ISSN : 1225-9918
Journal of Life Science **2011** Vol. 21. No. 3. 435~443 DOI : 10.5352/JLS.2011.21.3.435

Effect of Treadmill Exercise Training on the Expression of PGC-1α, GLUT-1, Tfam Proteins and Antioxydent Ezymes in Brain of STZ-Induced Diabetic Rats

Noh-Hwan Park[1], Jin Lee[2], Kook-Hyun Jung[1], Bong-Am Choi[3], Hyung-Chae Jang[1], Suk-In Lee[4], Dong-Soo Lee[4] and Joon-Yong Cho[1]*

[1]*Exercise Biochemistry Laboratory, Korea National Sport University, Seoul 138-763, Korea*
[2]*Department of Anatomy and Cell Biology, Collage of Medicine, Han-Yang University, Seoul 133-791, Korea*
[3]*Collage of Golf, Dae-Gu University, Dae-gu 712-714, Korea*
[4]*College of Physical Education, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea*

Received January 10, 2011 /Accepted March 7, 2011

The purpose of this study is to identify the effects of exercise training [ET, 10~18 m/min (speed), 20~30 min (exercise duration)/a day for 5 day/wk, 6 wk) on PGC-1α, GLUT-1, Tfam, Cu,Zn-SOD and Mn-SOD proteins in brain of STZ-induced diabetic rats. The male Sprague-Dawley (SD) rats were single-injected intraperitoneally with 50mg/kg of streptozotocin (STZ) to produce STZ-induced diabetic rats. Rats were divided into 3 experimental groups with 8 rats in each group, as follows: (1) non-STZ group (n=8), (2) STZ-CON group (n=8), (3) STZ-EXE group (n=8). The results of this study suggest that i) serum glucose level was significantly reduced in STZ-EXE group compared with STZ-CON group ($p<0.05$), ii) PGC-1α ($p<0.001$), mtPGC-1α ($p<0.001$), GLUT-1 ($p<0.001$), and mtTfam ($p<0.001$) proteins in brain of STZ-induced diabetic rats were significantly increased in STZ-EXE group compared with STZ-CON group, iii) Cu,Zn-SOD ($p<0.001$) and Mn-SOD ($p<0.01$) proteins in the STZ-induced diabetic rats were significantly increased in STZ-EXE group compared with STZ-CON group. In conclusion, the findings of the present study reveal that treadmill exercise training increases brain GLUT-1 protein level possibly through up-regulation of PGC-1α and Tfam proteins which represent key regulatory components of stimulation of brain mitochondrial biogenesis. In addition, treadmill exercise training may prevent oxidative stress by up-regulation of Cu,Zn-SOD and Mn-SOD proteins in the STZ-induced diabetic rats.

Key words: Treadmill exercise training, STZ-induced diabetic rat, PGC-1α, GLUT-1, Tfam, Cu,Zn-SOD, Mn-SOD

서 론

당뇨병은 고혈당, 인슐린 분비 부족 및 결핍과 인슐린 수용체의 민감도 저하 등의 원인으로 생기는 질환이며, 장기간 지속되면 합병증이 나타나며, 대표적인 합병증은 당뇨성 망막증(retinopathy), 신장병(nephropathy), 신경병증(neuropathy) 등을 유발한다[2,7].

당뇨에 대한 병태·생화학적 기전들을 보면 인체 내 항산화 방어기전이 손상되어 활성산소(free radical)의 생성을 높여 세포 내 단백질과 세포막 지질의 변형, 공간 배열의 손상, 조직 내 미토콘드리아 DNA (mtDNA)의 손상[2,7]과 고혈당증(hyperglycemia)으로 생성된 반응성 산소종(reactive oxygen species)인한 저밀도 지단백(low-density lipoprotein)의 지질과산화 증가[18,40] 등이 있다.

최근 당뇨로 인한 고혈당은 뇌 미토콘드리아의 기능을 손상시켜 학습능력과 기억력을 저하시키고 알츠하이머와 파킨슨 질환과 같은 신경퇴행성질환의 발병률을 높게 만든다고 보고[4,5,6]되고 있다. 즉 뇌에서 미토콘드리아 기능 이상은 mtDNA복제 수와 양을 크게 감소시켜 학습능력과 기억력을 손상시킨다[1,20,24]. 한편 미토콘드리아에서는 미토콘드리아 생성 및 활성을 유지하기 위해 peroxisome proliferators-activated receptor gamma coactivator-1α (PGC-1α)와 mitochondrial transcription factor A (Tfam) 등의 단백질을 발현시킨다[10]. PGC-1α는 미토콘드리아 DNA에 의해 합성되어 미토콘드리아의 생성과 활성을 조절하여 미토콘드리아의 기능과 복제[9,23,30,31]를 하며, Tfam은 주로 DNA를 합성시켜 미토콘드리아를 복제하는데 주요한 인자로 보고되어 있다[12]. 따라서 당뇨와 관련된 신경퇴행성질환에 대응하기 위해서는 뇌 미토콘드리아 수 생성관련인자들에 대한 활성 방안이 절실히 필요하다.

뇌의 중추신경계에 필요한 주 에너지원인 글루코스를 말초혈액에서 뇌까지 공급하고 이동시키는데 관여하는 단백질인 GLUT-1 (glucose transporter-1)은 글루코스가 뇌혈관장벽

*Corresponding author
Tel : +82-2-410-6867, Fax : +82-2-410-6945
E-mail : chojy86@knsu.ac.kr

(blood-brain barrier)의 내피세포를 지나가도록 도와주기 때문에 혈당조절에 중요한 인자[12]로써 활동을 하며, 뇌의 피질부분과 시상 및 해마를 포함한 거의 모든 신경세포체에서 광범위하게 분포되어 뇌의 기억력활동을 조절해 준다[32]. 그러나 당뇨병 환자들의 뇌에서는 GLUT-1의 발현이 억제 되는 것으로 알려져 있기 때문[11]에 GLUT-1 단백질을 활성화시키는 방안이 시급하다.

당뇨 치료와 관련된 연구들은 주로 의·약학 분야에서 약물치료로 혈당 감소에 초점을 두고 수행되어 왔으며 최근에는 당뇨병이 신경퇴행성질환인 알츠하이머 질환과 파킨슨 질환의 발병과 관계가 높다고 보고되면서 당뇨 상태에서 뇌 조직의 글루코스 대사 및 산화적 스트레스에 대한 연구가 상당한 관심을 받고 있다. 이러한 측면에서 최근 약물이외에 규칙적인 신체활동 혹은 운동이 당뇨병 개선 및 뇌 기능 향상에 긍정적인 영향을 미치며 신경퇴행성질환인 알츠하이머질환의 예방과 치료에 있어서 긍정적인 효과가 있다고 보고되면서 운동에 대한 관심이 증가하고 있다.

운동과 뇌 기능 관련 선행연구들을 보면 운동은 조직 내 항산화효소의 발현을 증가시키고[36] 대뇌피질과 시상하부 및 다양한 조직에서 인슐린 신호전달을 향상시킬{28]뿐만 아니라 심장과 골격근 세포 내 에너지 요구에 의해 PGC-1α의 발현을 유도시킨다[34]고 알려져 있다. 또한 Cotaman 등[8]은 운동수행으로 뇌신경의 가소성을 조절하는 유전자들과 학습능력과 기억력을 자극하는 BDNF (brain derived neurotrophic facor)와 같은 특정 분자들을 활성화시켜 뇌의 인지기능에 긍정적인 영향을 미친다고 보고하였으며, Park 등[28]과 Sander 등[34]도 운동이 대뇌피질과 시상하부에서 인슐린 신호전달 능력 향상 등 뇌기능 향상에 긍정적인 영향을 미친다고 보고하였다.

이와 같이 운동이 혈당 강하와 뇌 기능 향상(글루코스, 대사, 미토콘드리아 생합성)에 효과가 있음에도 불구하고 당뇨상태에서 운동이 뇌 기능에 어떠한 영향을 미치는가에 관한 연구는 부족한 실정이다. 더욱이 당뇨 상태에서 운동이 뇌조직의 산화적 손상을 예방하는데 효과가 있는지에 관한 기초자료도 부족한 실정이다. 따라서 이 연구는 streptozotocin (STZ) 투여로 당뇨병을 유발시킨 Sprague-Dawley (SD)계 흰쥐를 대상으로 트레드밀 지구성 운동이 글루코스 수준, 인슐린 수준, HOMA-IR 및 PGC-1α, GLUT-1, Tfam 단백질과 항산화 효소(Cu,Zn-SOD, Mn-SOD)의 발현에 미치는 효과를 규명하는데 목적이 있다.

재료 및 방법

실험동물

본 실험에 사용된 실험동물은 생후 6주령 된 Sprague-Dawley (SD)계 수컷 흰쥐를 실험 동물센터에서 분양 받은 후 1주간의 적응기간과 1주간의 적응훈련을 거친 후 6주간의 훈련을 수행하였다. 이들은 실험 8주 동안 동일한 조건, 즉 온도 20±2℃, 습도 50%로 조절된, 조명은 주간(07:00-19:00)에 소등하고, 야간(19:00-07:00)에는 자동적으로 전등하도록 한 실험동물실에서 사육하였다. 모든 쥐들은 케이지 당 1마리씩 넣어 사육하였으며 실험기간 동안 미국영양학회에서 발표된 AIN-76A 실험동물용 식이조정에 따라 제조된 식이를 제공하였고, 식이와 수분섭취는 제한 없이 공급하였다. 이들 실험동물들은 무작위로 정상 SD 비교집단(n=8, NON STZ-CON), 당뇨 비교집단(n=8, STZ-CON), 당뇨 운동집단(n=8, STZ-EXE)으로 구분하였다.

당뇨유도

환경적응훈련을 1주 실시하는 동안 실험에 들어가기 3일 전에 흰쥐 췌장의 베타(β)세포만을 특이적으로 파괴시키는 streptozotocin을 0.1M citric acid buffer (pH 4.5) 용액에 용해시킨 50 mg/kg을 복강에 1회 주사하여 당뇨병을 유도하였다. 당뇨병의 유발 확인은 streptozotocin 주사 48시간에서 72시간 사이에 공복상태에서 꼬리 정맥으로부터 채혈하여 공복 시 혈당 수준이 300 mg/dl 이상일 때 당뇨가 유발되었음을 확인하였다. 정상 SD 비교집단은 동일한 양의 saline만을 주사하였다[17].

훈련방법

Rodent 트레드밀(8 Lanes, Dae-myung Scientific Co, Ltd, Korea)을 이용하여 지구성 운동을 시키기 위해 1주일 정도 사전적응 훈련(10분 동안 10 m/min, 주 5일)을 실시하였으며, 본 훈련은 실온(22~24℃)에서 주 5일 총 6주간 실시하였다[17]. 훈련 프로토콜은 Table 1과 같다.

혈중 생화학 성분 분석

NON STZ-CON 집단, STZ-CON 집단, STZ-EXE 집단을 대상으로 혈액을 채혈하기 위해 pentobarbital sodium (50 mg/kg)으로 마취 시켜 개복하여 심장에서 8 ml의 혈액을 채혈한 후 혈청 글루코스와 인슐린 수준을 분석하기 위해 혈청분리 튜브를 이용하여 혈액을 약 30분 동안 방치한 후 15분간 원심분리(3,000 rpm)하여 혈청을 분리하고, 혈중 생화학적 검사를 실시하였다. 글루코스와 인슐린 수준은 각각 Glucose Hexokinase kit (Bayer, Pittsburg, USA)와 enzyme immunoassay ELISA 분석용 kit (Mercodia AB, Uppsala, Sweden)를 이용하여 분석하였으며 인슐린 저항성의 지표로 사용되고 있는 HOMA-IR (Homeostasis model assessment of insulin resistance=[Fasting Insulin (μU/ml)×Fasting Plasma Glucose (mmol/l)/22.5])를 산출하였다.

Table 1. Treadmill program

	Speed	Time
0~1 wk	10 m/min	10 min
1~2 wk	10 m/min	20 min
2~3 wk	14~15 m/min	20 min
3~4 wk	14~15 m/min	30 min
4~6 wk	17~18 m/min	30 min

뇌 적출

6주간 트레드밀 지구성 운동을 수행한 후, pentobarbital (50 mg/kg)을 복강 내 주입시켜 마취 시킨 후, 뇌 조직을 적출하여 분석 때까지 -80℃에서 냉동 보관하였다.

미토콘드리아 분리방법

미토콘드리아의 분리는 Mitochondria Extraction Kit (IMGENEX Corporation, San Diego, CA)을 이용하여 분리하였다. 분석방법은 조직 1 g 당 5 ml의 homogenizing buffer를 넣어 잘게 균질화 시킨 후, 균질화된 샘플은 4℃에서 10분간 3,000 rpm으로 원심 분리하였다. 분리된 상층액을 다시 4℃에서 30분간 12,000 rpm으로 원심 분리한 후, 상층액을 제거하고 남은 pellet을 5 ml의 Suspension buffer를 넣어 잘 섞어 준 다음 다시 4℃에서 10분간 12,000 rpm으로 원심 분리하였다. 이후 상층액을 제거 후 1회 더 Suspension buffer 5 ml를 넣고 잘 섞어 준 후 다시 4℃에서 10분간 12,000 rpm으로 원심 분리하였다. 상층액을 제거한 후 남은 pellet은 1 ml의 Complete Mitochondrial lysis buffer를 넣어 4℃에서 30분간 녹인 후 분리된 mitochondrial extract를 4℃에서 5분간 12,000 rpm으로 원심 분리하여 획득한 상층액(mitochondria fraction)을 얻었다. 총 단백질량은 BSA (Bovine Serum Albumin, 570 nm)를 이용하여 Bradford [6]의 방법으로 정량화하였다.

SDS-PAGE방법

10% separating gel (30% acrylamide, 1.5M tris pH8.8, 10% SDS, 10% Ammonium persulfate, TEMED)와 5% stacking gel (30% acrylamide, 1M tris pH 6.8, 10% SDS, 10% Ammonium persulfate, TEMED)을 만들어 사용하였으며, 원심분리(15,000 rpm, 20분) 한 후, 상층액(total cytosol fraction)과 SDS loading buffer (60mM tris pH6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4mM 2-mercaptoethanol, 0.1% Bromophennol Blue)을 잘 혼합한 후 100℃에 10분간 끓여 단백질을 변성시킨 다음, 얼음에 10분 식힌 후, 다시 원심분리(15,000 rpm, 20분간, 4℃)하였다. 스탠다드 마커(SDS-PAGE Molecular Weight Strandards, BioRad)와 함께 각 샘플을 Mini-protein Ⅱ dual-slab apparat us (Bio-Rad, CA, USA)에 준비된 stacking gel well에 총 단백질량이 100 μg이 되도록 분주하고 80 V에서 2시간 정도 샘플이 바닥에 닿을 때까지 전기영동 하였다.

Western blot 분석방법

Transfer buffer (190 mM glycine, 50 mM Tris-base, 0.05 SDS 20% methanol)에 적신 nitrocellulose membrane (Amersham), Whatman 3M paper을 차례로 겹친 후, Mini trans-blot module (Bio-Rad)에 장치하고 40 V로 2시간 전사하였다. Membrane으로 증착이 끝나면 rocker platform 위에서 1시간 동안 membrane을 3% skim milk 용액(in PBS-T: 10mM Tris-base pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20)으로 blocking시켰다. 1차 항체인 anti-GLUT-1 (sc-7903, Santa Cruz, CA, USA), anti-PGC-1α (sc-13067, Santa Cruz, CA, USA), anti-Tfam (sc-23588, Santa Cruz, CA, USA), anti-SOD- 1(sc-11407, Santa Cruz, CA, USA) and anti-SOD-2 (sc-30080, Santa Cruz, CA, USA), anti-GAPDH (sc-0357, Santa Cruz, CA, USA)를 1:1,000으로 bolcking (3% skim milk) 용액으로 각각 희석시켜 12시간 동안 흔들어 준 다음 TBS-T 용액으로 10분씩 3차례 세척한 후 2차 항체(horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit 65-6120, ZYMED, CA, USA; horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-goat 81-1620, ZYMED, CA, USA)를 Blocking 용액으로 1:5,000으로 희석시켜 90분 동안 흔들어 주고 난 후 TBS-T 용액으로 10분씩 3차례 세척하였다. 마지막 단계로 ECL substrate 용액 Santa cruz Biotechnology, CA, USA)에 membrane을 넣고 5분간 발색하고 얻어진 membrane을 이미지 분석 시스템(Molecular Imager ChemiDoc XRS System, Bio-Rad, USA)을 이용하여 스캔한 후 Quantity 1-D Analysis Soft ware Bio-Rad, USA)를 이용하여 단백질량을 산출하였다.

자료처리방법

이 연구에서 얻어진 모든 결과는 SPSS/PC 11.0 통계 프로그램을 이용하여, 각 변인에 대한 기술 통계치(mean±SD)를 산출하고 집단 간 변인의 차이를 확인하기 위해 일원변량분석(one-way ANOVA)을 실시하였으며 집단 간 유의한 차이가 있을 경우 LSD (*least significant difference*)를 이용하여 사후 검증을 실시하였다. 이때 가설 유의 기준은 α=0.05 수준으로 설정하였다.

결 과

집단 간 혈청 글루코스, 인슐린 수준 및 HOMA-IR

STZ를 투여한 SD 쥐에서 6주간의 트레드밀 지구성 운동 후 집단 간 혈청 글루코스, 인슐린 수준 및 HOMA-IR를 분석한 결과, 혈청 글루코스 수준의 경우, 집단 간에 $p<0.014$로 유의한 차이가 있는 것으로 나타나 사후 검증한 결과 NON STZ-CON 집단(100%)과 STZ-CON 집단 간에 $p<0.001$ 수준에서

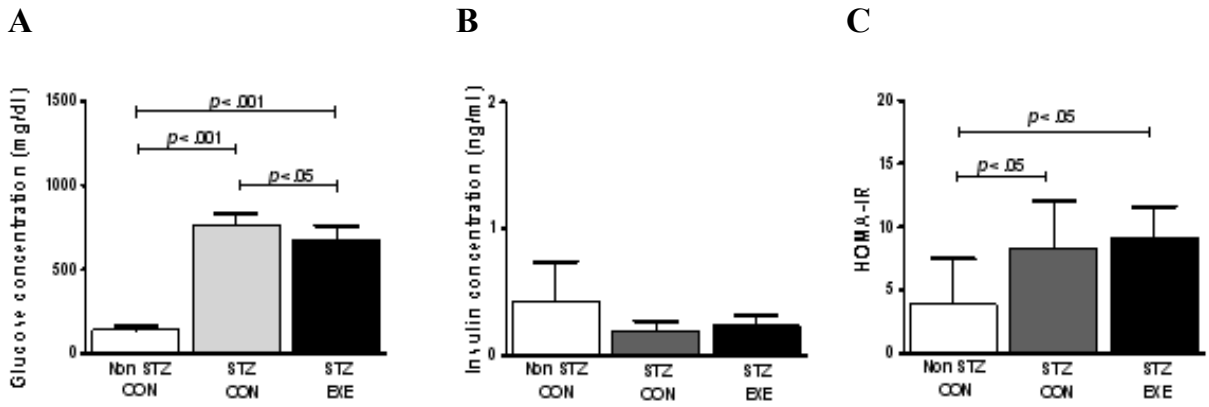

Fig. 1. Glucose concentration, Insulin concentration and HOMA-IR at the end of 6week of exercise training. Values are expressed as mean±SD of 8 animals/groups.

차이가 있는 것으로 나타났으며, NON STZ-CON 집단과 STZ- EXE 집단 간에 $p<0.001$수준에서 차이가 있는 것으로 나타났다. 마지막으로 STZ-CON 집단과 STZ-EXE 집단 간에도 $p<0.05$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났다(Fig. 1A). 혈청 인슐린의 경우, 집단 간에 $p>0.05$ 수준에서 통계적으로 차이가 없는 것으로 나타났다(Fig. 1B). 인슐린 저항성 지표로 알려진 HOMA- IR 경우, 집단 간에 $p<0.05$로 유의한 차이가 있는 것으로 나타나 사후 검증한 결과 NON STZ-CON 집단과 STZ-CON 집단 간에 $p<0.05$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났으며, NON STZ- CON 집단과 STZ-EXE 집단 간에 $p<0.05$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났다(Fig. 1C).

집단 간 PGC-1α, TGLUT-1, Tfam 단백질 발현 수준 차이

6주간 트레드밀 지구성 운동 후 뇌 미토콘드리아의 생성과 기능에 중요한 조절 단백질인 PGC-1α에 미치는 영향을 분석한 결과, 세포질 내 PGC-1α 단백질의 경우 집단 간에 $p<0.013$으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타나 사후 검증한 결과 NON STZ-CON 집단과 STZ-CON 집단 간에 $p<0.01$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났으며, STZ-CON 집단과 STZ-EXE 집단 간에 $p<0.001$수준에서 차이가 있는 것으로 나타났다(Fig. 2A). 미토콘드리아 PGC-1α 단백질의 경우, 집단 간에 $p<0.001$로 유의한 차이가 있는 것으로 나타나 사후 검증한 결과, NON STZ-CON 집단과 STZ-CON 집단 간에 $p<0.001$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났으며, STZ-CON 집단과 STZ-EXE 집단 간에도 $p<0.001$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났으며, NON STZ-CON 집단과 STZ-EXE 집단 간에도 $p<0.001$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났다(Fig. 2B). 또한, 6주간 트레드밀 지구성 운동 후 뇌 미토콘드리아 내 전사인자인 Tfam에 미치는 영향을 분석한 결과, 집단 간에 $p<0.01$로 유의한 차이가 있는 것으로 나타나 사후 검증한 결과, NON STZ-CON 집단(100%)과 STZ-CON 집단 간에 $p<0.001$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났으며, STZ-CON 집단과 STZ-EXE 집단 간에 $p<0.001$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났다. NON STZ-CON 집단과 STZ-EXE 집단 간에도 $p<0.001$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났다(Fig. 2C). 6주간 트레드밀 지구성 운동 후 뇌에서 글루코스를 세포 내로 유입시키는 역할을 담당하는 GLUT-1에 미치는 영향을 분석한 결과, 집단 간에 $p<0.001$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타나 사후 검증한 결과, NON STZ-CON 집단과 STZ-CON 집단 간에 $p<0.001$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났으며 STZ-CON 집단과 STZ-EXE 집단 간에 $p<0.001$수준에서 차이가 있는 것으로 나타났다. 마지막으로 NON STZ-CON 집단과 STZ-EXE 집단 간에도 $p<0.001$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났다(Fig. 2D).

집단 간 Cu,Zn-SOD와 Mn-SOD 단백질 발현 수준 차이

STZ를 투여한 SD 쥐에서 6주간 트레드밀 지구성 운동 후 뇌에서 활성산소 제거에 관여하는 항산화제인 Cu, Zn-SOD가 미치는 영향을 뇌 조직에서 분석한 결과(Fig. 3A), NON STZ-CON 집단과 STZ-CON 집단 간에 $p<0.001$ 수준에서 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다. STZ-CON 집단과 STZ-EXE 집단 간에 $p<0.001$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났다. STZ를 투여한 SD 쥐에서 6주간 트레드밀 지구성 운동 후 뇌에서 활성산소제거에 관여하는 항산화제인 Mn-SOD가 미치는 영향을 분리한 미토콘드리아에서 분석한 결과(Fig. 3B) NON STZ- CON 집단과 STZ-CON 집단 간에 $p<0.01$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났으며 STZ-CON 집단과 STZ-EXE 집단 간에 $p<0.01$ 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났다.

고 찰

당뇨병은 심각한 대사성 질환으로서 고혈압, 뇌졸중과 같은

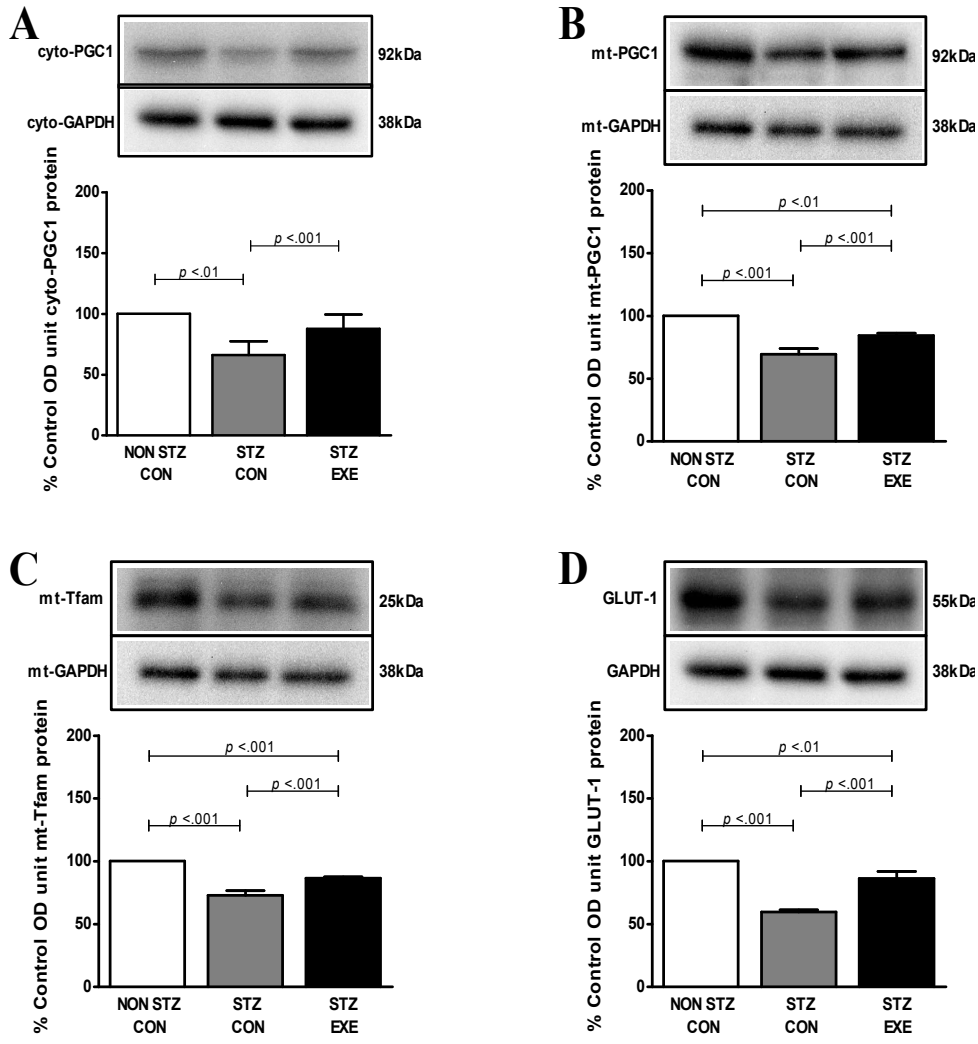

Fig. 2. Effect of exercise training on PGC-1α (A), mito PGC-1α (B), mito Tfam (C), GLUT-1 (D) protein in the brain of STZ-induced diabetic rats and untreated diabetic rats. The expression of PGC-1α, mito PGC-1α, mito Tfam and GLUT-1 in the brain was analyzed by western blot analysis. Values are expressed means±SD of 8 animals/groups.

합병증을 초래할 뿐만 아니라 뇌에서 글루코스 대사의 장애는 학습, 기억력과 인지능력의 감소와도 관련 있다[15,21]. 최근에는 당뇨로 인한 신경퇴행성 뇌질환의 발병 기전 중 미토콘드리아의 기능 이상이 중요하게 관여하는 것으로 보고되고 있다[4,5,16], 특히 제 I 형 당뇨의 경우 고혈당과 함께 산화적 스트레스 수준이 높게 나타남으로써 뇌 허혈, 미세혈관병증, 뇌위축 현상이 유발된다고 Rosen 등[33], Nishikawa 등[26], West 등[42]이 제시하였다. Muranyi 등[25]은 미토콘드리아 기능 이상과 미토콘드리아 의존성 세포사멸 경로가 대부분 제 I형 당뇨병성 허혈에 의한 뇌 손상으로 작용되고 있음을 보고하였다.

또한, 당뇨가 미토콘드리아의 산화적 인산화에 관여하는 유전자의 발현을 감소[24]시켜 미토콘드리아 생성의 변화[1]와 근육에서 PGC-1α의 발현이 감소[29]됨을 주장하였다. 따라서 이 연구는 STZ로 유발된 당뇨 흰쥐를 대상으로 6주간의 트레드밀 지구성 운동이 미토콘드리아 생합성과 글루코스 대사 관련 단백질인 PGC-1α, GLUT-1, Tfam 및 항산화효소인 Cu, Zn-SOD와 Mn-SOD의 발현 양상을 분석하였다.

그 결과 혈중 인슐린 수준(Fig. 1B)은 STZ-CON 집단과 STZ-EXE 집단 간에 유의한 차이는 나타나진 않았지만, 혈중 글루코스 수준(Fig. 1A)은 STZ-CON 집단에 비해 STZ-EXE 집단에서 유의하게 감소한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 인슐린 수준과는 관계없이 글루코스 수준이 유의하게 감소된 것이며, Luis 등[22]의 연구와 일치된 결과로써 인슐린 신호전달이 아닌 지구성 운동으로 인한 또 다른 보상기전에 의해 나타난 결과로 생각된다. 또한 뇌에서의 글루코스 수송을 담

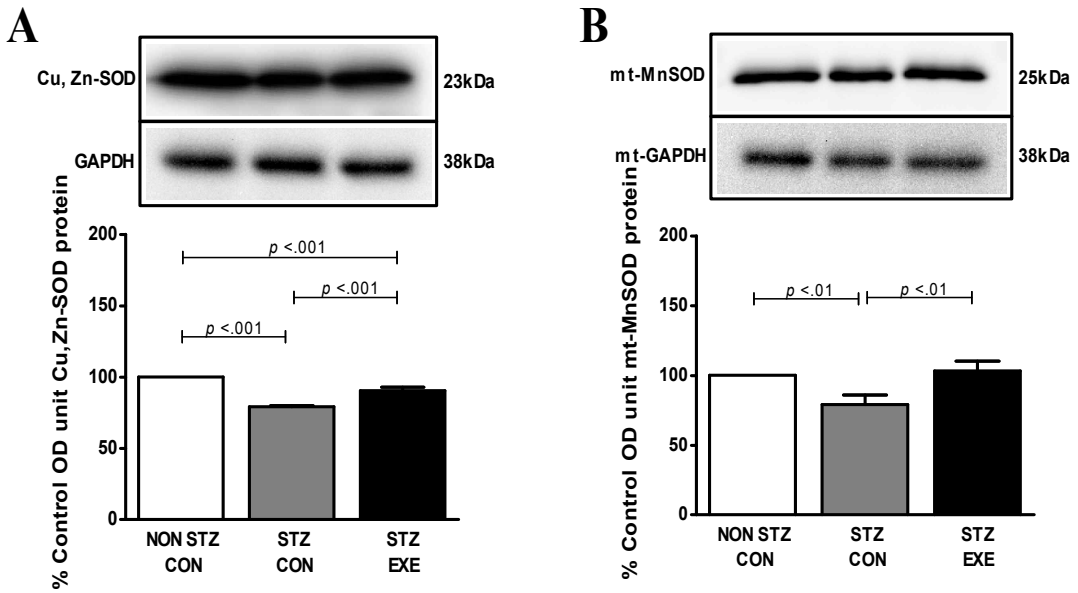

Fig. 3. Effect of exercise training on Cu,Zn-SOD (A), mito Mn-SOD (B) protein in the brain of STZ-induced diabetic rats and untreated diabetic rats. The expression of Cu,Zn-SOD and mito Mn-SOD in the brain was analyzed by western blot analysis. Values are expressed means±SD of 8 animals/groups.

당하는 GLUT-1 단백질(Fig. 2D)의 경우, STZ-EXE 집단이 STZ-CON 집단에 비해 현저하게 증가한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 4주간의 지구성 운동이 당뇨 조건에서 글루코스 유입과 이용의 감소를 보상하기 위해 GLUT-1 단백질 발현을 증가시켰다는 결과[17]와 일치하는 것으로 운동이 당뇨 조건에서 뇌의 글루코스 이용률을 촉진시켜 신경세포의 대사적 요구량을 효율적으로 보상해주어서 나타난 현상으로 판단되며11] 뇌에서 신경세포의 활성을 향상시킬 수 있음을 알 수 있다.

한편 PGC-1α는 심장, 신장, 뇌, 골격근, 갈색지방 등 여러 조직의 핵 DNA에 의해 합성되어 미토콘드리아 생성과 활성을 조절하는 기능을 가지고 있으며[30], 노화와 당뇨 조건하에서 PGC-1α의 발현이 감소되는 것[24,29]처럼 이 연구에서도 PGC-1α를 세포질과 미토콘드리아를 분리하여 실험한 결과(Fig. 2A, 2B), STZ-CON 집단에서 가장 낮게 나타났지만 STZ-EXE 집단은 STZ-CON 집단에 비해 유의하게 증가한 것으로 나타났다. 이는 장기적인 운동 적응에서 PGC-1α의 발현 수준이 증가되었다는 여러 선행연구[4,27,39]들의 결과들과 일치하는 것으로 나타났다.

운동은 세포 내 cAMP와 칼슘(calcium) 수준을 증가시킬 뿐만 아니라 신호전달 물질인 AMPK의 활성을 일으키고, 결국 PGC-1α의 발현을 유도한다[15]고 알려져 있다. 따라서 운동으로 증가된 PGC1-α의 발현은 세포 내 미토콘드리아의 생성과 활성에 관여하는 단백질들의 발현을 증가시킬 뿐만 아니라 Tfam의 발현을 돕는 인자들을 전사시키고[44], 이들 인자들은 미토콘드리아 전자전달복합체의 구성 성분인 β-ATP synthase, cytochrome c, cytochrome c oxidase Ⅳ 등의 발현을 증가시킨다[35]. 더욱이 Tfam이 mitochondria 속으로 이동(translocation)하게 되면 mitochondria의 DNA 복제와 유전자 발현증가를 촉진시킨다[14,19]. 더욱이 이 연구는 STZ으로 유도된 당뇨 쥐의 뇌 미토콘드리아 PGC-1α와 Tfam의 발현은 억제되었지만, 트레드밀 지구성 운동이 PGC-1α와 Tfam 단백질 발현을 증가시킴으로 뇌 조직 내 mtDNA 수를 증가시킬 수 있는 가능성을 보여준 것으로 간주된다.

일반적으로 STZ 투여는 췌장의 β세포에 치명적인 손상을 주기 때문에 당뇨가 유발된다고 알려져 있다. 즉 β세포에서 H_2O_2을 생성을 자극시켜 반응성 산소종 생성을 높이기 때문에 산화적 손상의 결과인 당뇨가 유발[38]된 것으로 설명할 수 있으며, 당뇨로 인한 산화적 손상에 대한 방어기전으로 여러 연구자들은 항산화 효소의 발현 증가에 초점을 두고 있다. Superoxide dismutase (SOD)는 세포 내 호흡작용의 부산물로 나타나는 superoxidie radical을 제거함으로써 과산화수소가 세포 내에 잔존되는 것을 막아주기 때문에 DNA 손상으로부터 보호할 수 있다[20].

이 연구에서도 지구성 운동이 당뇨 조건에서 뇌 조직의 항산화 방어기전을 알아보기 위해 Cu,Zn-SOD와 미토콘드리아 Mn-SOD를 분석하였다. 그 결과 STZ-EXE 집단은 STZ-CON 집단에 비해 Cu,Zn-SOD와 미토콘드리아 Mn-SOD 단백질 발현량이 현저하게 증가한 것으로 나타났다. 이와 같이 당뇨 조건에서 지구성 운동에 의해 항산화 효소의 활성도가 증가한 이유는 장기간 지구성 운동이 세포 내 발전소인 미토콘드리아 내 호흡비율을 높여 ATP 대사 및 산소 소비량이 증가시키고

이를 통해 체내 항산화 효소(Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, catalase)들을 활성화시켜 체내의 산소 독성을 물과 산소로 변환시키는 과정을 촉진시켰기 때문인 것으로 볼 수 있다. 즉 지구성 운동이 세포 내 항상성 유지[36]를 위해 항산화 방어기전을 촉진시킨 것으로 볼 수 있다[10]. 따라서 지구성 운동은 산화적 스트레스가 높은 당뇨 조건에서 뇌의 항산화 효소(Cu,Zn-SOD, Mn-SOD)의 발현량을 증가시켜 당뇨로 인한 mtDNA 손상을 어느 정도 억제하는데 도움을 주는 것으로 판단된다.

결론적으로 트레드밀 지구성 운동은 당뇨 조건에서 뇌 조직의 PGC-1α, GLUT-1, Tfam 단백질의 발현량과 항산화 효소(Cu,Zn-SOD, Mn-SOD)의 활성도를 증가시켜 뇌 조직의 글루코스 이용능력과 미토콘드리아의 생합성에 어느 정도 긍정적인 영향을 미치고 당뇨병으로 인한 산화적 손상으로부터 뇌 조직을 보호하는데 긍정적인 효과를 가져올 것으로 생각된다.

감사의 글

이 연구는 2007년도 한국체육대학교 자체학술연구과제의 부분적인 지원에 의해 수행되었음.

References

1. Anabela, P. R. and M. P. Carlos. 2006. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **212**, 167-178.
2. Atonetti, D. A., C. Reynet, and C. R. Kahn. 1995. Increased expression of mitochondrial-encoded genes in skeletal muscle of humans with diabetes millitus. *J. Clin. Invest.* **95**, 1383-1388.
3. Baar, K., A. R. Wende, T. E. Jones, M. Marison, L. A. Nolte, M. Chen, D. P. Kelly, and J. O. Holloszy. 2002. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB. J.* **16**, 1879-1886.
4. Beauquis, J., P. Roig, F. Homo-Delarche, A. De Nicola, and F. Saravia. 2006. Reduced hippocampal neurogenesis and number of hilar neurones in streptozotocin-induced diabetic mice: reversion by antidepressant treatment. *Eur. J. Neurosci.* **23**, 1539-1546.
5. Bossy-Wetzel, E., M. J. Barsoum, A. Godzik, R. Schwarzenbacher, and S. A. Lipton. 2003. Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 706-716.
6. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* **72**, 248-254.
7. Ceriello, A. 2000. Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism* **49**, 27-29.
8. Cotman, C. W. and C. Engesser-Cesar. 2002. Exercise enhances and protects brain function. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **30**, 75-79.
9. Daniel, P. K. and C. S. Richard. 2004. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev.* **18**, 357-368.
10. De Moraes, C., A. P. Davel, L. V. Rossoni, E. Antunes, and A. Zanesco. 2008. Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. *BMC Physiol.* **8**, 12.
11. Duelli, R. and W. Kuschinsky. 2001. Brain glucose transporters: relationship to local energy demand. *News. Physiol. Sci.* **16**, 71-76.
12. Endo, N., C. Emilio, M. Salvador, and O. C. Michele. 2004. Mitochondrial biogenesis as a cellular signaling framework. *Biochem Pharmacol.* **67**, 1-15.
13. Garesse, R. and C. G. Vallejo. 2001. Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* **263**, 1-16.
14. Hardie, D. G. 2004. AMP-activated protein kinase: a key system mediating metabolic responses to exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* **36**, 28-34.
15. Hou, W. K., Y. X. Xian, L. Zhang, H. Lai, X. G. Hou, Y. X. Xu, T. Yu, F. Y. Xu, J. Song, C. L. Fu, W. W. Zhang, and L. Chen. 2007. Influence of blood glucose on the expression of glucose trans-porter proteins 1 and 3 in the brain of diabetic rats. *Chin. Med. J.* **120**, 1704-1709.
16. Jacobs, H. T. 2003. The mitochondrial theory of aging: dead or alive? *Aging Cell* **2**, 9-10.
17. Jeong, L. G., J. H. Yoon, H. H. Lee, J. O. Kim, T. B. Sel, and M. J. Oh. 2007. Effect of exercise training on expression of GLUT 1 and GLUT 3 protein in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Korean Physical Edu.* **46**, 359-367.
18. Kawamura, M., J. W. Heinecke, and A. Chait. 1994. Pathophysiological concentrations of glucose promote oxidative modification of low density lipoprotein by a superoxide dependent pathway. *J. Clin. Invest.* **94**, 771-778.
19. Larsson, N. G., J. Wang, H. Wilhelmsson, A. Oldfors, P. Rustin, M. Lewandoski, G. S. Barsh, and V. Clayton. 1998. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat. Genet.* **18**, 231-236.
20. Lee, S. Z., S. H. Park, and H. S. Lee. 2001. Chainges in vivo lipid peroxidation and antioxidant defense system in streptozotocin induced diabetic rats: a time course study. *J. Korean Nutr. Soc.* **34**, 253-264.
21. Li, Z. G. and A. A. Sima. 2004. C-peptide and central nervous system complications in diabetes. *Exp. Diabesity Res.* **5**, 79-90.
22. Luis, D. M., B. Lamvert, N. Sash, R. R. Ghazala, P. Norman, and A. F. Paul. 2001. Effect of streptozotocin-induced diabetes on glycogen resynthesis in fasted rats post-high-intensity exercise. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **280**, E83-91.
23. Monsalve, M., Z. Wu, G. Adelmant, P. Puigserver, M. Fan, and B. M. Spiegelman. 2000. Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Mol. Cell* **6**, 307-316.
24. Mootha, V. K., C. M. Lindgren, K. F. Eriksson, A. Subramanian, S. Sihag, J. Lehar, P. Pulgserver, E. Carlsson,

M. Ridderstrale, E. Laurlla, N. Houstls, M. J. Daly, N. Patterson, J. P. Mesirov, T. R. Golub, P. Tamayo, B. Spiegelman, E. S. Lander, J. N. Hirschhorn, D. Altshuler, and L. C. Grouup. 2003. PGC-1, Lpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* **34**, 267-273.

25. Muranyi, M., M. Fujioka, Q. He, A. Han, G. Yong, K. Csiszar, and P. A. Li. 2003. Diabetes activates cell death pathway after transient focal cerebral ischemia. *Diabetes* **52**, 481-486.
26. Nishikawa, T., D. Edelstein, and M. Brownlee. 2000. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int. Suppl.* **77,** S26-30.
27. Norrbom, J., C. J. Sundberg, H. Ameln, W. E. Kraus, E. Jansson, and T. Gustafsson. 2004. PGC-1alpha mRNA expression is influenced by metabolic perturbation in exercising human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **96**, 189-194.
28. 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. *Neuroendocrinol.* **82**, 282-293.
29. Patti, M. E., A. J. Butte, S. Crunkhorn, K. Cusi, R. Berria, S. Kashyap, Y. Miyazaki, I. Kohane, M. Costello, R. Saccone, E. J. Landarker, A. B. Goldfine, E. Mun, R. DeFronzo, J. Finlayson, C. R. Kahn, and L. J. Mandarino. 2003. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in human with insulin resistance and diabetes: potential role of PGC1 and NRF1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 8466-8471.
30. Puigserver, P., Z. Wu, C. W. Park, R. Graves, M. Wright, and B. Spiegelman. 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829-839.
31. Puigserver, P. and B. M. Spiegelman. 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr. Rev.* **24**, 78-90.
32. Reagan, L. P., N. Gorovits, E. K. Hoskin, S. E. Alves, E. B. Katz, C. A. Grillo, G. G. Piroli, B. S. McEwen, and M. J. Charron. 2001. Localization and regulation of GLUT×1 glucose transporter in the hippocampus of streptozotocin diabetic rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 2820-2825.
33. Rösen, P., P. P. Nawroth, G. King, W. Möller, H. J. Tritschler, and L. Packer. 2001. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **17**, 189-212.
34. Sander, M. H. and A. Johan.2004. PGC-1α: Turbocharging Mitochondria. *Cell* **119**, 5-7.
35. Scarpulla, R. C. 2002. Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene* **286**, 81-89.
36. Sen, C. K. 1995. Oxidants and antioxidants in exercise. *J. Appl. Physiol.* **79**, 675-686.
37. Serradas, P., M. H. Giroix, C. Saulnier, M. N. Gangnerau, L. A. Borg, M. Welsh, B. Portha, and N. Welsh. 1995. Mitochondrial deoxyribonucleic acid content is specifically decreased in adult, but not fetal, pancreatic islets of the Goto-Kakizaki rat, a genetic model of noninsulin-dependent diabetes. *Endocrinol.* **136**, 5623-5631.
38. Takasu, N., I. Komiya, T. Asasa, Y. Nagasawa, and T, Yamada. 1991. Streptozotocin- and alloxan-induced H_2O_2 generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. H_2O_2 as mediator for DNA fragmentation. *Diabetes* **40**, 1141-1145.
39. Terada, S. and I. Tabata. 2004. Effects of acute bouts of running and swimming exercise on PGC-1alpha protein expression in rat epitrochlearis and soleus muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **286**, E208-216.
40. Tsai, E. C., I. B. Hirsch, J. D. Brunzell, and A. Chait. 1994. Reduced plasma peroxyl radical trapping capacity and increased susceptibility of LDL to oxidation in poorly controlled IDDM. *Diabetes* **43**, 1010-1014.
41. Yang, W., J. Li, and S. Hekimi. 2007. A Measurable increase in oxidative damage due to reduction in superoxide detoxification fails to shorten the life span of long-lived mitochondrial mutants of Caenorhabditis elegans. *Genetics* **177**, 2063-2074.
42. West, I. C. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet. Med.* **17**, 171-180.
43. Winder, W. W., E. B. Taylor, and D. M. Thomson. 2006. Role of AMP-activated protein kinase in the molecular adaptation to endurance exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* **38**, 1945-1949.
44. Wu, Z., P. Puigserve, U. Andersson, C. Zhang, G. Adelmant, V. Mootha, A. Troy, S. Cinti, B. Lowell, R. C. Scarpulla, and B. M. Spiegelman. 1999. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**, 115-124.

초록 : 트레드밀 지구성 운동이 streptozotocin으로 유발된 당뇨 흰쥐의 뇌에서 PGC-1α, GLUT-1, Tfam 단백질 및 항산화 효소(Cu, Zn-SOD, Mn-SOD)의 발현량에 미치는 영향

박노환[1] · 이진[2] · 정국현[1] · 최봉암[3] · 장형채[1] · 이석인[4] · 이동수[4] · 조준용[1]*

([1]한국체육대학교 운동생화학실, [2]한양대학교 해부세포생물학실, [3]대구대학교 골프학과, [4]중앙대학교 체육교육학과)

이 연구는 지구성 운동이 streptozotocin (STZ)으로 유발된 제 1형 당뇨 특징을 가진 쥐 뇌의 글루코스 운반, 미토콘드리아 기능 및 항산화효소 단백질 발현에 미치는 영향을 규명하는데 목적이 있다. 제 1형 당뇨 모델 쥐는 50 mg/kg의 streptozotocin을 수컷 Sprague-Dawley (SD) 흰쥐의 복강에 1회 주입하여 생산하였으며 본 실험 시 집단은 NON-STZ 집단(n=8), STZ-CON 집단(n=8) 및 STZ-EXE 집단(n=8) 등 3집단으로 구분하여 실시하였다. 트레드밀 지구성 운동은 총 6주, 주 5일, 2주 간격으로 속도를 약 3~4 m/min으로 점증적으로 증가시켰으며 운동시간은 1주와 3주차에 10분씩 증가시켰다. 분석 결과 혈청 글루코스 수준은 STZ-EXE 집단은 STZ-CON 집단에 비해 현저하게 감소(p<0.05)하였으며 PGC-1α (p<0.001), mtPGC-1α (p<0.001), GLUT-1 (p<0.001), Tfam (p<0.001), Cu,Zn- SOD (p<0.001), Mn-SOD (p<0.01) 경우도 STZ-EXE 집단이 STZ-CON 집단에 비해 현저하게 증가하였다. 이러한 결과는 장기간 지구성 운동이 뇌의 글루코스 이용능력과 관련된 단백질인 GLUT-1과 미토콘드리아 기능 향상과 관련된 단백질인 PGC-1α과 Tfam을 증가시키고 산화적 스트레스의 방어 기전으로서 역할을 수행하는 항산화 효소인 Cu,Zn-SOD와 Mn-SOD를 활성화시키는데 긍정적인 역할을 수행한 것으로 나타났다.