha$  발현의 변화를 정량적으로 관찰하기 위하여, 면역조직화학적으로 염색된 뇌조직의 영상을 CCD 카메라를 통하여 영상분석시스템에 저장하였다. c-Fos, HSP-72 발현은 hypothalamic periventricular area (PVA), hypothalamic paraventricular nucleus posterior part (pPVN)와 medial part (mPVN), anterior hypothalamic nucleus caudal part (AHC) 등 시상하부 신경핵에서, HIF-1 $\alpha$  양성반응 세포수의 관찰은 40개의 근섬유 주위에 발현된 양성반응 세포수를 'Image J' software를 사용하여 측정하였다<sup>19)</sup>.

## 실험성적

### 1. 혈중 lactate 함량의 변화

Pre-Treat 실험에서, 강제유영을 10분간 실시한 FS군은 8.3 $\pm$ 0.8 mMol/L이었으며, 강제유영 이전에 홍경천 에탄올추출물을 3일간 투여한 다음 10분간 강제유영을 실시한 FS+HKC군은 6.5 $\pm$ 0.6 mMol/L로 두 군 간에 유의한 차이가 없었다(Table 1). 고강도유영을 실시한 FS군은 6.7 $\pm$ 1.2 mMol/L이었으며, 강제유영 이전에 홍경천 에탄올추출물을 3일간 투여한 다음 고강도유영을 실시한 FS+HKC군은 3.3 $\pm$ 0.6 mMol/L로 FS군에 비하여 P<0.05의 유의성 있는 혈청 lactate 함량의 감소를 나타내었다(Table 1).

Post-Treat 실험에서, 3일간 고강도유영을 실시한 다음 홍경천 에탄올추출물을 투여하지 않은 FS군은 6시간과 24시간 후에 각각 16.7 $\pm$ 1.7 mMol/L 및 12.2 $\pm$ 1.9 mMol/L 이었으며, 홍경천 에탄올추출물을 투여한 FS+

HKC군은 6시간과 24시간 후에 각각 11.6 $\pm$ 1.4 mMol/L 및 6.9 $\pm$ 0.9 mMol/L로 모두 FS군에 비하여 P<0.05의 유의성 있는 혈청 lactate 함량의 감소를 나타내었다 (Table 1).

Table 1. Effect of HKC on Serum Lactate Concentration of Forced Swimming Rats

		(mMol/L)	
		10 minute swimming	exhaustive swimming
Pre-Treat	FS	8.3 $\pm$ 0.8	6.7 $\pm$ 1.2
	FS+HKC	6.5 $\pm$ 0.6	3.3 $\pm$ 0.6*
		after 6 hrs	after 24 hrs
Post-Treat	FS	16.8 $\pm$ 1.7	12.2 $\pm$ 1.9
	FS+HKC	11.6 $\pm$ 1.4*	6.9 $\pm$ 0.9*

FS: group exercised with forced swimming.

FS+HKC: group exercised with forced swimming and treatment of *Rhodiola rosea* ethanol extract.

Data presented mean  $\pm$  standard error (\*; P < 0.05).

### 2. 혈중 LDH 활성도의 변화

Pre-Treat 실험에서, 강제유영을 10분간 실시한 FS군은 2603.2 $\pm$ 232.1 IU/L이었으며, 강제유영 이전에 홍경천 에탄올추출물을 3일간 투여한 다음 10분간 강제유영을 실시한 FS+HKC군은 1905.3 $\pm$ 171.3 IU/L로 FS군에 비하여 P<0.05의 유의성 있는 혈청 LDH 활성도의 감소를 나타내었다(Table 2). 고강도유영을 실시한 FS군은 2889.2 $\pm$ 315.8 IU/L이었으며, 강제유영 이전에 홍경천 에탄올추출물을 3일간 투여한 다음 고강도유영을 실시한 FS+HKC군은 2515.3 $\pm$ 212.6 IU/L로 두 군 간에 유의한 차이가 없었다(Table 2).

Post-Treat 실험에서, 3일간 고강도유영을 실시한 다음 홍경천 에탄올추출물을 투여하지 않은 FS군은 6시간과 24시간 후에 각각 1495.8 $\pm$ 109.7 IU/L 및 3045.5 $\pm$ 189.5 IU/L이었으며, 홍경천 에탄올추출물을

Table 2. Effect of HKC on Serum LDH Activity of Forced Swimming Rats

		(IU/L)	
		10 minute swimming	exhaustive swimming
Pre-Treat	FS	2603.2 $\pm$ 232.1	2889.2 $\pm$ 315.8
	FS+HKC	1905.3 $\pm$ 171.3*	2515.3 $\pm$ 212.6
		after 6 hrs	after 24 hrs
Post-Treat	FS	1495.8 $\pm$ 109.7	3045.5 $\pm$ 189.5
	FS+HKC	1380.2 $\pm$ 394.2	2469.3 $\pm$ 159.9*

FS: group exercised with forced swimming.

FS+HKC: group exercised with forced swimming and treatment of *Rhodiola rosea* ethanol extract.

Data presented mean  $\pm$  standard error (\*; P < 0.05).

투여한 FS+HKC군은 6시간과 24시간 후에 각각 1380.2±394.2 IU/L 및 2469.3±159.9 IU/L로 FS군에 비하여 24시간 후에 P < 0.05의 유의성 있는 혈청 LDH 활성도의 감소를 나타내었다 (Table 2).

### 3. 혈중 CPK 활성도의 변화

Pre-Treat 실험에서, 강제유영을 10분간 실시한 FS군은 1644.2±109.9 IU/L이었으며, 강제유영 이전에 홍경천 에탄올추출물을 3일간 투여한 다음 10분간 강제유영을 실시한 FS+HKC군은 1300.2±94.9 IU/L로 FS군에 비하여 P<0.05의 유의성 있는 혈청 CPK 활성도의 감소를 나타내었다(Table 3). 고강도유영을 실시한 FS군은 1726.0±138.2 IU/L이었으며, 강제유영 이전에 홍경천 에탄올추출물을 3일간 투여한 다음 고강도유영을 실시한 FS+HKC군은 1565.0± 89.0 IU/L로 두 군 간에 유의한 차이가 없었다(Table 3).

Table 3. Effect of HKC on Serum CPK Activity of Forced Swimming Rats (IU/L)

		(IU/L)	
		10 minute swimming	exhaustive swimming
Pre-Treat	FS	1644.2±109.9	1726.0±138.2
	FS+HKC	1300.2±94.9*	1565.0±89.0
		after 6 hrs	after 24 hrs
Post-Treat	FS	938.3±44.7	1382.3±43.4
	FS+HKC	803.0±62.6	1015.3±135.6*

FS: group exercised with forced swimming.  
 FS+HKC: group exercised with forced swimming and treatment of *Rhodiola rosea* ethanol extract.  
 Data presented mean ± standard error (\*; P < 0.05).

Post-Treat 실험에서, 3일간 고강도유영을 실시한 다음 홍경천 에탄올추출물을 투여하지 않은 FS군은 6시간과 24시간 후에 각각 938.3±44.7 IU/L 및 1382.3±43.4 IU/L이었으며, 홍경천 에탄올추출물을 투여한 FS+HKC군은 6시간과 24시간 후에 각각 803.0±62.6 IU/L 및 1015.3±135.6 IU/L로 FS군에 비하여 24시간 후에만 P<0.05의 유의성 있는 혈청 CPK 활성도의 감소를 나타내었다 (Table 3).

### 4. 시상하부에서 c-Fos 양성반응 신경세포 수의 변화

Post-Treat 실험 24시간군에서 c-Fos 양성반응

신경세포 수를 측정한바 강제유영을 부여하지 않은 정상군은 PVA에서 11.5±1.0개, pPVN에서 1.2±0.5개, mPVN에서 0.7±0.5개 및 AHC에서 0.3±0.2개가 관찰되었다(Fig. 2A, 3A). 3일간 고강도유영을 실시한 다음 홍경천 에탄올추출물을 투여하지 않은 FS군은 PVA에서 44.5±3.3개, pPVN에서 35.2±4.5개, mPVN에서 50.7±4.6개 및 AHC에서 63.8±3.4개가 관찰되어 현저한 c-Fos 양성반응 신경세포의 증가가 관찰되었다(Fig. 2A, 3A). 홍경천 에탄올추출물을 투여한 FS+HKC군은 PVA에서 22.8±3.1개, pPVN에서 24.5±2.5개, mPVN에서 10.8±2.8개 및 AHC에서 24.3±2.3개가 관찰되어 FS군에 비하여 pPVN을 제외한 PVA, mPVN 및 AHC에서 P<0.001의 유의한 c-Fos 양성반응 신경세포의 감소가 관찰되었다(Fig. 2A, 3A).

### 5. 시상하부에서 HSP-72 양성반응 신경세포 수의 변화

Post-Treat 실험 24시간군에서 HSP-72 양성반응 신경세포 수를 측정한 바 강제유영을 부여하지 않은 정상군에서는 관찰되지 않았고, 3일간 고강도유영을 실시한 다음 홍경천 에탄올추출물을 투여하지 않은 FS군은 12.2±1.7개가 관찰되었다(Fig. 2B, 3B). 홍경천 에탄올추출물을 투여한 FS+HKC군은 4.7±0.8개가 관찰되어 FS군에 비하여 P<0.01의 유의한 HSP-72 양성반응 신경세포의 감소가 관찰되었다 (Fig. 2B, 3B).

### 6. 근육조직 HIF-1α 양성반응 세포수의 변화

Pre-Treat 실험에서, 강제유영을 10분간 실시한 FS군의 비복근에는 53.7±3.9개가 관찰되었으며, 강제유영 이전에 홍경천엑기스를 3일간 투여한 다음 10분간 강제유영을 실시한 FS+HKC군의 비복근에는 66.8±4.0개가 관찰되어 FS군에 비하여 P<0.05의 유의성 있는 HIF-1α 양성반응 세포수의 증가를 나타내었다(Fig. 4, 5).

Post-Treat 실험에서, 3일간 고강도유영을 실시한 다음 홍경천엑기스를 투여하지 않은 FS군은 24시간 후에 103.7±10.1개가 관찰되었고, 홍경천엑기스를 투여한 FS+HKC군은 24시간 후에 94.5±10.7 개가 관찰되어 두 군 간에 유의한 차이가 없었다(Fig. 4, 5).

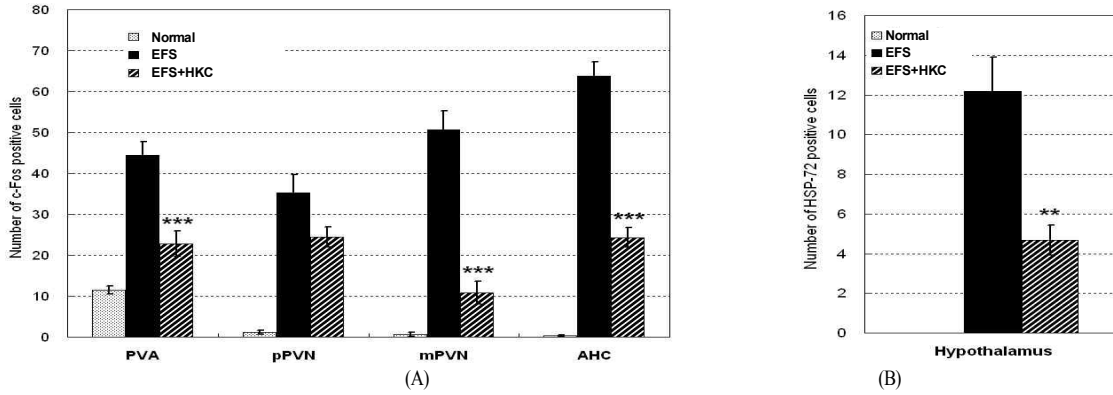


Fig. 2. Number of c-Fos (A) and HSP-72 (B) positive cells in hypothalamic nuclei at 24 hours after forced swimming (FS) and HKC treatment in rats

(A) HKC treatment produced significant decrease of c-Fos positive cells in PVA, mPVN, and AHC after FS (\*\*\*;  $P < 0.001$ ). (B) HKC treatment produced significant decrease of HSP-72 positive cells in hypothalamus after FS (\*\*;  $P < 0.01$ ).

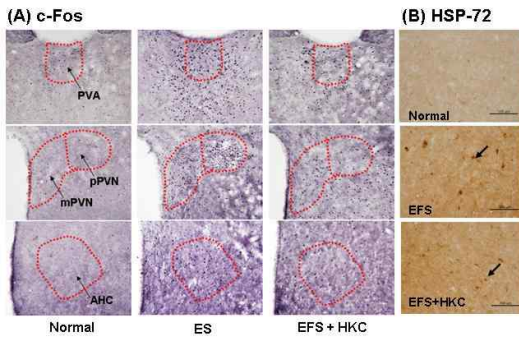


Fig. 3. Immunohistochemical sections of c-Fos (A) and HSP-72 (B) positive cells in hypothalamic nuclei at 24 hours after forced swimming (FS) and HKC treatment in rats

(A) Red lines indicate boundaries of each hypothalamic nuclei. HKC treatment produced significant decrease of c-Fos positive cells in PVA, mPVN, and AHC after FS. (B) HKC treatment produced significant decrease of HSP-72 positive cells in hypothalamus after FS.

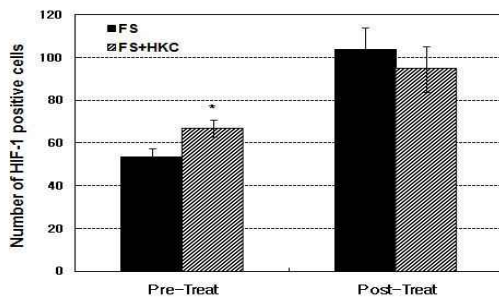


Fig. 4. Number of HIF-1α positive cells in Gastrocnemius following forced swimming (FS) and HKC treatment in rats

HKC treatment produced significant increase of HIF-1α positive cells in case of Pre-Treat (\*;  $P < 0.05$ ).

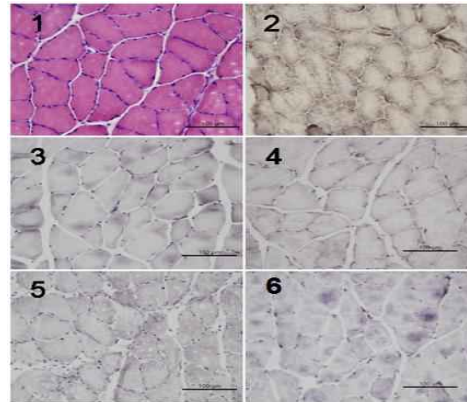


Fig. 5. HIF-1α immunoreacted sections of Gastrocnemius of forced swimming (FS) and HKC treated rats

Section 1, H&E staining; section 2, negative control against HIF-1α; section 3, FS group of Pre-Treat; section 4, FS+HKC group of Pre-Treat; section 5, FS group of Post-Treat; section 6, FS+HKC group of Post-Treat.

## 고찰

홍경천은 각종 화학적, 생물학적 및 신체적 스트레스인자들에 대한 저항력을 증강시키는 adaptogen의 일종으로 설명하고 있다<sup>1)</sup>. Adaptogen이란 러시아의 과학자 Lazarev에 의하여 창안된 용어이며, Brekhman과 Dardymov가 각종 화학적, 생물학적 및 신체적 스트레스인자들에 대한 저항력 증강과 같이 생명체에 비특이적인 반응을 나타내고, 각종 스트레스인자에 의한 생리적 평형의 이상에 대하여 방향에 상관없는 생리적

평형의 회복 효과를 가지며, 정상적인 생체 기능에 대해서는 큰 영향을 발휘하지 않는 물질들을 adaptogen의 개념으로 규정하였다<sup>20)</sup>. Adaptogen이란 용어의 사용유무와 상관없이, 고려인삼이나 가시오가피와 같은 한약물을 포함하여 많은 한약물들의 작용기전이 이러한 개념들로 설명 가능한 부분이 있는 것으로 생각된다.

홍경천으로부터 분리된 생리활성물질들은 organic acids, flavonoids, tannins 및 phenolic glycosides를 포함하여 12종의 신물질이 보고되었다<sup>22)</sup>. 특히 어택토젠의 효능을 나타내는 성분으로 p-tyrosol과 phenolic glycoside rhodiolide가 알려져 있으며, p-tyrosol은 산화적 손상의 억제효능과 5-lipoxygenase 억제효능이 보고 되었고, rhodiolide는 다른 식물에서도 발견되는 salidroside의 일종으로 rhodiolin, rosin, rosavin, rosarin, rosiridin 등과 함께 다양한 치료효능을 가지고 있는 것으로 보고되어 있다<sup>22)</sup>.

본 연구에서는 우선 홍경천의 에탄올추출물을 사용하여 운동스트레스 부과 이전 또는 이후에 홍경천을 투여할 경우 운동스트레스를 감소시키는 예방효과와 항피로 효과가 있는지를 관찰하였다. 단시간의 급격한 운동은 무산소성 에너지대사를 촉발하여 lactate 생성을 증가시키고, 증가된 lactate를 pyruvic acid로 환원시키기 위하여 LDH 활성도가 증가하며, creatine phosphate로부터 ATP를 생성하기 위하여 CPK 활성도가 증가한다는 것은 잘 알려진 사실이다<sup>23)</sup>. 그러므로 운동능력 또는 항피로 효능을 측정하는 지표들로 활용되고 있다.

본 실험의 결과 홍경천 에탄올추출물을 3일간 투여한 다음 10분간 강제유영을 실시한 실험에서 홍경천투여군의 혈중 lactate 함량은 유의한 변화가 없었다. 그러나 혈청 LDH와 CPK 활성도의 유의한 감소를 나타내었다. 또한 홍경천 에탄올추출물을 3일간 투여한 다음 고강도유영을 실시한 실험에서는 유의성 있는 혈청 lactate 함량의 감소를 나타내었다. 그러나 혈청 LDH와 CPK 활성도는 유의한 감소를 나타내지 못하였다. 이러한 결과는 홍경천의 운동스트레스 예방효과는 과도하지 않은 운동스트레스의 경우에만 일정한 효능을 나타내는 것으로 생각할 수 있다. 그러나 홍경천이 lactate 함량에 미치는 영향과 혈청 LDH와 CPK 활성도에 미치는 영향이 불일치하는 경향을 나타내었다. 이는 운동 강도 및 시간의 차이와 lactate 대사와 효소활성의 시간적 편차 등에 따른 것으로 생각되며, 이러한 영향의 설명을 위해서는 향후 보다 정밀한 실험 자료가 요구된다.

홍경천이 운동 후에 운동의 피로회복 또는 운동스트레스의 감소효능을 관찰하기 위해서, 3일간 고강도 유영을 실시한 다음 홍경천 에탄올추출물을 투여하였다. 운동 후 6시간과 24시간 후 모두에서 홍경천 투여군은 유의성 있는 혈청 lactate 함량의 감소를 나타내었으며, 24시간 후에 유의성 있는 혈청 LDH와 CPK 활성도의 감소를 나타내었다. 이는 홍경천이 운동 후 피로회복 또는 운동스트레스의 감소에 일정 효능을 가지고 있는 것을 나타낸다.

본 실험에서 관찰할 수 있는 또 하나의 흥미로운 결과는 과도한 운동의 경우에 홍경천 투여가 혈중 lactate 함량을 유의하게 감소시켰다는 것으로, 이는 홍경천이 lactate 대사에 대하여 일정 역할을 하는 것을 추측하게 한다. 최근 연구에 의하면, 고강도 운동의 경우 혈중 lactate가 증가하고 이때 뇌는 lactate를 흡수하며, 이는 운동피로의 회복기간 동안 지속된다고 하였다<sup>24)</sup>. Lactate는 monocarboxylate transporter에 의하여 세포막을 통과하는데 이 transporter가 뇌 세포에서 발견되었다<sup>25)</sup>. 신경세포(neuron)와 성상아교세포(astrocytes) 등으로 구성된 뇌조직은 lactate를 에너지원으로 사용할 수 있는 능력을 가지고 있으며, 뇌의 신경세포가 활성화될 때 glucose보다 오히려 lactate가 일차적인 에너지원이 되는 것으로 알려져 있다. 운동 후 피로회복 기간동안 뇌에서의 glucose와 lactate의 흡수 증가가 신경세포가 활성화되기 위한 대사적 반응에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있으며, 비근육성 기원(non-muscular origin)인 중추성 피로(central fatigue) 기전을 설명하는 근거로 사용된다<sup>26)</sup>. 또한 고강도의 운동으로 증가된 혈중 lactate가 뇌에서 불충분한 glucose 저장량의 회복을 대신하는 역할을 하는 것으로 보고 되었다<sup>27)</sup>. 본 실험에서 혈중 lactate를 유의하게 감소시킨 홍경천의 작용이 뇌에서의 lactate 흡수를 증가시킨 결과라는 직접적 자료는 없다. 하지만 고강도의 운동스트레스 부과 이전과 이후 모든 경우에 유의하게 감소시킨 것으로 보아 그 가능성을 추측해볼 수 있을 것으로 생각된다.

그러므로 일차적으로 홍경천이 운동스트레스에 의한 시상하부의 신경핵들의 활성화에 미치는 영향을 IEGs 발현을 통하여 관찰하였다. 중추신경계에서는 다양한 자극이 IEGs 발현을 유발시킨다. 정상적인 상태에서는 IEGs 발현이 일반적으로 아주 낮은 상태이며 생리적인 자극일 경우에는 그 자극에 기능적으로 관련된 뇌부위에서만 IEGs 발현의 증가가 나타난다<sup>6)</sup>. 이에 비하여 병리적 조건, 즉 경련이나 허혈과 같은

조건은 중추신경계의 광범위한 부위에서 IEGs 발현의 증가를 유발하며 직접적으로 손상 받은 부위는 물론 손상부위 바깥영역에서도 발현이 증가된다<sup>7)</sup>. 그러므로 IEGs는 다양한 스트레스에 대한 신경-내분비계통 세포들의 반응을 관찰하는 매우 유용한 지표이다<sup>8)</sup>. Heat-shock protein (HSP)은 스트레스 생리학에서 중요한 역할을 하는 단백질로, 열충격이나 허혈 또는 각종 스트레스 등 변성단백질을 생산하는 모든 스트레스에 대한 반응으로 그 발현이 증가되며<sup>9)</sup>, 스트레스 상태에서 분비된 HSP-72 단백질은 pro-inflammatory 반응을 일으키는 것으로 알려져 있다<sup>28)</sup>. 또한 운동 및 스트레스 반응에서 시상하부의 paraventricular nucleus (PVN)을 포함한 hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) 기능축이 매우 중요한 역할을 한다<sup>29)</sup>. 운동 등의 신체적인 스트레스<sup>30)</sup>와 더불어 감정적 스트레스<sup>31)</sup> 등이 HPA 기능축에서 c-Fos 또는 HSP-72 발현의 증가를 유발하는 것으로 보고되어 있다. 본 실험의 결과 운동스트레스 부과 후 홍경천의 투여가 시상하부 신경핵의 pPVN을 제외한 PVA, mPVN 및 AHC에서 c-Fos 양성반응 신경세포 수를 유의하게 감소시켰으며, 시상하부 전반에서 HSP-72 양성반응 신경세포 수를 유의하게 감소시켰다. 이러한 결과는 홍경천이 운동스트레스로 인한 hypothalamo-pituitary-adrenal 기능축의 신경세포 반응을 감소시키는 효능이 있는 것으로 추측하게 한다.

세포들이 저산소 상태에 노출되면 HIF의 발현을 중심으로 한 적응기전을 일으킨다<sup>40)</sup>. 일차적으로 erythropoietin (Epo) gene의 작동을 촉진하여 hematocrit치를 증가시키고<sup>42)</sup>, GLUT1와 GLUT3, lactate dehydrogenase-A 등을 작동하여 glucose의 흡수와 glycolysis를 증가시켜 세포가 저산소에 적응하는 능력을 향상시킨다<sup>43)</sup>. 또한 저산소 상태에 빠진 조직으로 산소의 수송을 원활히 하기 위하여 Epo나 transferrin 등을 통하여 적혈구의 성숙을 촉진하며<sup>44)</sup>, VEGF와 endothelin-1을 통하여 혈관신생(angiogenesis)과 혈관운동(vasomotor)을 조절한다<sup>44)</sup>. 이러한 일련의 저산소에 대한 적응기전은 HIF의 조절에 의한 것이며, 뇌조직이나 심장근육 및 골격근 등 모든 조직의 허혈 또는 저산소 상태에서 HIF-의존적 저산소 반응기전(HIF-dependent hypoxic response pathway)이 작용하는 것으로 보고되어 있다<sup>35)</sup>.

특히 인체의 골격근은 산소요구량의 변화에 잘 적응할 수 있는 구조적, 대사적 특성을 가지고 있다. 지속적인 트레이닝은 골격근의 모세혈관 수를 증가시킨다. 이는 산소를 공급할 수 있는 면적을 넓힘과 아울러

러 산소가 확산되는 거리와 시간을 줄여줌으로써 근육조직에 산소를 보다 적절히 공급할 수 있는 적응기전이 된다<sup>36)</sup>. 이러한 지속적인 신체운동의 트레이닝이 운동능력을 향상시키는 기전에도 HIF-1이 중심적인 역할을 한다고 하였다<sup>37)</sup>. 또한 근육세포는 대사적 특성에 따라 피로저항성이 강하고, 느린 수축속도를 갖는 type I 근육세포와 피로저항성이 약하고, 빠른 수축속도를 갖는 type IIb 근육세포로 구분된다. Type I 세포는 oxidative metabolism에 의하여, type IIb 세포는 glycolytic metabolism에 의하여 에너지를 생성한다. 낮은 산소공급 상태에서, glycolytic metabolism에 의하는 type IIb 근육세포에서 더 높은 HIF-1 $\alpha$  발현이 나타난다고 하였다<sup>38)</sup>. 이는 근육세포의 피로에 대한 적응기전에 HIF-1 $\alpha$ 가 직접적으로 관여하고 있음을 보여주는 것이다.

홍경천이 근육내 HIF-1 $\alpha$  발현에 미치는 영향을 면역조직화학적으로 관찰한 본 실험의 결과, 홍경천을 투여하고 10분간 강제유영을 실시한 경우 근육내 HIF-1 $\alpha$  양성반응 세포 수가 유의하게 증가하였으며, 강제유영 이후에 홍경천을 투여한 경우에는 유의한 변화가 없었다. 본 실험의 결과들을 종합적으로 고찰할 때, 홍경천은 기존의 연구결과들과 일치하는 운동 후 피로회복을 촉진하는 효능이 관찰되었으며, 또한 운동능력 향상 및 피로유발의 억제 효능이 관찰되었다. 홍경천의 이러한 효능은 근육내 HIF-1 $\alpha$  발현에 대한 조절작용과 관련된 것으로 생각된다.

## 결론

홍경천의 운동스트레스에 대한 항피로 효능과 시상하부 신경핵의 IEGs 발현에 미치는 영향을 관찰하고자, 흰쥐에 강제유영을 실시하여 운동스트레스를 부과하고 홍경천 에탄올추출물을 경구투여한 다음 혈중 lactate 함량, 혈청 LDH 및 CPK 활성도, 시상하부 신경핵들에서 c-Fos와 HSP-72 양성반응 신경세포의 변화를 면역조직화학염색을 통하여 관찰한바 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 강제유영 이전에 홍경천을 투여하고 10분간 강제유영을 실시한 군에서는 혈중 lactate 함량은 유의한 변화가 없었으나, 혈청 LDH와 CPK 활성도는 유의한 감소를 나타내었다.

2. 강제유영 이전에 홍경천을 투여하고 고강도유영을 실시한 군에서는 혈중 lactate 함량이 유의하게 감



소하였으나, 혈청 LDH와 CPK 활성도는 유의한 변화가 없었다.

3. 강제유영 이후에 홍경천을 투여한 경우, 6시간 후와 24시간 후 모두에서 혈중 lactate 함량의 유의한 감소를 나타내었으며, 혈청 LDH와 CPK 활성도는 24시간 후에 유의한 감소를 나타내었다.

4. 강제유영 이후에 홍경천을 투여한 경우, 24시간 후에 시상하부의 PVA, mPVN 및 AHC 신경핵에서 유의한 c-Fos 양성반응 신경세포의 감소가 관찰되었다.

5. 강제유영 이후에 홍경천을 투여한 경우, 24시간 후에 시상하부에서 유의한 HSP-72 양성반응 신경세포의 감소가 관찰되었다.

이상의 결과로 보아, 홍경천은 lactate 대사에 관여하며, 이러한 기전을 통하여 운동스트레스에 대한 항피로 효능과 신경세포의 스트레스반응을 감소시키는 효능을 나타내는 것으로 판단된다.

## 감사의 글

이 논문은 BK21사업의 지원으로 연구되었음

## 참고문헌

- Kelly GS. *Rhodiola Rosea*: a possible plant adaptogen. *Altern Med Rev*. 2001 ; 6(3) : 293-302.
- Ming DS, Hillhouse BJ, Guns ES, Eberding A, Xie S, Vimalanathan S, Towers GH. Bioactive compounds from *Rhodiola Rosea* (Crassulaceae). *Phytother Res*. 2005 ; 19(9) : 740-3.
- Fulder SJ. Ginseng and the hypothalamic-pituitary control of stress. *Am J Chin Med*. 1981 ; 9 : 112-8.
- Kanupriya, Prasad D, Sai Ram M, Kumar R, Sawhney RC, Sharma SK, Ilavazhagan G, Kumar D, Banerjee PK. Cytoprotective and antioxidant activity of *Rhodiola imbricata* against tert-butyl hydroperoxide induced oxidative injury in U-937 human macrophages. *Mol Cell Biochem*. 2005 ; 275(1-2) : 1-6.
- Mook-Jung I, Kim H, Fan W, Tezuka Y, Kadota S, Nishijo H, Jung MW. Neuroprotective effects of constituents of the oriental crude drugs, *Rhodiola sacra*, *R. sachalinensis* and *Tokaku-joki-to*, against beta-amyloid toxicity, oxidative stress and apoptosis. *Biol Pharm Bull*. 2002 ; 25(8) : 1101-4.
- Sagar SM, Sharp FR, Curran T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science*, 1988 ; 240 : 1328-31.
- Akins PT, Liu PK, Hsu CY. Immediate Early Gene Expression in Response to Cerebral Ischemia: Friend or Foe? *Stroke*. 1996 ; 27 : 1682-7.
- Kawasaki M, Yamaguchi K, Saito J, Ozaki Y, Mera T, Hashimoto H, Fujihara H, Okimoto N, Ohnishi H, Nakamura T, Ueta Y. Expression of immediate early genes and vasopressin heteronuclear RNA in the paraventricular and supraoptic nuclei of rats after acute osmotic stimulus. *J Neuroendocrinol*. 2005 ; 17(4) : 227-37.
- Welch WJ. Heat shock proteins functioning as molecular chaperones: their roles in normal and stressed cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1993 ; 339 : 327-33.
- Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia inducible factor 1. *J Biol Chem*. 1995 ; 270 : 1230-7.
- Robert A, Robergs RA, Ghiasvand F, Parker D. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004 ; 287 : R502-16.
- Sahlin K, Edstrom L, Sjöholm H, Hultman E. Effects of lactic acid accumulation and ATP decrease on muscle tension and relaxation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1981 ; 240 : C121-6.
- Stroka DM, Burkhardt T, Desbaillets I, Wenger RH, Neil DA, Bauer C, Gassmann M, Candinas D. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J*. 2001 ; 15(13) : 2445-53.
- Milkiewicz M, Pugh CW, Egginton S. Inhibition of endogenous HIF inactivation induces angiogenesis in ischaemic skeletal muscles of mice. *J Physiol*. 2004 ; 560 : 21-6.
- Tomita S, Sinal CJ, Yim SH, Gonzalez FJ. Conditional disruption of the aryl hydrocarbon

- receptor nuclear translocator (Arnt) gene leads to loss of target gene induction by the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Mol Endocrinol.* 2000 ; 14(10) : 1674-81.
16. Nakao C, Yamada E, Fukaya M, Tayama K, Tsukamoto Y, Sato Y. Effect of acetate on glycogen replenishment in liver and skeletal muscles after exhaustive swimming in rats. *Scand J Med Sci Sports.* 2001 ; 11(1) : 33-7.
  17. Kinouchi H, Sharp FR, Chan PH, Koistinaho J, Sagar SM, Yoshimoto T. Induction of c-fos, junB, c-jun, and hsp70 mRNA in cortex, thalamus, basal ganglia, and hippocampus following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1994 ; 14 : 808-17.
  18. Kubis HP, Hanke N, Scheibe RJ, Gros G. Accumulation and nuclear import of HIF1  $\alpha$  during high and low oxygen concentration in skeletal muscle cells in primary culture. *Biochim Biophys Acta.* 2005 ; 1745(2) : 187-95.
  19. Timofeeva E, Huang Q, Richard D. Effects of treadmill running on brain activation and the corticotropin-releasing hormone system. *Neuroendocrinology.* 2003 ; 77(6) : 388-405.
  20. Brekhma II, Dardymov IV. New substances of plant origin which increase nonspecific resistance. *Ann Rev Pharmacol.* 1969 ; 9 : 419-30.
  21. Ganzera M, Yayla Y, Khan IA. Analysis of the marker compounds of *Rhodiola rosea* L. (golden root) by reversed phase high performance liquid chromatography. *Chem Pharm Bull.* 2001 ; 49(4) : 465-7.
  22. Linh PT, Kim YH, Hong SP, Jian JJ, Kang JS. Quantitative determination of salidroside and tyrosol from the underground part of *Rhodiola rosea* by high performance liquid chromatography. *Arch Pharm Res.* 2000 ; 23(4) : 349-52.
  23. Essen-Gustavsson B, Tesch PA. Glycogen and triglyceride utilization in relation to muscle metabolic characteristics in men performing heavy-resistance exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1990 ; 61(1-2) : 5-10.
  24. Dalsgaard MK, Quistorff B, Danielsen ER, Selmer C, Vogelsang T, Secher NH. A reduced cerebral metabolic ratio in exercise reflects metabolism and not accumulation of lactate within the human brain. *J Physiol.* 2004 ; 554 : 571-8.
  25. Gerhart DZ, Enerson BE, Zhdankina OY, Leino RL, Drewes LR. Expression of monocarboxylate transporter MCT1 by brain endothelium and glia in adult and suckling rats. *Am J Physiol.* 1997 ; 273 : E207-13.
  26. Larrabee MG. Lactate metabolism and its effects on glucose metabolism in an exercised neural tissue. *J Neurochem.* 1995 ; 64 : 1734-41.
  27. Ide K, Schmalbruch IK, Quistorff B, Horn A, Secher NH. Lactate, glucose and O<sub>2</sub> uptake in human brain during recovery from maximal exercise. *J Physiol.* 2000 ; 522 : 159-64.
  28. Fleshner M, Campisi J, Amiri L, Diamond DM. Cat exposure induces both intra- and extracellular Hsp72 : the role of adrenal hormones. *Psychoneuroendocrinology.* 2004 ; 29(9) : 1142-52.
  29. Park E, Chan O, Li Q, Kiraly M, Matthews SG, Vranic M, Riddell MC. Changes in basal hypothalamo-pituitary-adrenal activity during exercise training are centrally mediated. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005 ; 289(5) : R1360-71.
  30. Baar K, Blough E, Dineen B, Esser K. Transcriptional regulation in response to exercise. *Exerc Sport Sci Rev.* 1999 ; 27 : 333-79.
  31. Ueyama T, Yoshida K, Senba E. Emotional stress induces immediate-early gene expression in rat heart via activation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenoceptors. *Am J Physiol.* 1999 ; 277 : H1553-61.
  32. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995 ; 92(12) : 5510-4.
  33. Mobasheri A, Richardson S, Mobasheri R, Shakibaei M, Hoyland JA. Hypoxia inducible factor-1 and facilitative glucose transporters GLUT1 and GLUT3: putative molecular

- components of the oxygen and glucose sensing apparatus in articular chondrocytes. *Histol Histopathol.* 2005 ; 20(4) : 1327-38.
34. Hofer T, Wenger RH, Kramer MF, Ferreira GC, Gassmann M. Hypoxic up-regulation of erythroid 5-aminolevulinate synthase. *Blood.* 2003 ; 101(1) : 348-50.
  35. Bergeron M, Gidday JM, Yu AY, Semenza GL, Ferriero DM, Sharp FR. Role of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain. *Ann Neurol.* 2000 ; 48(3) : 285-96.
  36. Hoppeler H, Vogt M. Muscle tissue adaptations to hypoxia. *J Exp Biol.* 2001 ; 204 : 3133-9.
  37. Gustafsson T, Knutsson A, Puntchart A, Kaijser L, Nordqvist AC, Sundberg CJ, Jansson E. Increased expression of vascular endothelial growth factor in human skeletal muscle in response to short-term one-legged exercise training. *Pflugers Arch.* 2002 ; 444(6) : 752-9.
  38. Pisani DF, Dechesne CA. Skeletal Muscle HIF-1 Expression Is Dependent on Muscle Fiber Type. *J Gen Physiol.* 2005 ; 126(2) : 173-8.