

## 지방의 종류가 다른 식이의 섭취가 하지고정 흰 쥐의 근 섬유별 근 위축과 PPAR $\delta$ 활성화에 미치는 영향

이호욱 · 박미나 · 이연숙<sup>§</sup>

서울대학교 식품영양학과, 생활과학연구소

### Effects of Different Types of Dietary Fat on Muscle Atrophy According to Muscle Fiber Types and PPAR $\delta$ Expression in Hindlimb-Immobilized Rats

Lee, Ho-Uk · Park, Mi-Na · Lee, Yeon-Sook<sup>§</sup>

Department of Food and Nutrition/Research Institute of Human Ecology Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

#### ABSTRACT

This study investigated how dietary fat affects muscle atrophy and lipid metabolism in various muscles during hindlimb immobilization in rats. Twenty-four male Sprague-Dawley rats had their left hindlimb immobilized and were divided into four groups by dietary fat content and composition. The contralateral hindlimb (control) was compared with the immobilized limb in all dietary groups. Rats (n = 6/group) were fed a 4% corn oil diet (CO), 2.6% corn oil + 1.4% fish oil diet (FO), 30% corn oil diet (HCO), or a 30% beef tallow diet (HBT) after their hind limbs were immobilized for 10 days. Data were collected for the gastrocnemius, plantaris and soleus muscles. Muscle atrophy was induced significantly after 10 days of hindlimb immobilization, resulting in significantly decreased muscle mass and total muscle protein content. The protein levels of peroxisome proliferator activated receptor  $\delta$  (PPAR $\delta$ ) in the plantaris, gastrocnemius, and soleus increased following hindlimb immobilization irrespective of dietary fat intake. Interestingly, the PPAR $\delta$  mRNA level in the plantaris decreased significantly in all groups and that in the FO group was lower than that in the other groups. The soleus PPAR $\delta$  mRNA level decreased significantly following hindlimb immobilization in the FO group only. Muscle carnitine palmitoyl transferase 1 (mCPT1) mRNA level was not affected by hindlimb immobilization. However, the mCPT1 mRNA level in the FO group was significantly lower in the plantaris but higher in the soleus than that in the other groups. The pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) mRNA level in the plantaris decreased significantly, whereas that in the soleus increased significantly following hindlimb immobilization. The plantaris, but not soleus, PDK4 mRNA level was significantly higher in the FO group than that in the CO group. The increased PPAR $\delta$  protein level following hindlimb immobilization may have suppressed triglyceride accumulation in muscles and different types of dietary fat may have differentially affected muscle atrophy according to muscle type. Our results suggest that  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids may suppress muscle atrophy and lipid accumulation by positively affecting the expression level and activity of PPAR $\delta$  and PPAR $\delta$ -related enzymes, which are supposed to play an important role in muscle lipid metabolism. (Korean J Nutr 2011; 44(5): 355 ~ 365)

**KEY WORDS:** skeletal muscle atrophy, hindlimb immobilization, fish oil, high-fat diet, PPAR $\delta$ .

#### 서론

근 위축은 근세포의 크기가 저하되는 것으로, 노화, 질병, 활동 감소와 같은 근육 비사용에 의해 흔히 유발되는 증상<sup>1,2)</sup>이다. 활동이나 체중부하가 저하되면 골격근은 대사적 손상,

특히 근섬유 단백질의 소실이 발생하고 이로 인해 골격근 질량이 감소하게 된다. 예를 들면, 인간에서는 근섬유의 크기가 활동이 저하된 지 72시간 후에 단백질 분해과정에 의해 약 15% 저하된다.<sup>3)</sup> 하지고정에 의한 근 위축은 근육의 중력 부하를 제거하는 과정으로 근육의 종류에 따라서 다르게 나타난다. 예를 들면, 하지의 반중력근은 soleus, plantaris 그리고 gastrocnemius로 구성되는데, 이들 각각에서 type I과 type II 섬유 비율의 차이가 근 위축에 대한 반응을 다르게 하는 것으로 보고되었다.<sup>4)</sup> 골격근은 일반적으로 type I (oxidative/slow) 또는 type II (glycolytic/fast) 섬유로 이루어진다. Type

접수일: 2011년 6월 14일 / 수정일: 2011년 8월 24일  
채택일: 2011년 10월 16일

<sup>§</sup>To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: lysook@snu.ac.kr

I 섬유는 미토콘드리아가 풍부하고 에너지 생산을 산화적 대사를 통해 얻는 반면, type II 섬유는 IIa, IIx 그리고 IIb로 구성되며, 미토콘드리아가 적고 에너지 생산을 주로 해당 (glycolysis)에 의존 한다.<sup>5)</sup> Soleus는 반중력근에 주로 type I 섬유로 이루어져 있어 근 위축에 영향을 가장 많이 받으며, type II 섬유의 비율이 높은 gastrocnemius, plantaris에서는 근 위축에 덜 민감한 것으로 보고되었다.<sup>4)</sup>

선행 연구<sup>1,2)</sup>에서는, 하지고정에 따른 근 위축과 근 회복에서 무엇보다 중요한 요소는 단백질 분해 억제와 단백질 합성 촉진을 들고 있다. 단백질 대사과정은 세포 내 인슐린 신호전달과 관련된 것으로 알려져 있다. IGF-1/PI3K/Akt pathway는 인슐린 신호전달의 주요 단계로서 downstream target인 FOXO (Forkhead box O)와 mTOR (mammalian target of rapamycin)에 동시에 영향을 주는 것으로 보고되었다. 한편, 근 위축에 의한 지질 산화의 감소는 지질 대사의 불균형을 유발한다. 그 결과, Akt pathway를 억제하여 인슐린 저항을 유발하며 이에 따른 지질대사의 악화로 지질 독성 (lipotoxicity)을 유발하는 것으로 밝혀졌다.<sup>6)</sup> 한편, 근육 내 지질 대사 에서 PPAR $\delta$  (peroxisome proliferator activated receptor  $\delta$ )가 근 위축으로 발생하는 지질대사의 불균형을 개선하는데 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. PPAR $\delta$  receptors는 4개의 영역으로 나누어져 있고, 그 중 리간드와 관련된 영역이 receptors로서의 주된 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다. 이로 인해 PPAR $\delta$ 의 리간드로서 친화력을 증가시키는 EPA, DHA와 같은  $\omega$ -3 PUFA나 PPAR $\delta$ 와 지방산의 결합력을 증가시키는 고지방 식이의 섭취가 근 위축으로 발생하는 근육 내 지질대사의 이상을 개선시킬 수 있다는 가능성이 제시되어 왔다.<sup>7,8)</sup>

PPARs는 지질에 의해 활성화되는 전사 인자로, 체내에서  $\alpha$ ,  $\gamma$  그리고  $\delta$ 의 형태로 존재한다. 골격근에서 PPAR $\delta$ 의 활성화는 지방산 산화를 촉진함으로써, 지방 축적을 억제하며, 간의 포도당 분비를 감소시킨다. 또한, 지방산 산화의 속도 조절 효소로서 작용하는 MCPT1 (muscle carnitine palmitoyl transferase 1)과 당의 산화를 억제하여 지방산 산화를 촉진하는 PDK4 (pyruvate dehydrogenase kinase 4)와 같은 효소의 발현을 증가시키는 것이 이미 확인된 바 있다.<sup>9)</sup>

선행연구<sup>1,2)</sup>에서  $\omega$ -3 PUFA는 근 사용 감소에 따른 근 위축을 억제하고 근 위축 후의 근 회복을 촉진시킬 수 있는 높은 가능성을 가지고 있는 영양소로서, 인슐린 저항의 억제, 인슐린 신호전달 향상 등을 보고하였다. 반대로 고지방 식이 또는 포화지방 식이는 soleus에서 지방산 흡수와 중성지방으로의 에스테르화를 증가시키지만, 지방산 산화를 억제하고 지질대사의 불균형을 유발함으로써 지질축적 현상을 일으킴이 보고

되었다.<sup>10-12)</sup> 이와 같이, 근육 내 지질대사가 식이 지방산, 특히  $\omega$ -3 PUFA에 의해 영향을 받는 것을 고려해 볼 때, 다양한 지방의 종류 및 수준에 따라라도 영향을 받을 것으로 사료되나 검토된 바가 없다. 따라서, 본 연구에서는 PPAR $\delta$ 의 활성을 조절하는 것으로 알려진  $\omega$ -3 PUFA 및 고지방 식이를 실험동물에 공급하여 근육 종류에 따라 하지고정 처치, 즉 근 위축동안 근육 내 화학조성과 PPAR $\delta$  및 관련 효소들이 어떻게 영향을 받는지에 대해서 검토하였다.

## 연구 방법

### 실험 설계 및 식이

실험동물은 생후 9주령의 성숙 흰쥐 (Sprague-Dawley rat)를 공급 (오리엔트바이오 주식회사, 경기도 성남)받아 사육하였다. 실험동물의 구입과 사육의 전 과정은 서울대학교 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee; IACUC)의 승인을 받아 수행하였다. 실험동물을 pellet diet로 3일간 적응시킨 후, 4개의 군으로 나누고 모두 왼쪽다리에 하지고정 처치를 시행하였다. 하지고정 후, 지방의 종류와 수준이 다른 4종류의 실험 식이를 10일간 공급하였다. 실험 식이의 조성은 Table 1과 같다. 실험 식이는 각각 정상 옥수수유 식이 (CO; 4% Corn oil), 정상 어유식이 (FO; 2.6% Corn oil + 1.4% Fish oil), 고지방 옥수수유 식이 (HCO; 30% Corn oil), 고지방 우지 식이 (HBT; 30% Beef tallow)로 구성하였다. 실험 식이와 3차 탈 이온수는 자유 급여법 (ad libitum)으로 급여하고 온도, 습도, 명암이 각각  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $55 \pm 5\%$ , 12시간 주기 (7:00~19:00)로 조절되는 실험실에서 사육하였다.

### 하지고정 처치

하지고정은 선행연구<sup>1,2)</sup>와 거의 동일하게 수행하였다. Pellet diet로 적응시킨 후, 실험동물을 체중 100 g당 0.04 mL의 zoletil을 근육 내 주사하여 마취 하였다. 미리 만들어진 하지고정 장치로 몸에 맞추어 입히고, micropore tape으로 왼쪽 발목을 감싸고, 왼쪽 발목의 full plantar flexion에서 접착 tape을 이용하여 하지고정 장치와 함께 고정하였다. 하지고정 장치는 면을 이용한 T-shirt 모양의 상의부분과 이와 연결되어 접착 tape으로 가장자리가 보호된 stainless steel mesh의 하의 부분으로 구성되며, 실험 중 사용되는 stainless steel mesh의 변형을 막기 위해 강철 막대를 stainless steel mesh의 앞에 부착하였다.

### 시료 수집

하지고정 장치 시행과 실험식이 급여 10일 후에 실험동물을 12시간 절식시킨 후 Zoletil (Virbac, Carros, France)을 체중

**Table 1.** Composition of the experimental diets

Ingredient	Corn oil diet (CO)	Fish oil diet (FO)	High corn oil diet (HCO)	High beef tallow diet (HBT)
Corn starch	620.692	620.692	360.692	360.692
Casein	140	140	140	140
Sucrose	100	100	100	100
Corn oil	40	26	300	0
Beef tallow	0	0	0	300
Fish oil	0	14	0	0
Cellulose	50	50	50	50
AIN-93M mineral mixture	35	35	35	35
AIN-93VX vitamin mixture	10	10	10	10
DL-Methionine	1.8	1.8	1.8	1.8
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5
Tert-Butylhydroquinone	0.008	0.008	0.008	0.008

100 g당 0.04 mL씩 근육 내 주사하여 마취 시킨 뒤 시료를 채취하였다. 혈액은 경동맥에서 채취하였으며 4°C에서 2~3시간 정도 방치 후, 3,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 이 혈청은 분석 전 까지 -80°C에서 냉동 보관하였다. 혈액 채취 후 하지의 soleus, plantaris와 gastrocnemius 근육을 적출하여 조직에 붙은 부착물을 깨끗이 제거하고 생리식염수 (0.9% NaCl)에 조직을 잘 세척하여 여과지로 물기를 제거한 후 생 조직의 무게를 측정하였다. 무게 측정 후 분석 때까지 냉동 보관 (-80°C)하였다.

**시료 분석**

**근육 총 단백질 함량 분석**

근육 조직의 총 단백질 분석은 Kjeldahl법<sup>13)</sup>을 이용하였다. 냉동된 gastrocnemius 근육의 일부분 (약 0.2 g)을 자동질소 분석장치 (Kjeltec System 1026 Distilling Unit, Tecator Co.)를 이용하여 반응시켰다. 증류된 삼각 플라스크에 0.1 N 염산을 가해 적정하였고, 시료의 조단백질 함량을 계산하였다.

**근육 중성지방 분석**

근육 조직의 중성지방 분석은 Folch법<sup>14)</sup>을 이용하였다. 냉동된 근육 시료의 일부분 (약 0.2 g)을 잘라내어, chloroform : methanol (2 : 1)의 혼합액을 가해 균질화하여 Folch 등의 추출방법에 따라 총 지질을 추출한 후, 중성지방 측정용 시액 (아산제약 TG-S, AM157S-K, 서울)을 이용하여 측정하였다.

**Western blot 분석**

근육 조직에서 Western blot 분석은 본 연구실의 선행 연구<sup>1,2)</sup>와 동일하게 수행 하였다. 근육 조직의 균질화는 Polytron (~27,000 rpm)을 이용하여 10초간 하였다. 조직 분쇄액을 30분 정도 방치 후, 12,000 g에서 30분 동안 원심분리 하였다. 단백질 농도는 bicinchoninic acid (BCA)(Pierce Biotech-

nology, Rockford, IL) 단백질 분석법으로 측정하였다. 변성된 단백질 시료를 20 µg씩 각각 loading하고 7.5% SDS-PAGE상에서 전기영동한 후, PVDF membrane (Millipore, Charlottesville, VA)으로 transfer시켰다. 각각의 membrane을 1 : 1,000의 비율로 희석된 PPARδ (SC-7197, Santa cruz, U.S.A) specific 1차 항체로 4°C에서 하룻밤동안 반응시키고, HRP (Horse Radish Peroxidase-conjugated) 2차 항체 (Amersham, Piscataway, NJ)로 실온에서 1시간 반응시켰다. 마지막으로 membrane에 부착된 단백질을 화학발광 시액 플러스 (west dura super signal plus, Pierce, Rockford, IL)로 detection 시킨 후, Kodak X-Ray film으로 가시화했다. 단백질 정량분석은 이미지 분석 프로그램 (Image J 1.44 densitometric software)을 이용하여 산출하였다. 모든 실험에 있어, 각각의 lane에 loading양과 단백질의 전기이동 여부를 확인하기 위해 Ponceau S와 Coomassie blue를 membrane과 gel의 염색에 각각 사용하였다.

**RNA추출 및 Real-Time PCR**

Total RNA는 모든 군의 Soleus, Plantaris로부터 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 분리해냈다. total RNA의 농도와 순도는 260과 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. Real-Time PCR 반응은 Taqman gene expression master mix 시액과 StepOne Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA)을 이용하여 48-well 형식으로 2반복 하였다. Rat-specific Taqman primer/probe sets를 PPARα, PPARδ, mCPT1b, PDK4 gene expression: peroxisome proliferator activated receptor α (PPARα): Rn00566193\_ml; peroxisome proliferator activated receptor δ (PPARδ): Rn00565707\_ml; muscle carnitine palmitoyltransferase 1b (mCPT1b): Rn01407781\_ml; pyruvate dehydrogenase kinase

isozyme 4 (PDK4): Rm00585577\_ml; peptidyl prolyl isomerase B (cyclophilin B): Rn00574762\_ml을 감지하기 위해 사용하였다. Cyclophilin B probe 세트는 골격근 비사용에 영향을 받지 않기 때문에 endogenous control로 모든 반응에 사용하였다. 각각의 gene expression의 relative quantification은 comparative Ct값 (Threshold cycle)을 사용하여 측정하였다.

### 통계분석

데이터 분석은 SPSS 17.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 사용하였다. paired *t*-test를 하지고정을 한 다리 (immobilized)와 각각의 정상다리 (contralateral)의 근육들 사이에 차이를 비교하기 위해 사용 하였다. 각각의 근육에서 하지고정된 다리와 정상다리의 비교는 unpaired *t*-test를 사용하여 측정하였다. 모든 측정값은 mean  $\pm$  standard error (mean  $\pm$  S.E)로 나타냈다. 실험 식이군 간의 유의성은 one-way ANOVA test 후  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검증하였으며, 통계적 유의성은  $p < 0.05$  또는  $p < 0.01$ 에서 측정하였다.

## 결 과

### 체중 변화량, 식이 섭취량 및 혈청지방산

실험 기간 10일 동안의 체중 변화와 혈중 지방산 변화를 Table 2에 제시하였다. 10일 간의 하지 고정 후, HBT군을 제외한 CO, FO 그리고 HCO군의 체중이 감소하였으나, 체중 변화에는 식이군 간의 유의적인 차이가 없었다. 1일 식이 섭취량은 고지방 식이 군에서 더 적은 섭취를 보였으나 유의적이지는 않았다. 혈청 비 에스테르화 지방산 (NEFA)과 중성 지방 (TG)의 수준은 모두 HCO군에서 가장 낮았으나 식이군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다.

### 근육 무게 변화량

근육 양의 변화를 Table 3에 제시하였다. 하지고정 후에 모든 식이 군에서 soleus (SOL), plantaris (PL), gastrocnemius (GAST)의 각각의 근육 무게는 정상다리 (contralateral)의 근육보다 유의적으로 감소하였다 ( $p < 0.01$ ). 그러나, 식이 지방의 종류와 수준에 따른 차이는 보이지 않았다. 이들 근육에서 100 g 체중으로 환산한 근육 양의 변화는 Fig. 1에 제시하였다. Soleus 근육에서 약 57%, plantaris 근육에서는

**Table 2.** Body weight, food intake and serum lipids of rats fed different diets during hindlimb immobilization<sup>1)</sup>

	CO	FO	HCO	HBT
Initial body weight (g)	338.08 $\pm$ 4.48	340.92 $\pm$ 3.53	338.43 $\pm$ 10.22	335.75 $\pm$ 2.59
Final body weight (g)	324.78 $\pm$ 14.94	334.33 $\pm$ 6.97	322.93 $\pm$ 28.69	339.8 $\pm$ 5.24
Body weight change (g)	-13.3 $\pm$ 3.89 <sup>NS</sup>	-6.58 $\pm$ 1.35	-15.5 $\pm$ 2.41	4.05 $\pm$ 1.36
Food Intake (g/day)	16.54 $\pm$ 1.65 <sup>NS</sup>	18.35 $\pm$ 0.60	12.74 $\pm$ 0.88	15.12 $\pm$ 1.24
Serum NEFA <sup>2)</sup> (mEq/L)	0.769 $\pm$ 0.081 <sup>NS</sup>	0.617 $\pm$ 0.033	0.612 $\pm$ 0.100	0.706 $\pm$ 0.118
Serum TG <sup>3)</sup> (mg/dL)	78.49 $\pm$ 17.74 <sup>NS</sup>	66.63 $\pm$ 9.60	57.84 $\pm$ 13.59	65.93 $\pm$ 15.82

1) Values are the Mean  $\pm$  SE (n=6) 2) NEFA: nonesterified fatty acid 3) TG: triglyceride

NS: not significantly different among diet groups. Value with the different letters in the same row are not significantly different at ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test

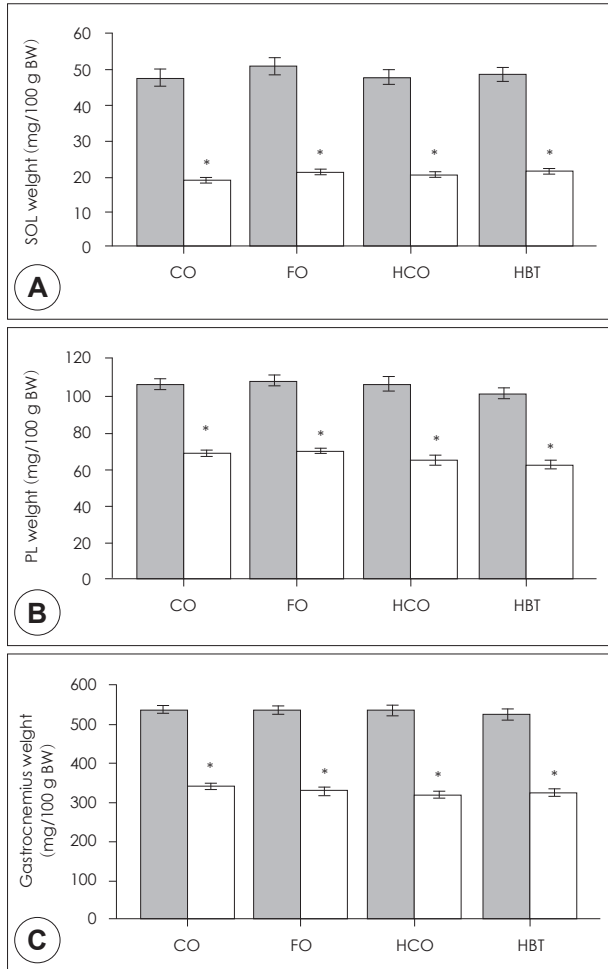
**Table 3.** The fresh weights of soleus, plantaris and gastrocnemius of rats fed different diets during hindlimb immobilization<sup>1)</sup> (mg)

		CO	FO	HCO	HBT
Soleus	Contralateral	155 $\pm$ 18.7	170 $\pm$ 19.8	154 $\pm$ 23.7	165 $\pm$ 15.2
	Immobilized	67 $\pm$ 8.2**	72 $\pm$ 7.5**	61 $\pm$ 9.0**	73 $\pm$ 5.2**
	Difference <sup>2)</sup>	-88.3 $\pm$ 11.7 <sup>NS</sup>	-98.3 $\pm$ 14.7	-92.9 $\pm$ 18.9	-91.7 $\pm$ 11.7
Plantaris	Contralateral	345 $\pm$ 42.8	362 $\pm$ 32.5	343 $\pm$ 25.6	345 $\pm$ 13.8
	Immobilized	208 $\pm$ 17.2**	233 $\pm$ 20.7**	223 $\pm$ 23.6**	210 $\pm$ 12.6**
	Difference	-136.7 $\pm$ 28.0 <sup>NS</sup>	-128.3 $\pm$ 23.2	-120 $\pm$ 18.3	-135 $\pm$ 18.7
Gastrocnemius	Contralateral	1,737 $\pm$ 199.9	1,792 $\pm$ 112.1	1,734 $\pm$ 132.8	1,780 $\pm$ 88.5
	Immobilized	1,037 $\pm$ 90.9**	1,103 $\pm$ 130.6**	1,101 $\pm$ 105.4**	1,102 $\pm$ 43.1**
	Difference	-700 $\pm$ 121.8 <sup>NS</sup>	-688.3 $\pm$ 121.2	-632.9 $\pm$ 77.8	-678.3 $\pm$ 123.8

1) Values are the Mean  $\pm$  SE (n=6) 2) Difference = immobilized-contralateral

Statistical significance was determined by *t*-test, where p-value is \*\*:  $p < 0.01$ : immobilized vs. diet-matched contralateral muscle NS: not significantly different among diet groups. Value with the different letters in the same row are not significantly different at ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test

약 39%, 그리고 gastrocnemius 근육에서는 약 38%의 감소를 보였다. 특히 soleus 근육에서 근 위축에 따라 감소량이 가장 컸다 (SOL > PL > GAST)( $p < 0.01$ ). 하지만, 위축 정도에 있어 식이군 간에는 차이가 없었다.



**Fig. 1.** Effects of hindlimb immobilization on skeletal muscle weight. Muscle weights normalized to body weights were assessed immediately after ten days of immobilization in the soleus (SOL), plantaris (PL) and gastrocnemius in rats fed corn oil (CO), fish oil (FO), high corn oil (HCO) or high beef tallow (HBT) diet. The data for contralateral and immobilized muscles are represented by black bars and open bars, respectively. Values are expressed as the mean  $\pm$  SE (n = 6). Statistical significance: \*:  $p < 0.01$  immobilized vs. diet-matched contralateral muscle. The data for immobilized muscles among diet groups is not significantly different at ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

**Table 4.** Total protein contents in gastrocnemius muscle<sup>1)</sup>

		CO	FO	HCO	HBT
Total protein	Contralateral	400.6 $\pm$ 16.1	412.6 $\pm$ 13.2	395.6 $\pm$ 8.9	398.4 $\pm$ 4.7
	Immobilized	234.9 $\pm$ 8.5*	247.6 $\pm$ 11.9*	250.3 $\pm$ 9.8*	246.8 $\pm$ 4.7*
	Difference <sup>2)</sup>	-165.8 $\pm$ 6.0 <sup>NS</sup>	-164.9 $\pm$ 8.0	-145.3 $\pm$ 2.5	-151.6 $\pm$ 3.4

1) Values are the Mean  $\pm$  SE (n = 6) 2) Difference = immobilized-contralateral

NS: not significantly different among diet groups. Value with the different letters in the same row are not significantly different at ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test

Statistical significance was determined by *t*-test, where *p*-value is \*:  $p < 0.01$ : immobilized vs. diet-matched contralateral muscle

### 근육 중 단백질 및 중성지방량

Gastrocnemius에서 분석한 총 단백질량과 gastrocnemius와 plantaris에서 분석한 중성지방량을 Table 4와 5에 제시하였다. 총 단백질 함량은 10일 간의 하지고정 후에 gastrocnemius 근육에서 모두 유의적으로 감소 (CO, 41%; FO, 40%; HCO, 37%; HBT, 38%)하였다. 그러나, 식이군 간의 유의적인 차이는 없었다. 중성지방량은 plantaris 근육 (CO, 39%; FO, 27%; HCO, 38%; HBT, 35%)과 gastrocnemius 근육 (CO, 38%; FO, 34%; HCO, 33%; HBT, 34%)에서 모두 유의적인 감소를 보였다. 식이에 의해서는, plantaris에서 FO군에서 가장 적은 감소를 보였으나 두 근육에서 모두 유의적인 차이는 없었다.

### 근육 내 지질대사 관련 단백질 및 mRNA 발현량

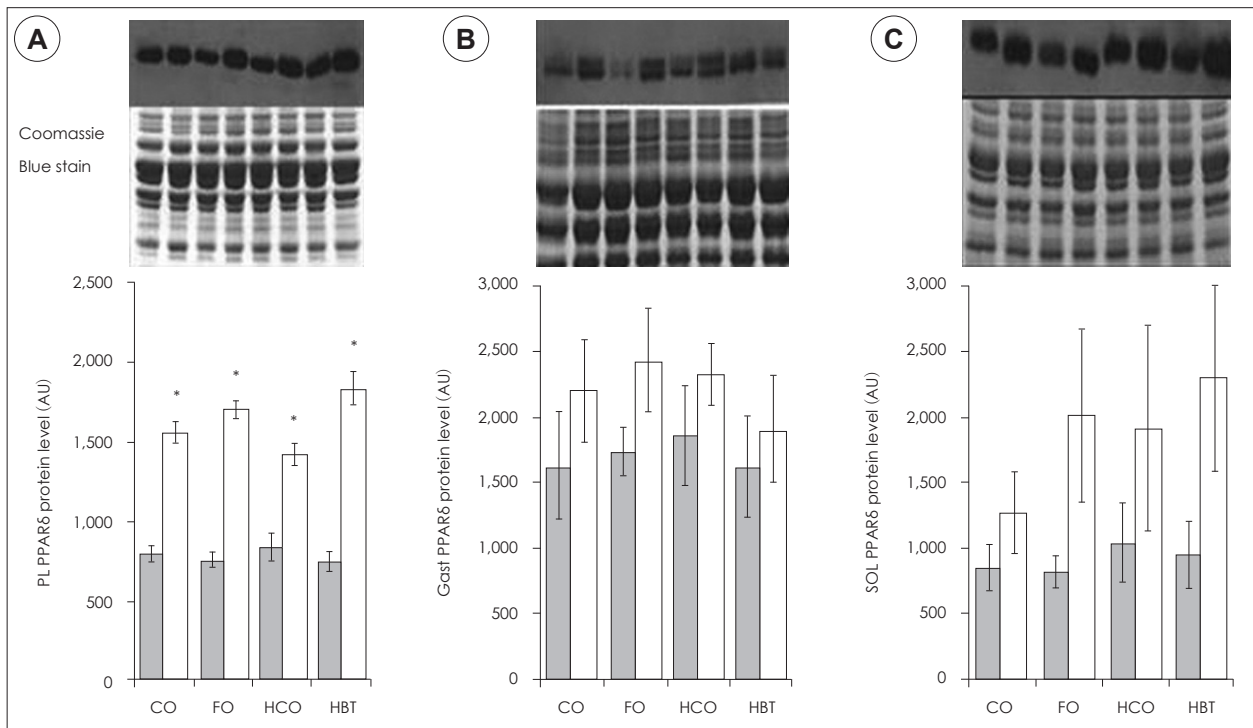
Plantaris, gastrocnemius, 그리고 soleus에서 분석한 PPAR $\delta$  단백질 발현 양을 Fig. 2에 나타내었다. PPAR $\delta$  단백질의 발현은 하지고정에 의해 세 근육에서 모두 증가하였다. Plantaris, soleus에서 분석한 PPAR $\alpha$  및  $\delta$ 의 mRNA 발현 양을 Fig. 3에 제시하였다. 하지고정에 의해서 PPAR $\delta$ 의 단백질 발현이 증가한 것은 PPAR $\delta$ 의 mRNA 발현 양의 증가에 의한 것인지 분석한 결과, plantaris에서는 하지고정에 의해 mRNA 발현 양이 오히려 유의적인 감소율을 보였다 (CO, 31.5%; FO, 45.2%; HCO, 39.4%; HBT, 26.9%). 한편, Soleus에서는 FO군에서만 다른 식이 군에 비해 낮은 수준을 보였다. 식이에 의해 plantaris의 경우, 어유 섭취군 (FO)에서 PPAR $\delta$  mRNA 발현이 정상 다리와 하지고정 다리 모두에서 가장 낮은 수준을 보였다. Soleus에서는 FO (contralateral, 74%; immobilized, 87%), HCO (contralateral, 56%; immobilized, 49%) 그리고 HBT (contralateral, 89%; immobilized, 77%)군 모두 CO군보다 낮은 발현 수준을 보였다. 반면, PPAR $\alpha$  mRNA 발현 양은 두 근육에서 모두 하지고정이나 식이중재에 의해 유의적으로 영향을 받지 않았다.

PPARs와 관련되어 근육 내 지방 대사를 조절하는 효소들의 mRNA 발현 양을 Fig. 4에 제시하였다. 근육 내 지방 대사의 속도 조절 효소로 알려진 mCPT1은 plantaris와 soleus에서 모두 하지고정에 따른 mRNA 발현의 변화를 보이지

**Table 5.** Triglyceride contents in plantaris, gastrocnemius muscle<sup>1)</sup>

(mg)

		CO	FO	HCO	HBT
PL	Contralateral	19.22 $\pm$ 1.5	18.16 $\pm$ 0.6	21.50 $\pm$ 0.4	17.91 $\pm$ 0.8
	Immobilized	11.71 $\pm$ 0.9*	13.17 $\pm$ 1.2*	13.23 $\pm$ 0.4*	11.39 $\pm$ 0.6*
	Difference <sup>2)</sup>	-7.50 $\pm$ 0.4 <sup>NS</sup>	-4.99 $\pm$ 0.5	-8.26 $\pm$ 0.2	-6.52 $\pm$ 0.5
GAST	Contralateral	11.98 $\pm$ 0.7	11.00 $\pm$ 0.6	12.55 $\pm$ 0.2	11.99 $\pm$ 0.6
	Immobilized	7.33 $\pm$ 0.1*	7.18 $\pm$ 0.6*	8.40 $\pm$ 0.7*	7.75 $\pm$ 0.4*
	Difference	-4.65 $\pm$ 0.3 <sup>NS</sup>	-3.82 $\pm$ 0.3	-4.15 $\pm$ 0.5	-4.23 $\pm$ 0.3

1) Values are the Mean  $\pm$  SE (n = 6) 2) Difference = immobilized-contralateralStatistical significance was determined by *t*-test, where p-value is \*: p < 0.01: immobilized vs. diet-matched contralateral muscle NS: not significantly different among diet groups. Value with the different letters in the same row are not significantly different at (p < 0.05) by Duncan's multiple range test**Fig. 2.** Increased protein expressions of peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)  $\delta$  by hindlimb immobilization. Protein levels of PPAR $\delta$  were determined by western blotting immediately after ten days of immobilization in plantaris (PL) (A), gastrocnemius (GAST) (B) and soleus (SOL) (C) in rats fed corn oil (CO), fish oil (FO), high corn oil (HCO) or high beef tallow (HBT) diet. The data for contralateral and immobilized muscles are represented by black bars and open bars, respectively. The representative western blot bands are displayed with Coomassie Blue Stained gel to verify equal loading. Values are expressed as the mean  $\pm$  SE [n = 6 (PL, GAST) or 3 (SOL)]. Statistical significance: \*: p < 0.05 immobilized vs. diet-matched contralateral muscle.

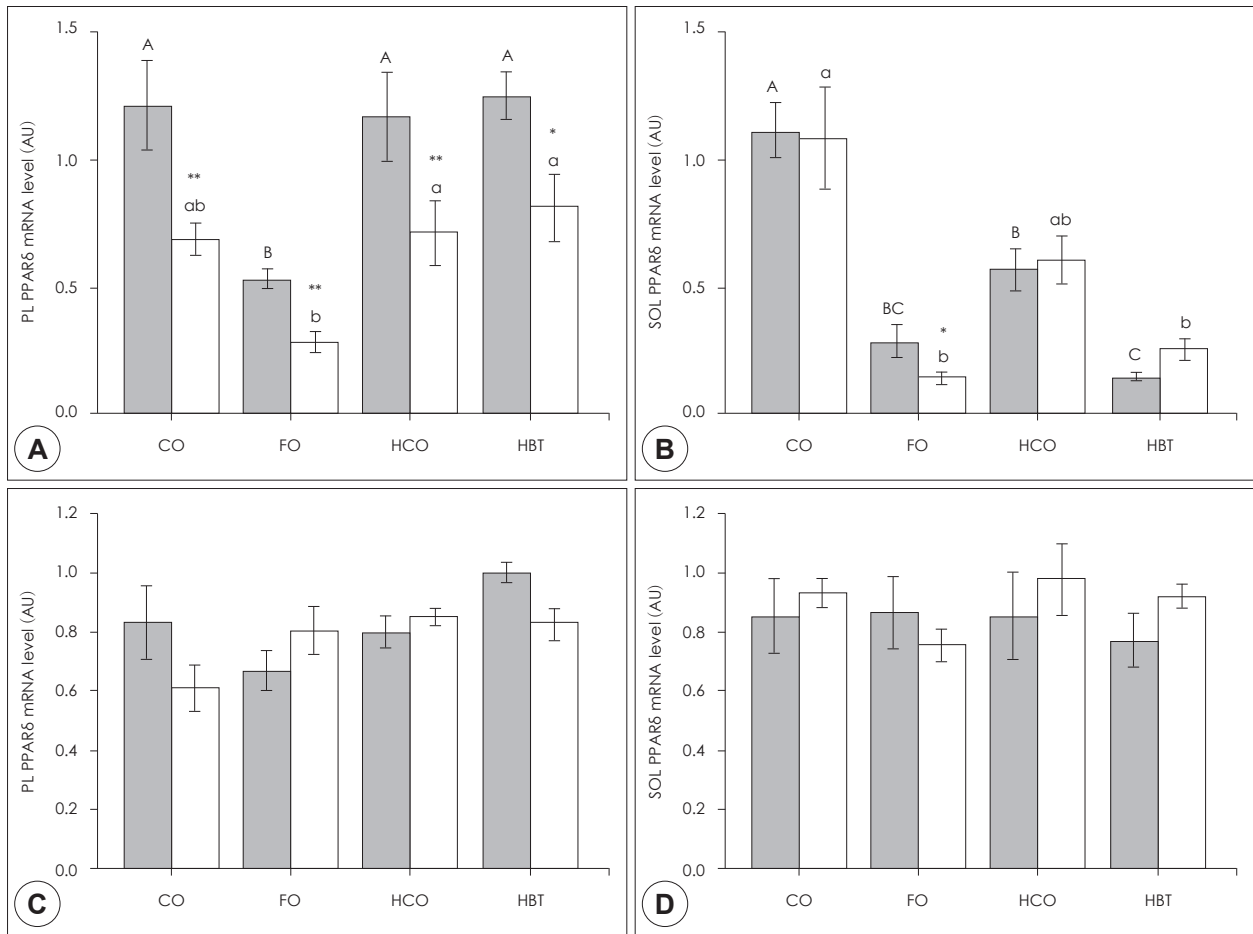
않았다. 식이에 따른 차이로는, plantaris에서는 FO군에서 mCPT1의 발현이 유의적으로 가장 낮은 수준 (p < 0.05)을 보였다. 반대로, soleus에서는 FO군의 발현이 유의적으로 가장 높은 수준 (p < 0.05)을 보였다.

당의 산화를 억제하고 지질대사를 촉진하는 PDK4 mRNA 발현 양은 plantaris에서는 하지고정에 의해 유의적인 감소 (CO, 38%; FO, 16%; HCO, 29%; HBT, 32%)를 보인 반면, soleus에서는 약 2~4배 까지 유의적인 증가 (CO, 252%; FO, 169%; HCO, 237%; HBT, 371%)를 보였다. 식이에 의해 plantaris에서는 정상다리 FO군에서 mRNA 발현 양이 유의

적으로 가장 높은 수준 (p < 0.05)을 보였으나, 하지고정 다리에서는 차이가 없었다. 한편, soleus에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

## 고찰

지금까지 하지고정에 의한 근 위축을 경감하기 위한 영양 중재 연구는 대부분 단백질, 호르몬 그리고 항산화제에 한정되어져 왔다. 그러나, 지방 특히  $\omega$ -3 PUFA는 근육 비사용에 따른 근 위축을 억제할 수 있는 높은 가능성을 가진 영양소



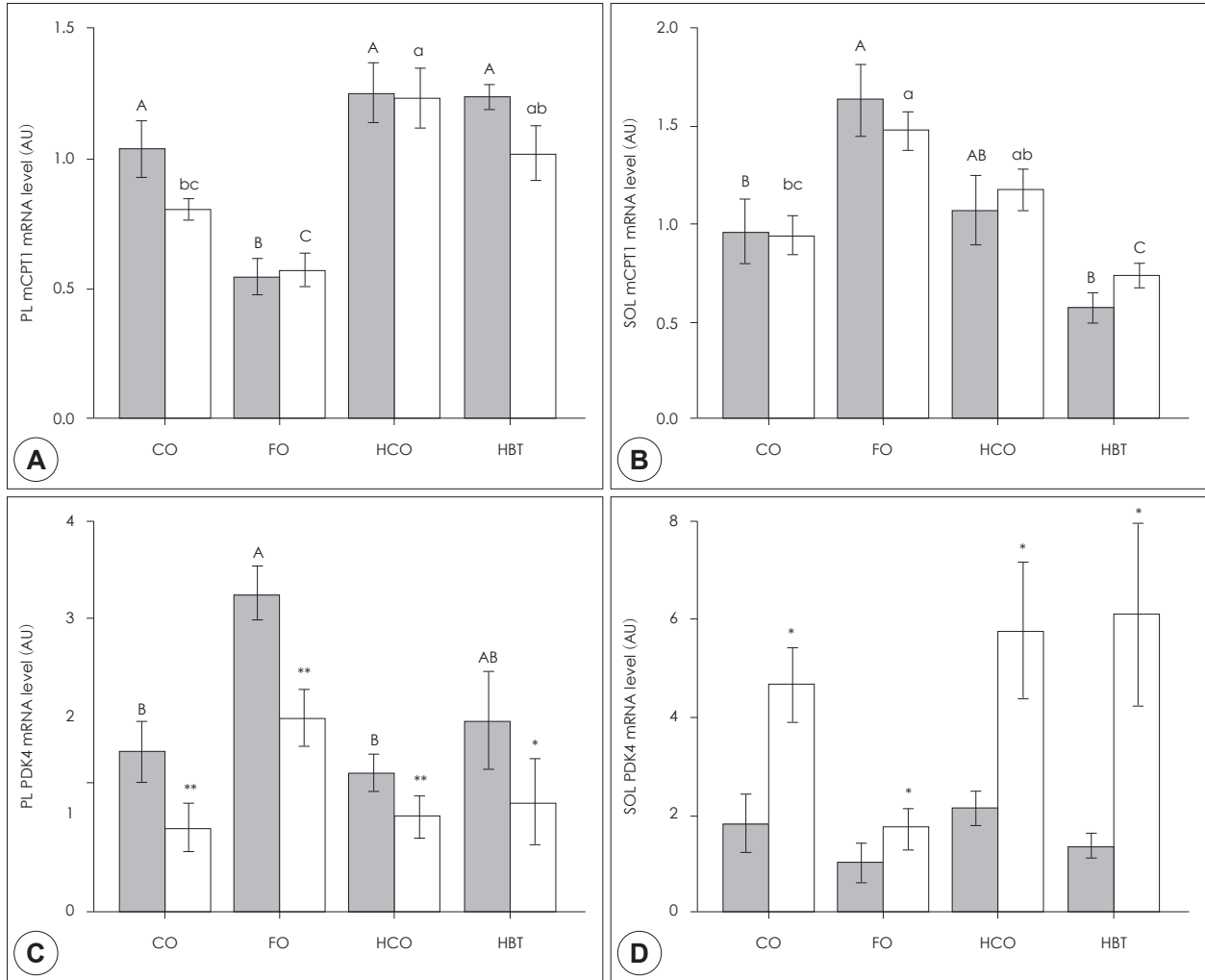
**Fig. 3.** Effects of hindlimb immobilization on gene expression of peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)  $\delta$  and PPAR $\alpha$ . mRNA levels were determined by real time-polymerase chain reaction immediately after ten days of immobilization in plantaris (PL) (A) and soleus (SOL)(B) for PPAR $\delta$ , and in PL (C) and SOL (D) for PPAR $\alpha$  in rats fed corn oil (CO), fish oil (FO), high corn oil (HCO) or high beef tallow (HBT) diet. The data for contralateral and immobilized muscles are represented by black bars and open bars, respectively. Values are expressed as the mean  $\pm$  SE (n = 6). Statistical significance: \*: p < 0.05, \*\*: p < 0.01 immobilized vs. diet-matched contralateral muscle, respectively; capital letters denote comparisons among contralateral muscles of all diet groups at p < 0.05; small letters denote comparison among immobilized muscles of all diet groups at p < 0.05.

로서, 하지고정에 의한 비정상적인 지질대사의 유발을 억제하여 이로 인한 인슐린 신호 전달의 손상을 막는 것으로 보고되었다.<sup>1)</sup> 근육 내 지질대사가 식이 지방산, 특히  $\omega$ -3 PUFA에 의해 영향을 받는 것을 고려해 볼 때, 다양한 지방의 종류에 따라 영향을 받을 것으로 사료되나 검토된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 지방의 종류가 다른 식이의 섭취가 하지고정 흰 쥐에서 근 섬유별 근 위축과 PPAR $\delta$  발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 수행되었다.

10일간의 하지고정 후에 모든 식이 군에서 근육무게의 유의적인 감소는 유사한 방법으로 근 위축을 유발한 다른 모델에서 관찰된 결과<sup>15,16)</sup>에서 이미 보고된 바 있다. Gastrocnemius에서 측정된 근육 총 단백질량과 plantaris, gastrocnemius에서 측정된 중성지방량의 감소는 하지고정에 의해 발생한 전체 근육 양의 감소에 의한 것으로 사료된다. 본 연구와 같이

한쪽 다리 하지고정을 사용한 연구<sup>17)</sup>에서도 근 위축과 함께 근육 총 단백질량의 유의적인 감소를 보고하였다. 이들에서는 근 위축이 하지고정 3일에 유의적으로 발생하였고, 3일부터 5일까지는 근 위축 정도에 차이가 없었다. 본 연구의 결과는 10일간의 하지고정 동안에 근 위축에 따른 단백질의 감소를 보상하는 기전이 작용했을 것으로 사료된다. 이는 단백질 합성 및 근육 총 mRNA가 5일간의 하지고정 후에 감소되지 않음<sup>17)</sup>과 근 단백질 분해의 주요 기전으로 알려진 ubiquitin-proteasome pathway가 하지고정 3일 후부터 다시 정상수준으로 돌아오는 것<sup>18)</sup>으로 사료된다.

본 연구의 결과 PPAR $\delta$  단백질은 모든 근육에서 증가한 반면, plantaris의 mRNA발현은 모든 군에서 감소하였고, soleus에서는 FO군에서만 감소하였다. Ehrenborg와 Krook<sup>7)</sup>은 PPAR $\delta$ 는 골격근에서 주로 발현되며 활성화됨에 따라 골격



**Fig. 4.** Effects of hindlimb immobilization on gene expression of key enzymes in lipid metabolism. mRNA levels were determined by real time-polymerase chain reaction immediately after ten days of immobilization in plantaris (PL)(A, C) and soleus (SOL)(B, D) for muscle carnitine palmitoyltransferase (mCPT) 1 (A, B), pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) 4 (C, D) in rats fed corn oil (CO), fish oil (FO), high corn oil (HCO) or high beef tallow (HBT) diet. The data for contralateral and immobilized muscles are represented by black bars and open bars, respectively. Values are expressed as the mean  $\pm$  SE ( $n = 6$ ). Statistical significance: \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$  immobilized vs. diet-matched contralateral muscle, respectively; capital letters denote comparisons among contralateral muscles of all diet groups at  $p < 0.05$ ; small letters denote comparison among immobilized muscles of all diet groups at  $p < 0.05$ .

근 내의 지질 대사에 관여하여 지질 축적을 억제함을 보고하였고, 단기 (~1일)적인 근육 비사용에 따라서 PPAR $\delta$  mRNA의 발현은 증가하였지만 장기 (12일~)적으로는 대조군과 차이가 없음이 보고되었다.<sup>19,20)</sup> 이들은 PPAR $\delta$  mRNA 발현이 근육 비사용 초기에 한정되어 증가함을 규명하였다. 또한, PPAR $\delta$  발현은 운동에 의해 증가됨이 이미 보고된 바 있으며, 운동에 의한 근 수축의 증감이 PPAR $\delta$  mRNA 발현에 중요한 조절 인자임을 보고하였다.<sup>21)</sup> 하지고정은 근 수축을 억제함으로 PPAR $\delta$  mRNA 발현의 감소를 유발할 수 있다. 이를 통해, 본 연구에서는 PPAR $\delta$  mRNA가 근육 비사용 초기에 지질 산화의 활성화를 위해 증가되었고, 그 증가가 PPAR $\delta$  단백질의 증가를 유발한 것으로 사료된다. 이러한 PPAR $\delta$  단

백질 증가에 따른 지질 산화의 활성화가 본 연구에서 근 위축에 따른 근육 내 지질 축적을 억제했을 가능성이 있다. PPAR $\delta$  단백질의 증가 후, PPAR $\delta$  mRNA가 하지고정에 따라 근 수축이 감소하면서 에너지 생산이 당 대사로 전환됨에 따라 감소했을 것으로 사료된다. 하지고정에 의한 근육별 반응 차이는 PPAR $\delta$  발현 수준이 type I 섬유가 많은 지근에서 높고, type II 섬유가 많은 속근에서 낮음을 보고한 연구의 결과<sup>3)</sup>와 부분적으로 일치한다. Soleus는 type I 섬유가 주를 이루고 에너지 생산을 산화적 대사에 의존하기 때문에 하지고정 후기에 산화적 대사의 활성화를 위해 PPAR $\delta$  mRNA의 발현이 감소되지 않은 것으로 사료된다. 반면, plantaris에서는 type I 섬유가 적고 에너지 생산을 해당 대사에 의존하기 때



문에, 하지고정 후기에 PPAR $\delta$  반응이 해당 대사의 활성화를 위해 감소된 것으로 사료된다. 한편, PPAR $\delta$  mRNA가 증가된 단백질에 대한 negative feedback 기전에 의해 감소했을 가능성도 있다. Negative feedback에 의한 결과일 경우, PPAR $\delta$  mRNA 발현이 식이에 따라 plantaris의 FO군과 soleus의 FO, HCO, 그리고 HBT군에서 낮은 수준을 보이는 것 역시 설명할 수 있다. 이는 PPAR $\delta$ 의 리간드로서 친화도가 높은  $\omega$ -3 PUFA 또는 PPAR $\delta$ 와 지방산의 결합률을 높여주는 고지방 식이가<sup>22,23)</sup> PPAR $\delta$  receptor의 활성을 높임으로써 발현을 역으로 억제했을 가능성이 있다.

PPAR $\delta$ 에 의해 조절되며 지방산을 미토콘드리아로 이동시켜 지방산 산화의 속도조절 효소 역할을 하는 mCPT1의 경우, mCPT1 mRNA가 하지 부유 초기 (1일)에 gastrocnemius, soleus에서 모두 증가됨을 보고하였다.<sup>24)</sup> 그러나, 근 위축에 의해 증가된 acetyl-CoA가 malonyl-CoA의 기질로 작용하여 근 위축 시 CPT1 활성은 억제되는 것으로 알려져 있다.<sup>24)</sup> 본 연구에서는 plantaris에서 근 위축과 함께 PPAR $\delta$  mRNA가 감소했음에도 불구하고, mCPT1 mRNA는 하지고정에 의해 영향을 받지 않았다. 또한, soleus에서도 mCPT1 mRNA 발현은 변화되지 않았다. 이는 mCPT1 mRNA가 근육 종류에 관계없이 하지고정에 의해 영향을 받지 않거나, 근 위축 후기에 에너지 대사가 해당 대사에 의존하기 때문에 변화되지 않는 것으로 사료된다.

본 연구에서는 plantaris에서 하지고정에 의해 PPAR $\delta$  mRNA의 감소와 함께 PDK4 mRNA의 감소를 나타내었고, PPAR $\alpha$  mRNA는 변화가 없었다. PDK4는 pyruvate dehydrogenase complex의 활성을 저해하여 당의 산화를 억제하고 지질 대사를 활발히 하여 PPAR $\delta$  mRNA의 증가는 PDK4와 직접적인 상호작용이 있음이 보고되었다.<sup>25)</sup> 이들은 CD36에 의해 증가된 지방산 흡수는 PPAR $\delta$  활성화에 필요하고, PDK4 mRNA의 증가를 유발하는 반면, PPAR $\alpha$ 는 PDK4와 상관관계가 없음을 보고하였다. 반면, soleus에서는 PDK4의 발현이 FO군을 제외하고 하지고정에 따라 특별한 변화가 없던 PPAR $\delta$ 와 다르게 모두 증가하였다. 이는 에너지 의존성이 하지고정에 따라 근육 종류별로 다름을 보여주는 결과이다. 이상의 결과를 고찰해보면, 하지고정에 따른 두 효소의 반응은 초기 mCPT1 mRNA의 발현이 변화된 후, 그 변화에 의해 PDK4 mRNA의 발현이 조절되어 효소 반응에 시간적 차이가 있는 것으로 사료된다.

식이에 의해서는, FO군의 결과에서  $\omega$ -3 PUFA를 함유한 어유 식이가 PPAR $\delta$  및 관련 효소에 근육 종류별로 다르게 작용함을 보여주었다. PPAR $\delta$  mRNA는 어유 식이에서 하지고정 초기에 급증 후, negative feedback 조절에 의해 더 낮은 수

준을 보인 것으로 사료된다. 이는 유의적이지는 않지만, PPAR $\delta$  단백질이 세 근육의 FO군에서 모두 높은 수준을 보인 것에서부터 추측할 수 있다. 본 연구에서 막의 지방산 조성을 분석하지는 않았지만, soleus의 결과는 어유 식이 조건에서 미토콘드리아 외막의  $\omega$ -3 PUFA (DHA, 22 : 6) 농도 증가로 인한 유동성 증가에 의한 것으로 사료된다.<sup>25,26)</sup> Type I 섬유가 풍부한 soleus는 미토콘드리아 막의 유동성 증가로 산화적 대사가 활성화되어 mCPT1 mRNA 발현이 높은 수준을, PDK4 mRNA가 낮은 수준을 보인 것으로 사료된다. 한편, plantaris에서는 적은 type I 섬유량에 의해 미토콘드리아가 적어서 막의 유동성에 크게 영향을 받지 않아서  $\omega$ -3 PUFA의 효과가 나타나지 못했고, 해당 대사의 의존하기 때문에 soleus와 반대되는 결과가 나온 것으로 사료된다. 하지고정에 함께  $\omega$ -3 PUFA를 함유한 어유식이에서 soleus, plantaris 모두 PPAR $\delta$  mRNA와 단백질의 발현이 다른 식이지방에 비해 큰 변화의 폭을 보였다. 이는 PPAR $\delta$ 에 의해 조절되는 것으로 알려진 지방산화 관련 효소들의 발현에도 영향을 주었다. 그 결과, FO군에서 soleus에서는 산화적 대사를 촉진하는 방향으로, 그리고 plantaris에서는 해당에 의존하는 방향으로 반응을 보였다. 하지 고정을 통한 근 위축 시  $\omega$ -3 PUFA를 함유한 어유식은 근 섬유별 특징에 따른 작용을 보이면서 근육 내 지질대사에 긍정적인 영향을 줄 수 있음을 시사하였다.

본 연구에서는 한쪽 다리 하지고정에 따른 근 위축 시 근육 내 지질대사에서 중요한 역할을 하는 PPARs의 반응을 검토하였다. 하지 고정에 따른 근 위축 시 근육 내 지질대사의 조절에는 PPAR $\alpha$ 가 아닌 PPAR $\delta$ 가 주로 관여함을 알 수 있었고, 하지고정 초기에 증가하는 것으로 알려진 PPAR $\delta$  mRNA의 발현은 10일 간의 하지고정에 따라 감소함을 처음으로 규명하였다.

## 요 약

본 연구는 지방의 종류와 함량이 다른 식이의 섭취가 하지 고정 흰 쥐의 근육 내 화학 조성, PPAR $\delta$  및 관련 효소의 발현에 미치는 영향을 근육 종류에 따라 알아 보기 위해 수행되었다.

연구결과를 요약하면 다음과 같다.

- 1) 10일 간의 하지고정과 식이 중재에 의해 실험동물의 체중, 식이섭취량 및 혈청 지방산에는 유의적인 차이가 없었다.
- 2) 10일 간의 하지고정에 따라 근육 양은 하지 근육 종류에 따라, 각각 soleus 에서 약 57%, plantaris에서 약 39% 그리고 gastrocnemius에서 약 38%로 달리 감소되었다 ( $p < 0.01$ ). 특히 soleus에서 가장 많은 감소 현상을 보였다. 이러한 감소

경향은 식이 지방의 종류 및 함량에 영향을 받지 않았다.

3) 10일 간의 하지고정에 따라 근육 내 조성 변화의 경우, gastrocnemius에서 분석한 근육 총 단백질량은 정상 다리 (contralateral)와 비교하여 하지고정에 따라 유의적으로 감소 (CO, 41%; FO, 40%; HCO, 37%; HBT, 38%)하였다. Plantaris, gastrocnemius에서 분석한 근육 내 중성지방량의 경우에도, 정상다리와 비교하여 하지고정에 따라 plantaris (CO, 39%; FO, 27%; HCO, 38%; HBT, 35%)와 gastrocnemius (CO, 38%; FO, 34%; HCO, 33%; HBT, 34%) 모두에서 유의적으로 감소하였다. 그러나, 근 단백질량과 중성지방량의 감소 현상은 모두 식이군 간의 차이는 나타나지 않았다.

4) PPAR $\delta$  단백질은 하지고정에 의해 plantaris에서는 유의적으로 증가 ( $p < 0.05$ )하였고, gastrocnemius, soleus에서는 증가하는 경향을 나타내었다. PPAR $\delta$  단백질과는 반대로 PPAR $\delta$  mRNA는 하지고정에 의해 plantaris에서는 유의적으로 감소하였고, soleus에서는 FO군만 PPAR $\delta$  mRNA 발현 양이 유의적으로 감소하였다. PPAR $\alpha$ 의 경우 하지고정에 따라 두 근육에서 모두 영향을 받지 않았다. mCPT1 mRNA는 하지고정에 따라 soleus와 plantaris 모두에서 변화가 없었지만, PDK4 mRNA는 하지고정에 따라 plantaris에서 유의적으로 감소하였고, 반대로 soleus에서는 유의적으로 증가하였다.

5) PPAR $\delta$  단백질은 세 근육의 FO군에서 모두 크게 증가하는 경향을 보였지만, 식이에 따른 유의적인 차이를 보이지는 않았다. PPAR $\delta$  mRNA의 경우, plantaris의 CO군과 비교해 FO군에서 mRNA 발현이 유의적으로 낮은 수준이었고, 다른 군에서는 유의적인 차이가 없었다. Soleus의 PPAR $\delta$  mRNA는 CO군과 비교해 FO, HCO 그리고 HBT군 모두에서 발현 양이 유의적으로 낮은 수준을 보였다. 반면, PPAR $\alpha$ 의 mRNA 발현은 두 근육에서 모두 식이에 의한 영향을 받지 않았다. mCPT1 mRNA 발현의 경우, plantaris에서는 CO군과 비교해 FO군에서 발현 양이 유의적으로 낮은 수준을 보였지만, 고지방 식이 군에서는 유의적인 차이가 없었다. 반대로, soleus에서는 CO군과 비교해 FO군에서 발현이 유의적으로 높은 수준을 보였지만, 고지방 식이 군에서는 CO군과 비교해 유의적인 차이는 없었다. PDK4 mRNA의 경우, plantaris에서는 CO군과 비교해 FO군의 mRNA 발현 양이 유의적으로 높은 수준을 보였다. 고지방 식이 군에서는 CO군과 비교해 발현 양의 유의적인 차이가 없었다. 한편, soleus에서는 FO군에서 발현이 낮은 경향을 보였을 뿐, 식이에 따른 mRNA 발현에는 모든 군에서 유의적인 차이가 없었다.

본 연구에서는 10일간의 하지고정에 의해서 모든 근육에서 유의적인 근 위축이 유발되었고, 이에 따라 근육 양의 감소

와 함께 근육 총 단백질의 유의적인 감소가 나타났다. 하지만 근육 총 단백질과 중성지방의 유의적인 감소에도 불구하고, 하지고정에 의한 근육 내 중성지방 축적은 일어나지 않았다. 이는 하지고정에 의해 모든 근육에서 증가된 PPAR $\delta$  단백질이 하지고정 초기에 근육 내 중성지방의 축적을 억제했을 것으로 사료된다. 결론적으로, 하지고정에 따른 근 위축에 의해 근육 내 지질대사를 조절하는 PPAR $\delta$ 의 mRNA 발현은 감소하였지만,  $\omega$ -3 PUFA를 함유한 어유 식이는 PPAR $\delta$  단백질 및 관련 효소의 발현 수준과 활성에 근 섬유별특성에 따라 긍정적인 영향을 줌으로써 근육 내 지질축적을 비롯한 근 위축의 경감에 도움을 줄 수 있다는 가능성을 제시하였다.

#### Literature cited

- 1) You JS, Park MN, Song W, Lee YS. Dietary fish oil alleviates soleus atrophy during immobilization in association with Akt signaling to p70s6k and E3 ubiquitin ligases in rats. *Appl Physiol Nutr Metab* 2010; 35(3): 310-318
- 2) You JS, Park MN, Lee YS. Dietary fish oil inhibits the early stage of recovery of atrophied soleus muscle in rats via Akt-p70s6k signaling and PGF2 $\alpha$ . *J Nutr Biochem* 2010; 21(10): 929-934
- 3) Lindboe CF, Platou CS. Effect of immobilization of short duration on the muscle fibre size. *Clin Physiol* 1984; 4(2): 183-188
- 4) Fitts RH, Riley DR, Widrick JJ. Functional and structural adaptations of skeletal muscle to microgravity. *J Exp Biol* 2001; 204 (Pt 18): 3201-3208
- 5) Wang YX, Zhang CL, Yu RT, Cho HK, Nelson MC, Bayuga-Ocampo CR, Ham J, Kang H, Evans RM. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biol* 2004; 2(10): e294
- 6) Montell E, Turini M, Marotta M, Roberts M, Noé V, Ciudad CJ, Macé K, Gómez-Foix AM. DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280(2): E229-E237
- 7) Ehrenborg E, Krook A. Regulation of skeletal muscle physiology and metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Pharmacol Rev* 2009; 61(3): 373-393
- 8) Mazzatti DJ, Smith MA, Oita RC, Lim FL, White AJ, Reid MB. Muscle unloading-induced metabolic remodeling is associated with acute alterations in PPARdelta and UCP-3 expression. *Physiol Genomics* 2008; 34(2): 149-161
- 9) Grimaldi PA. Regulatory role of peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR delta) in muscle metabolism. A new target for metabolic syndrome treatment? *Biochimie* 2005; 87(1): 5-8
- 10) Sinha S, Perdomo G, Brown NF, O'Doherty RM. Fatty acid-induced insulin resistance in L6 myotubes is prevented by inhibition of activation and nuclear localization of nuclear factor kappa B. *J Biol Chem* 2004; 279(40): 41294-41301
- 11) Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(4): 2005-2010
- 12) Mullen KL, Pritchard J, Ritchie I, Snook LA, Chabowski A, Bonen A, Wright D, Dyck DJ. Adiponectin resistance precedes

- the accumulation of skeletal muscle lipids and insulin resistance in high-fat-fed rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 296(2): R243-R251
- 13) Marcó A, Rubio R, Compañó R, Casals I. Comparison of the Kjeldahl method and a combustion method for total nitrogen determination in animal feed. *Talanta* 2002; 57(5): 1019-1026
  - 14) Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226(1): 497-509
  - 15) Vazeille E, Codran A, Claustre A, Averous J, Listrat A, Béchet D, Taillandier D, Dardevet D, Attaix D, Combaret L. The ubiquitin-proteasome and the mitochondria-associated apoptotic pathways are sequentially downregulated during recovery after immobilization-induced muscle atrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295(5): E1181-E1190
  - 16) Widrick JJ, Maddalozzo GF, Hu H, Herron JC, Iwaniec UT, Turner RT. Detrimental effects of reloading recovery on force, shortening velocity, and power of soleus muscles from hindlimb-unloaded rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 295(5): R1585-R1592
  - 17) Krawiec BJ, Frost RA, Vary TC, Jefferson LS, Lang CH. Hindlimb casting decreases muscle mass in part by proteasome-dependent proteolysis but independent of protein synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289(6): E969-E980
  - 18) Bajotto G, Sato Y, Kitaura Y, Shimomura Y. Effect of branched-chain amino acid supplementation during unloading on regulatory components of protein synthesis in atrophied soleus muscles. *Eur J Appl Physiol* 2011; 111(8): 1815-1828
  - 19) Gustafsson T, Osterlund T, Flanagan JN, von Waldén F, Trappe TA, Linnehan RM, Tesch PA. Effects of 3 days unloading on molecular regulators of muscle size in humans. *J Appl Physiol* 2010; 109(3): 721-727
  - 20) Krämer DK, Ahlsén M, Norrbom J, Jansson E, Hjeltnes N, Gustafsson T, Krook A. Human skeletal muscle fibre type variations correlate with PPAR alpha, PPAR delta and PGC-1 alpha mRNA. *Acta Physiol (Oxf)* 2006; 188(3-4): 207-216
  - 21) Russell AP, Hesselink MK, Lo SK, Schrauwen P. Regulation of metabolic transcriptional co-activators and transcription factors with acute exercise. *FASEB J* 2005; 19(8): 986-988
  - 22) Forman BM, Chen J, Evans RM. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(9): 4312-4317
  - 23) Hancock CR, Han DH, Chen M, Terada S, Yasuda T, Wright DC, Holloszy JO. High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(22): 7815-7820
  - 24) Stein T, Schluter M, Galante A, Soteropoulos P, Toliás P, Grindeland R, Moran M, Wang T, Polansky M, Wade C. Energy metabolism pathways in rat muscle under conditions of simulated microgravity. *J Nutr Biochem* 2002; 13(8): 471
  - 25) Nahlé Z, Hsieh M, Pietka T, Coburn CT, Grimaldi PA, Zhang MQ, Das D, Abumrad NA. CD36-dependent regulation of muscle FoxO1 and PDK4 in the PPARdelta/beta-mediated adaptation to metabolic stress. *J Biol Chem* 2008; 283(21): 14317-14326
  - 26) Power GW, Newsholme EA. Dietary fatty acids influence the activity and metabolic control of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I in rat heart and skeletal muscle. *J Nutr* 1997; 127(11): 2142-2150