

Effects of 8-week Exercise on Bcl-2, Bax, Caspase-8, Caspase-3 and HSP70 in Mouse Gastrocnemius Muscle

Ki Bum Kim, Yong An Kim¹ and Jung-Jun Park^{2*}

¹Department of Adapted Physical Education, Hanshin University, Osan 447-791, Korea

¹Institute of Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

²Division of Sports Science, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

Received August 9, 2010 / Accepted September 10, 2010

The aim of this study was to investigate the effects of exercise on intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways in skeletal muscle. ICR-type white male mice were divided into a control group (CON: n=10) and an exercise training group (EX: n=10) after a 1 week adaptation period. EX performed treadmill running at 16.4 m/min with a 4% incline, 40 min/day and 5 days/week for 8 weeks. Cervical dislocation was performed at 48 hours after the last bout of exercise, after which gastrocnemius skeletal muscles were immediately collected. The results of verifying the intrinsic apoptosis pathway showed that there were no significant differences in Bcl-2, Bax, or the ratio of Bax/Bcl-2 proteins between EX and CON. On the other hand, the results of verifying the extrinsic apoptosis pathway showed that caspase-8 proteins were significantly lower in EX than in CON ($p<0.05$). Apoptosis suppressing protein HSP70 was higher in EX than in CON. In addition, caspase-3, which is the final factor for apoptosis, was not activated. These results indicate that apoptosis did not develop since caspase-3 is non-cleaved by the effects of caspase-8 and HSP70 extrinsic pathways rather than Bcl-2 and Bax intrinsic pathways among signal pathways for apoptosis.

Key words : Exercise, Bcl-2, Bax, caspase-8, caspase-3, HSP70

서 론

Apoptosis는 모든 다세포 기관의 항상성 유지를 조절하기 위해 일어나는 필수적인 세포사로, 외부의 물리적 자극에 의해 수동적인 죽음을 초래하는 necrosis와 달리 프로그램화된 세포사이다. 이러한 apoptosis의 억제와 촉진은 미토콘드리아에서 조절한다는 이론이 보편적이다[22]. 한편, 고강도 운동은 염증반응을 유발하고 면역력을 감소시켜 근 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다[6]. 또한, 산화과정 중에 활성산소종 (Reactive Oxygen Species, ROS) 생성을 증가시키고 불특정 생화학적 물질들과 반응하여 세포에 상해를 일으키며 신호전달 체계에 영향을 미쳐 DNA, protein, lipid와 같은 다양한 분자들에 손상을 유발한다[4,6]. 심한 경우에는 apoptosis를 일으키기도 한다[20]. 따라서, 고강도 운동은 apoptosis 유발인자들의 발현을 변화시킬 수 있는 여러 요소들을 조절하는 것으로 알려져 있으며 특히 glucocorticoids, ROS, intracellular Ca^{2+} 상승과 TNF- α 등은 apoptosis를 유발할 수 있는 주요 신호로 알려져 있다[2]. 또한, Bax, 활성화된 caspase 등이 apoptosis를 촉발시킬 수 있는데[18], 이러한 유도 경로는 모두 미토콘드리아와 연관된 세포활동으로 귀결되는 것으로 사료

된다. 반면에 Bcl-2는 투과에 의한 물질 이동을 억제하거나 미토콘드리아에서 cytochrome c의 유리를 차단하거나 단백질을 미토콘드리아 주변에 달라붙게 함으로써 apoptosis를 막아주는 것으로 알려져 있다[23,30].

지금까지 연구된 apoptosis의 경로를 살펴보면 미토콘드리아를 경유하는 기전으로 Bax나 Bcl-2, Apaf-1과 caspase-9이 관여된 것[13]과 endonuclease 활성을 갖는 AIF (Apoptosis Inducible Factor) 작용[12,16], endoplasmic reticulum (ER)에서 Ca^{2+} 과부하에 의한 caspase-12가 연관된 기전[20], TNF 또는 FasL 수용체가 관여하는 것[7]이 있다. 이러한 apoptosis 신호 경로는 내인성 신호 경로(intrinsic signal pathway)와 외인성 신호 경로(extrinsic signal pathway)에 의해 apoptotic cell death body가 생성된다고 보고되었다[25]. 이는 pro-apoptotic Bcl-2 family member Bid의 분할의 결과로 구분될 수 있다. 분할되거나 활성화된 caspase-8은 caspase-3를 활성화 시킬 수 있을 뿐만 아니라 전체 Bid에서 tBid (truncated version)로 분할된다[27]. 내인성 경로에 해당되는 tBid는 pro-apoptotic Bax와 상호작용하고 미토콘드리아를 경유하여 apoptosis 신호를 자극한다. 어떤 세포유형은 미토콘드리아를 포함하지 않는 외인성 경로를 경유하는 pro-apoptotic 신호에 좀더 민감한 것으로 보고하였으며, 이와 같은 세포유형을 type I 세포라 한다[5]. 그러나, 골격근 세포를 이용한 대부분의 apoptosis 신호 경로에 관한 선행연구에서는 미토콘드리아를

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-2713, Fax : +82-51-510-3746

E-mail : jjparkpnu@pusan.ac.kr

경유하는 내인성 신호 기전에 대해서 연구되어졌으며 [15,23,24,25], 외인성 신호 기전에 관한 연구는 미비한 실정이다. 뿐만 아니라 운동의 주요 표적조직이 골격근이고, 운동 후 미토콘드리아 유전자와 단백질 발현이 현저히 변화되기 때문에 운동수행 여부에 따라 apoptosis 신호경로의 내인성 및 외인성 신호기전 변화가 다를 수 있다는 것을 시사한다.

따라서 본 연구에서는 기존 연구에서 다루어 지지 않은 운동에 따른 골격근에서의 내인성 신호 경로와 외인성 신호 경로 기전 모두의 민감성 여부에 대한 연구와 이와 관련한 apoptosis과정 중 HSP70과 같은 Chaperone 기능을 하는 요소의 작용에 관해 연구하고자 한다.

재료 및 방법

실험 대상

실험동물은 생후 8주령 이상 된 ICR계 수컷을 이용하여, 일주일의 적응기간을 거친 후 무작위로 운동집단 10마리, 통제집단 10마리로 설정하였다. 사료와 물은 자유스럽게 섭취하도록 하였다. 온도($22\pm1^{\circ}\text{C}$), 습도($55\pm3\%$), 밤낮은 자연주기 조건에서 사육하였다.

운동 방법

운동그룹은 트레이드밀 속도 10 m/min, 경사도 0%, 10분 씩 2일간의 적응기를 실시하였으며 1일 경과된 후 8주간 주당 5회 운동을 실시하였다. 8주간의 본 운동을 위한 트레이드밀 프로토콜은 경사도 4%, 속도 16.4 m/min로 40분간 지속하였고, 운동기간 동안 동일한 시간대에 운동을 수행하였다.

조직적출 및 분석

마지막 운동 종료 48시간 이후[14]에 비복근을 적출한 후, 액화질소에 급속 냉동시켜 분석 시까지 -70°C 에서 보관하였다. 통제 집단 동물들도 같은 시간에 동일한 방법으로 조직을 적출하고 보관하였다.

Western Blotting

각 조직에서 cell lysis buffer를 이용하여 2 $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ 단백질을 얻었다. 단백질 분리하기 위해 10% polyacrylamide

one-Gel (Elpis Biotech, Korea)을 사용하여 SDS-PAGE를 시행한 후 PVDF membrane (polyvinylidene difluoride)로 gel transfer 하였다. Membrane을 TBS-T로 1회 세척한 후 3% bovine serum albumin/TBS-T로 2시간 이상 blocking한 후, TBS-T로 1회 세척하였다. 일차 항체는 tubulin antibody (1:5,000 dilution), Bax antibody (1:1,000 dilution), Bcl-2 antibody (1:1,000 dilution), 그리고 caspase-3 antibody (1:1,000 dilution), caspase-8 antibody (1:1,000 dilution), HSP70 antibody (1:1,000 dilution)를 각각 첨가 후 membrane과 4°C 에서 overnight 반응시킨 후 TBS-T 용액으로 5분씩 6회 세척하였다. 이차 항체로는 horseradish peroxidase (HRP) 결합된 anti-mouse IgG antibody (1:15,000 dilution) 또는 anti-rabbit IgG antibody (1:20,000 dilution)를 membrane과 4°C 에서 1시간 반응시킨 후 TBS-T 용액으로 5분씩 6회 세척하였다. 반응 후, HRP의 기질인 ECL용액으로 발색반응을 일으켜 X-ray film에 감광하여 분석하였다.

자료 처리

본 실험의 자료는 SPSS 13.0 통계프로그램을 이용하여, 독립표본 t 검정을 실시하였으며 유의수준은 $p<0.05$ 로 하였다.

결 과

이 연구는 8주간의 트레이드밀 운동 효과를 알아보기 위하여 비복근내에서 내인성 신호 경로와 더불어 외인성 신호 경로를 통한 apoptosis 기작과 HSP70의 변화를 검사하여, 다음과 같은 결과를 얻었다.

비복근에서 anti-apoptotic Bcl-2의 발현은 Fig. 1에서와 같이 운동집단에서 통제집단에 비해 높게 나타났으나 통계적으로 유의한 차이가 나타나지는 않았다($p=0.451$), Pro-apoptotic Bax의 발현은 Fig. 2에서와 같이 운동집단이 통제집단보다 낮았으나 그룹간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다($p=0.232$). 따라서 Fig. 3에 나타난 바와 같이 Bcl-2/Bax 비율 또한 운동그룹이 낮게 나타났으나 통계적 유의성은 없었다($p=0.149$). 그러나, 외인성 기전에 해당되는 caspase-8의 발현은 Fig. 4에서와 같이 통제집단과 비교하여 운동집단에서 유의하게 낮은 것으로 나타났다($p=0.044$). 세포 내 기질에서 Charperon 역할을 하는

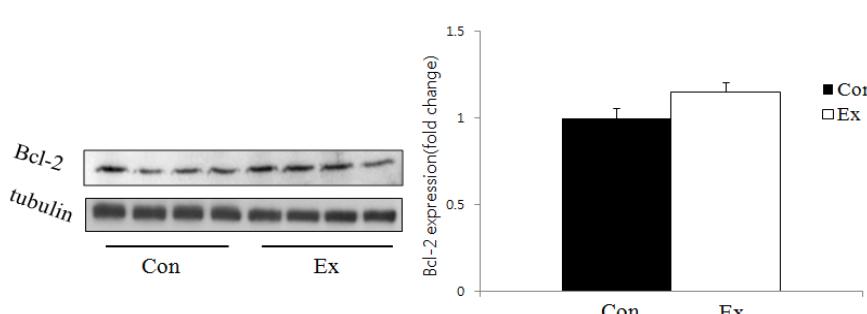


Fig. 1. Bcl-2 protein expression in gastrocnemius muscle. Bcl-2 protein expression was determined by Western blot analysis. The inset shows representative blot for bcl-2. The data are presented as means \pm SE. CON, sedentary control; EX, Exercise Training. *Significantly different from CON ($p<0.05$).

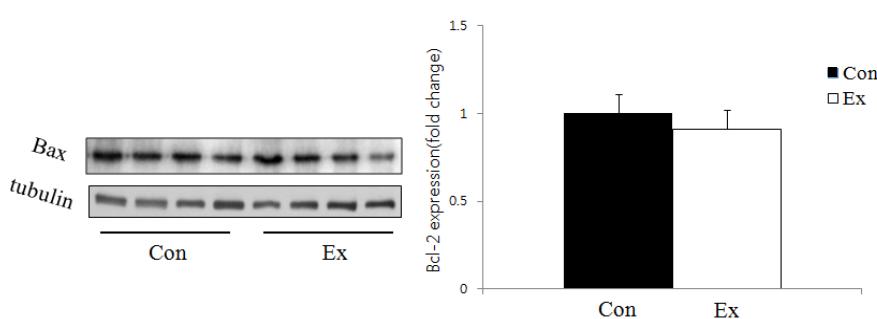


Fig. 2. Bax protein expression in gastrocnemius muscle. Bax protein expression was determined by Western blot analysis. The inset shows representative blot for Bax. The data are presented as means \pm SE. CON, sedentary control; EX, Exercise Training. *Significantly different from CON ($p<0.05$).

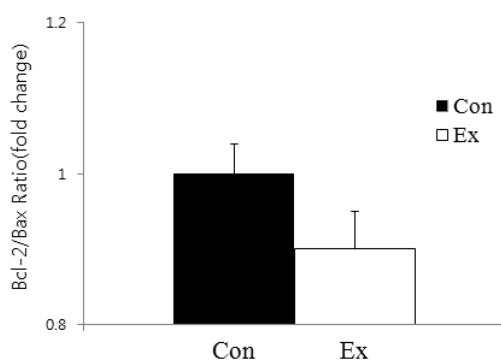
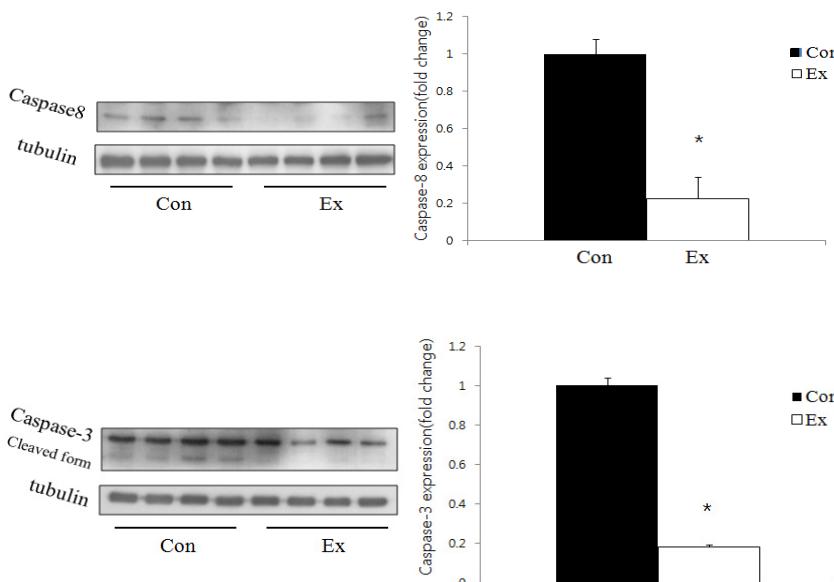


Fig. 3. Bcl-2/Bax ratio in gastrocnemius muscle. The data are presented as means \pm SE. *Significantly different from CON ($p<0.05$).

HSP70의 발현은 Fig. 6에서와 같이 통제집단과 비교하여 운동집단에서 높았으나 통계적 유의성은 나타나지 않았다($p=0.289$). 그러나 apoptosis의 최종 실행자인 분할된 caspase-3는 Fig. 5에서와 같이 통제집단과 비교하여 운동집단에서 유의하게 낮은 것으로 나타났다($p=0.025$).



고 칠

이 연구는 ICR계 실험용 쥐를 대상으로 8주간 지속적으로 중 강도의 규칙적인 운동을 실시하여 골격근에서 일어나는 apoptosis 경로 중 내인성 신호 경로와 외인성 신호 경로에 의해 이루어지는 apoptosis 관련 인자와 HSP70을 확인한 연구 결과를 토대로 다음과 같이 논의하였다.

이 연구에서 발견한 중요한 사실은 규칙적인 운동에 의한 비복근의 적응은 분할된 caspase-3를 감소시키고, 그러한 결과는 내인성 기전에 해당되는 Bcl-2와 Bax의 증감에 변화보다 외인성 기전에 해당되는 caspase-8에 민감하다는 것이다. Anti-apoptotic factor인 Bcl-2의 발현은 통제집단에 비해 운동집단이 높게, pro-apoptotic factor인 Bax의 발현은 운동집단이 낮게 나타났지만 모두 유의한 차이는 나타나지 않았다. 또한 Bcl-2/Bax 비율의 경우 운동집단이 통제집단보다 낮게 나타났지만 그룹 간 유의한 차이는 없었다.

Gosh 등[29]은 12주 동안 트레드밀 운동을 실시한 결과 비복근뿐만 아니라 가자미근에서의 Bcl-2 protein의 발현량이 증

Fig. 4. Caspase-8 protein expression in gastrocnemius muscle. Caspase-8 protein expression was determined by Western blot analysis. The inset shows representative blot for caspase-8. The data are presented as means \pm SE. CON, sedentary control; EX, Exercise Training. *Significantly different from CON ($p<0.05$).

Fig. 5. Caspase-3 protein expression in gastrocnemius muscle. Caspase-3 protein expression was determined by Western blot analysis. The inset shows representative blot for caspase-3. The data are presented as means \pm SE. CON, sedentary control; EX, Exercise Training. *Significantly different from CON ($p<0.05$).

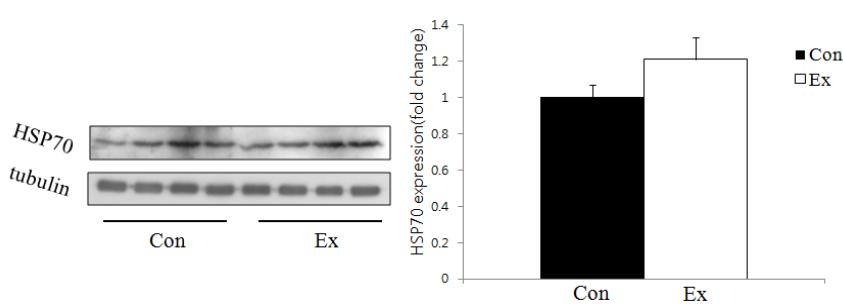


Fig. 6. HSP70 protein expression in gastrocnemius muscle. HSP70 protein expression was determined by Western blot analysis. The inset shows representative blot for HSP70. The data are presented as means \pm SE. CON, sedentary control; EX, Exercise Training. *Significantly different from CON ($p<0.05$).

가되었고, Bax protein은 감소되었으며, 항산화효소 활성을 강화시켜 MDA 농도를 감소시키는 것으로 나타났다. 또한, Siu 등[19]은 규칙적인 운동이 세포의 손상을 방어할 뿐만 아니라 Bax mRNA는 감소하였고, Bcl-2 protein의 발현을 증가시킨다는 결과와 부분적으로 일치하는 결과로 나타났다.

따라서 이 연구결과에서 나타난 바와 같이 Bax의 감소, Bcl-2 증가와 더불어 Bcl-2/Bax 비율이 운동집단에서 낮게 나타났으나 그 변화가 유의하지 않음에도 불구하고 caspase-3가 활성화되지 않은 것은 내인성 신호경로에 의한 apoptosis 반응이 낮게 적용된 것임을 시사한다.

Apoptosis는 세포증식과 사멸을 조절하는 수많은 유전자들에 의해 조절되는 복잡한 분자기전을 가지고 있다. 산화성 스트레스의 증가나 세포 내 Ca^{++} 의 증가에 의해 미토콘드리아의 내막과 외막 사이에 존재하는 cytochrome c가 세포질로 분비되어 dATP 및 apoptotic protease 활성화 인자와 결합하여 apoptosome를 형성한다. 이때 cytochrome c의 분비는 Bcl-2 단백질의 균형에 의해 조절되는데, anti-apoptotic factor로는 Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w 등이 있으며, pro-apoptotic factor로는 Bax, Bid, Bad, Bim, Bak 등이 존재하는 것으로 알려져 있다 [32].

이 중 apoptosis에 직접적으로 관여하는 인자로 알려져 있는 Bax (bcl-2 associated X protein)는 정상세포에서 세포질이나 미토콘드리아 외막에 안정된 상태로 존재하지만, 스트레스와 같은 자극에 민감하게 반응하여 미토콘드리아로 이동하면 cytochrome c의 방출을 유도하는 것으로 보고되고 있다[1,3,30].

이와 반대로 Bcl-2 (B cell lymphoma/leukaemia gene 2)는 Bax와 heterodimer를 형성하고 있어 상호간에 기능을 억제하며, 미토콘드리아에서 cytochrome c의 세포질 방출을 억제시켜 결국 apoptosis를 지연시킨다. 더욱이 이를 Bax와 Bcl-2간의 비율에 의해 cytochrome c의 분비가 결정되며 apoptosis를 실행하는 cascades를 유도하는 중요한 역할을 수행한다[8,9,11,19].

Apoptosis의 메커니즘과 관련하여 내인성 신호 경로에 대한 그리고 세포 표면에 위치한 death receptor를 통해 매개되는 외인성 신호 경로는 Fas나 TNF와 같은 death receptor에 결합하면 FADD나 TRAIL, MORT와 같은 adaptor

protein이 형성되고 이로 인해 caspase-8이 활성화되면 caspase-3, caspase-6, caspase-7이 활성화되어 apoptosis를 일으킨다[33].

미토콘드리아를 매개로 한 내인성 신호 경로는 미토콘드리아 외막에 존재하는 Bax에 의해 cytochrome c를 세포질 내로 방출하고 세포질 내로 방출된 cytochrome c는 apoptosome에 있는 procaspase의 단백 분해를 통해 caspase-9을 활성화시키고, 활성화된 caspase-9에 의해 caspase-3가 활성화되어 치명적인 독성으로 결국 apoptosis를 일으킨다[7].

이러한 apoptosis 경로와 관련한 선행연구를 살펴보면 Thambirajah 등[5]의 연구에서는 격렬한 운동 후 가지미근과 비복근에서의 apoptosis 경로를 살펴본 결과 apoptosis의 두 가지 신호 경로인 내인성, 외인성 모두에서 apoptosis가 일어났으며, 특히 가지미근 조직에서의 apoptosis는 내인성 신호 경로에 의해 좌우되고 증가한 산화 스트레스에 의해 유발되었으며, 반대로 비복근 조직은 외인성 신호 경로에 의해 apoptosis가 나타났는데 이는 이 연구의 결과와 부분적으로 일치하며 격렬한 운동에 의해 근육 조직에서 apoptosis가 두드러지게 유발될 수 있다는 것을 알 수 있다. 또한, 이 연구에서 수행된 골격근에서의 내인성 신호 경로와 외인성 신호 경로를 통한 apoptosis의 신호기전에 대한 연구를 위해 사용된 비복근은 주로 type II 섬유로 구성되어 있으며, type I 섬유보다 더 적은 양의 미토콘드리아를 가지고 있다. 따라서 더 많은 양의 미토콘드리아를 가지고 있는 가지미근과 같은 type I 섬유와 같은 근섬유 유형의 조성에 따른 차이가 반영될 것으로 사료된다.

또한, 운동집단의 경우 caspase-8의 감소로 인하여 분할된 caspase-3 형태는 감소되었다. 결국, HSP70가 ROS에 의해 증가되는 caspase-8과 caspase-3의 활성을 조절함으로써 apoptosis를 지연시킬 수 있었던 것으로 사료된다. HSP70 단백질은 anti-apoptotic 기능을 가지고 있으며[28], cytochrome c와 caspase-3 활성을 작용하므로서 apoptosis가 억제된다[21]. 이러한 HSP70 단백질의 기능과 특성으로 인해 운동 및 트레이닝에 따른 기능과 역할을 밝히기 위해 많은 연구가 진행되고 있다[17]. 특히 운동 중 HSP70의 발현이 증가하는 것은 운동 중 나타나는 근육수축이 산화적 스트레스를 높이고 이로 인해 조직 내에서는 세포를 보호하기 위해 HSP70을 빠르게 생성한다. 즉 근육 내 등적성수축 중에는 superoxide anion radical,

hydroxyl radical, nitric oxide 등을 만들기 때문에 antioxidant defense enzymes 및 HSPs을 빠르게 생성하는 것이다[29,10].

따라서, 8주간의 규칙적인 운동은 생쥐의 비복근에서 세포질 내 unfolding protein의 제거역할을 하는 HSP70의 증가, caspase-8의 감소, 그리고 Bcl-2의 증가와 Bax의 감소로 인해 분할된 caspase-3의 감소를 유발함으로써 apoptosis를 억제 또는 지연시키며, 이는 내인성 기전보다는 외인성 기전에 의해서 조절되는 것으로 사료된다.

References

- Candé, C., I. Cohen., E. Daugas., L. Ravagnan., N. Larochette., N. Zamzami., and G. Kroemer. 2002. Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie.* **84**, 215-222.
- Chae, C. H. and H. T. Kim. 2009. Forced, moderate-intensity treadmill exercise suppresses apoptosis by increasing the level of NGF and stimulating phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the hippocampus of induced aging rats. *Neurochem. Int.* **55**, 208-213.
- Cory, S. and J. Adams. 2002. The Bcl-2 Family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 647-656.
- Droge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**, 47-95.
- Emidio, E. P., R. J. Janna., and E. A. Stephen. 2006. Death receptor-associated pro-apoptotic signaling in aged skeletal muscle. *Apoptosis* **11**, 2115-2126.
- Ghosh, S., M. Khazaei., F. Moien-Afshari., L. S. Ang., D. J. Granville., C. B. Verchere., S. R. Dunn., P. McCue., A. Mizisin., K. Sharma, and I. Laher. 2009. Moderate exercise attenuates caspase-3 activity, oxidative stress, and inhibits progression of diabetic renal disease in db/db mice. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **296**, 700-708.
- Green, D. R. and J. Reed. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-1312.
- Gross, A., J. M. McDonnell, and S. J. Korsmeyer. 1999. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Gene Dev.* **13**, 1899-1911.
- Gruter, M. G. 2000. Caspases: Key players in programmed cell death. *Curr. Opinstruct Biol.* **10**, 649-655.
- Harkins, M. S. 2009. Exercise regulates heat shock proteins and nitric oxide. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **37**, 73-77.
- Hengartner, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-776.
- Ji, L. L. 2002. Exercise-induced modulation of antioxidant defense. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **959**, 82-92.
- Kannan, K. and S. K. Jain. 2000. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* **7**, 153-163.
- Koctürk, S., B. M. Kayatekin, H. Resmi, O. Acikgoz, C. Kaynak, and E. Ozer. 2008. The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and solutes muscle fibers in rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* **102**, 515-524.
- Koctürk, S., B. M. Kayatekin, H. Rewmi, O. Açıkgöz, C. Kaynak, and E. Özer. 2008. The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and solutes muscle fibers in rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* **8**, 515-524.
- Kroemer, G. 2003. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 433-435.
- Lee, J. S., K. C. Park, D. S. Kim, H. O. Choi, K. H. Kim, J. H. Chung, H. C. Eun, and J. S. Seo. 2000. Overexpression of HSP70 prevents ultraviolet B-induced apoptosis of a human melanoma cell line. *Arch. Dermatol. Res.* **292**, 482-487.
- Leeuwenbergh, C., C. M. Gurley, B. A. Strotman, and E. E. Dupont-Versteegden. 2005. Age-related differences in apoptosis with disuse atrophy in Soleus muscle. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **288**, R1288-1296.
- Lim, M. L., M. G. Lum, T. M. Hansen, X. Roucou, and P. Nagley. 2002. On the release of cytochrome c from mitochondria during cell death signaling. *J. Biomed. Sci.* **9**, 288-506.
- Martinadie, J. L. and N. J. Holbrook. 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell Physiol.* **192**, 1-15.
- Morimoto, R. I. 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* **12**, 3788-3796.
- Phaneuf, S. and C. Leeuwenburgh. 2001. Apoptosis and exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* **33**, 393-396.
- Phillips, S. and C. Leeuwenburgh. 2005. Muscle fiber specific apoptosis and TNF-alpha signaling in sarcopenia are attenuated by life-long calorie restriction. *Br. J. Cancer* **86**, 1012-1016.
- Podhorska-Okolow, M., M. Sandri, S. Zampieri, B. Brun, K. Rossini, and U. Carraro. 1998. Apoptosis of myofibres and satellite cells: exercise-induced damage in skeletal muscle of the mouse. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **24**, 518-531.
- Powers, S. K., D. Criswell, J. Lawler, L. L. Ji, D. R. Martin, A. Herb, and G. Dudley. 1994. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* **266**, R375-R380.
- Siu, P. M., R. W. Bruner, J. K. Martyn, and S. E. Alway. 2004. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. *FASEB. J.* **18**, 1150-2.
- Tang, D. and V. J. Kidd. 2000. Caspase-8 activation and bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase-3-dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* **275**, 9303-9307.
- Thambirajah, A. A., K. Sleigh, H. G. Stiver, and A. W. Chow. 2008. Differential heat shock protein responses to strenuous standardized exercise in chronic fatigue syndrome patients and matched healthy controls. *Clin. Invest. Med.* **31**, 319-327.
- Thompson, H. S., P. M. Clarkson, and S. F. Scordilis. 2002. The repeated bout effect and heat shock proteins: Intramuscular HSP27 and HSP70 expression following two bouts of eccentric exercise in human. *Acta. Physiologica Scandinavica* **174**, 47-56.
- Tidball, J. G., D. E. Albrecht, B. E. Locknsgard, and M. J.

- Spencer. 1995. Apoptosis precedes necrosis of dystrophin-deficient muscle. *J. Cell Sci.* **108**, 2197-2204.
31. Wang, J. S. and Y. Huang. 2005. Effects of exercise intensity on lymphocyte apoptosis induced by oxidative stress in men. *Eur. J. Appl. Physiol.* **95**, 290-297.
32. Wyllie, A. H., J. F. Kerr, and A. R. Curie. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251-305.
33. Ye, H., C. Cande, N. C. Stephanou, S. Jiang, S. Gurbuxani, N. Laroche, E. Daugas, C. Garrido, G. Kroemer, and H. Wu. 2002. DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat. Struct Biol.* **9**, 680-684.

초록 : 8주간 운동이 생쥐의 gastrocnemius에서 Bcl-2, Bax, caspase-8, caspase-3와 HSP70에 미치는 영향

김기범¹ · 김용안² · 박정준^{3*}

(¹한신대학교 특수체육학과, ²충남대학교 생물공학연구소, ³부산대학교 스포츠과학부)

이 연구는 실험용 쥐를 대상으로 운동에 따라 골격근에서 일어나는 세포고사 경로 중 내인성 경로와 외인성 경로에 의해 이루어지는 세포고사의 신호기전을 확인하여 운동이 세포고사에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 구명하는데 있다. 이를 위해 ICR계 수컷 흰쥐 20마리를 일주일의 적응기간을 거쳐 통제집단(CON: n=10)과 운동 집단(EX: n=10)으로 배정하였다. 운동은 8주간 주 5회 실시하였고, 트레드밀 속도 16.4 m/min와 경사도 4%로 설정하여 40분간 지속적인 운동을 실시하였다. 세포고사의 신호 경로 중 내인성 경로에 대한 검증 결과 Bcl-2, Bax 단백질, 그리고 Bcl-2/ Bax ratio는 그룹간 통계적 유의성은 나타나지 않았다. 반면, 세포고사의 경로 중 외인성 경로에 대한 검증 결과 caspase-8 단백질의 발현은 운동집단이 통제집단보다 유의하게 낮은 것으로 나타났으며($p<0.05$), 세포고사 억제 단백질인 HSP70 단백질 발현은 운동집단이 통제집단보다 높게 나타났다. 더욱이, 세포고사 최종인자인 caspase-3의 활성화는 이루어 지지 않은 것으로 관찰되었다. 따라서 세포사멸의 신호경로 중 내인성 경로에 작용하는 Bcl-2와 Bax보다는 외인성 경로인 caspase-8과 HSP70의 영향으로 caspase-3가 분할되지 못하여 세포고사가 일어나지 않은 것으로 사료된다.