

오디와 누에 섭취가 rats의 저항성 운동에 따른 androgen receptor mRNA와 myogenic regulatory factors의 발현에 미치는 영향

양성준* · 김창용 · 이조병 · 강성선 · 이종진¹
부안군 농업기술센터, ¹전북대학교 농생물학과

The effects of the mulberry and silkworm intake on androgen receptor mRNA and myogenic regulatory factors expression of rats muscle for resistance exercise

Sung Jun Yang*, Chang Yong Kim, Jo Byoung Lee, Sung Sun Kang and Jong Jin Lee¹

Buan Agricultural Development & Technology Center, Buan, Chonbuk 579-833, Korea

¹Department of Agricultural Biology, Chonbuk National University, Jeonju, Chonbuk 561-756, Korea

(Received September 17, 2013, Accepted October 11, 2013)

ABSTRACT

The purpose of this study is to investigate the effects of supplementation of mulberry powder, mulberry extract and silkworm powder during the 8 weeks of resistance exercise on Androgen receptor(AR) mRNA and Myogenic regulatory factors(MRFs) expression of rats muscle. Fifty males, Sprague-Dawley rat, were randomly divided into 5 groups: CON(control group, n = 10), REG(resistance exercise group, n = 10), MP REG(mulberry powder intake and resistance exercise group, n = 10), ME REG(mulberry extract intake and resistance exercise group, n = 10) and SP REG(silkworm powder intake and resistance exercise group, n = 10). After climbing the ladder without weights during the 1 week of adaptation period, the rats in the resistance exercise group were trained to climb a 0.98-m vertical(80 degree incline) ladder with weights in their tail during 7 weeks(10 times each day, 2 days per week). After exercise, the skeletal muscle was extracted from the flexor hallucis longus. After separating the total ribonucleic acid (RNA) of each group, quantitative polymerase chain reaction was used to analyze RNA quantitatively. AR mRNA and MRFs expression revealed that all of the treated groups had significantly difference. AR mRNA expression increased in ME REG 6.24 ± 1.85 and SP REG 9.68 ± 0.28 fold compared to CON. Myod mRNA expression increased in MP REG 6.04 ± 0.47 , ME REG 4.31 ± 1.58 and SP REG 8.11 ± 0.57 fold compared to CON. And myogenin mRNA expression increased in MP REG 4.11 ± 0.42 , ME REG 4.12 ± 0.45 and SP REG 6.50 ± 0.61 fold compared to CON. In conclusion, during the resistance exercise, providing mulberry and silkworm gives positive effect on AR mRNA and MRFs expression increase.

Key words : Mulberry, Silkworm, Resistance exercise, Androgen receptor, Myogenic regulatory factors

서 론

경제적 안정과 생활수준의 향상은 현대인들에게 풍족하고 안락한 삶을 주었지만 이와 같은 삶의 양상은 운동부족, 비만, 노화 등으로 인한 다양한 질병의 원인이 되었고 건강에 대한 위협 요인이 되고 있다. 따라서 현대인들은 신체활동 부족에 따른 건강 저해요소에 적극적으로 대처하고 수명 연장에 따른 삶의 질 향상을 위해 건강에 많은 관심을 두게 되었다.

건강이 화두가 되면서 현대인들은 다양한 형태의 운동에 규칙적으로 참여하고 있는데 그 중 헬스 트레이닝을 통한 저항성 운동은 근골격계 발달을 위한 효과적인 운동 방법 중 하나로 무거운 중량을 들어 신체를 자극하여 근육을 증가시키는 운동이다. 운동 후 그에 따른 자극은 단백질 합성률을 증가시키고 운동선수의 운동수행능력 향상에 영향을 미친다(Phillips et al. 1997, Phillips et al. 2005). 적절한 영양 섭취와 저항성 운동은 동화호르몬의 분비를 자극하고, 이러한 호르몬 반응을 통한 단백질 합성은 근

*Corresponding author. E-mail: ccoldk83@korea.kr

육 내 단백질 저장을 증가시키는데 긍정적인 효과가 있다(Kraemer et al. 1998, Williams et al. 2002, Volek 2004). 효과적인 근력 향상 및 근육 증가를 위해서는 근육 운동의 적절한 강도, 시간, 휴식뿐만 아니라 운동 전후의 영양 섭취도 중요하다고 할 수 있다.

오디는 뽕나무과에 속하는 낙엽교목인 뽕나무의 열매로 꾸준히 먹으면 백발을 검게 하며 소갈을 덜어주고 오장을 이롭게 하고 빈혈, 고혈압, 관절통 및 대머리 치료에 효능이 있는 것으로 알려졌다(Kim 1991). 화한약백과도감(和漢藥百科圖鑑)에서는 ‘오디가 강장과 신장을 보익하고 음혈(陰血, 남녀의 정력)을 길러 주는 효능이 있고, 양혈거풍(養血去風, 피를 길러주고 풍을 없애 줌)을 하는 작용이 있다’라고 하였다. 또한, 오디의 생리활성 연구에서 항당뇨(Heo et al. 2007), 오디추출물의 항균 활성(Kim et al. 2005), 항산화, 항염증(Kim et al. 1998), 콜레스테롤 억제 및 항고지혈증(Kim et al. 2008) 등의 다양한 작용을 나타내어 기능성 식품의 소재로 활용되고 있다. 누에(*Bombyx mori* L.)는 누에나방과(Bombycidae)에 속하는 유충(幼蟲)으로 예로부터 비단을 얻기 위해 길러왔지만 최근 누에 분말의 혈청 중의 활성 산소 생성 억제 및 제거효소 활성(Cha et al. 2010), 누에분말의 제조조건에 따른 혈당강하효과(Ryu et al. 1997), 간 독성 예방(Ryu et al. 1999), 누에유래 불포화지방산의 고지혈증 개선, 콜라겐 증가 및 콜라겐 분해효소 활성 억제(Kang et al. 2006), 테스토스테론 증가(Ryu et al. 2010) 등의 기능성 효과가 주목받고 있다. 이와 같은 누에와 오디의 효능은 근력 및 근비대를 위한 저항성 운동에 효과적인 영양 섭취원이 될 것으로 생각된다. 저항성 운동과 같은 과부하를 견디는 자극에 의해 체내 호르몬 대사의 증가, 성장인자, 동화호르몬의 분비, 다양한 경로를 통해 섭취하는 영양소 등의 동화작용은 근육 세포 내 단백질 합성을 증가시키고 단백질 분해를 막아주는 역할을 한다(Robert and Charles 2007). 저항성 운동은 더 많은 운동단위(motor unit)를 동원하고 근세포의 성장과 근력 발달에 도움이 되며, 특히 성장 호르몬의 분비를 유발하여 세포막을 통한 아미노산의 수송을 촉진하고 핵 내 전사작용(transcription)에 영향을 주어 mRNA의 양을 증가시킴으로써 단백질의 합성을 촉진한다(Fry et al. 1994, Kraemer et al. 1998). 저항성 운동을 통한 근육 손상 및 회복 과정에 생성되는 다양한 유전자 중 androgen receptor(AR) mRNA는 동화 작용을 통한 근육의 부피를 증가시키는 역할을 하는 호르몬인 테스토스테론과 같은 androgen과 결합하여 세포질에서 핵으로 이동하며(Ozanne et al. 2000), DNA 내의 androgen response elements(ARE)라고 불리는 특별한 염기서열과 결합하여 근육 유전자의 발현을 촉진하게 된다(McKenna et al. 1999).

운동이나 트레이닝에 의한 근섬유의 손상으로 활성화된 위성세포는 손상된 부위로 이주하여 용해되어 근섬유를 재생시키거나 생성을 유도하게 된다(Ferrari et al. 1998). 위성세포는 새로운 핵을 만들기 위해 근섬유내의 세포 소기관(organelle)에 잔존하기도 한다. 위성세포는 하나의 핵(nucleus)를 가지고 있어 복제가 가능하기 때문에 잔존하고 있던 위성세포의 핵들에 의해 더 많은 양의 단백질을 합성할 수 있게 되고 합성된 단백질은 더 많은 위성세포를 만들어 이는 근원섬유의 생성을 유도하고 제 2차 근섬유 재생 과정을 촉진하게 된다(LaFramboise et al. 2009). 골격근의 위성세포는 운동이나 근육의 과부하로 인한 근육의 발달이나 재생성이 이루어질 때 세포증식을 일으키지 않는 진정기 상태의 위성세포는 활성화되며 증식하게 된다. 이 단계에서 위성세포는 근원성 전구체 세포(myogenic precursor cell) 또는 근육아세포인 myoblast라고 명명된다(Charge and Rudnicki 2004). 위성세포가 활성화되면 전사인자인 myogenic gene이 발현하게 되는데 MyoD, myf-5, myf-6, myogenin, PCNA 등이 대표적이다(Maier et al. 2002). 이 중 MyoD와 myogenin은 근섬유의 전구세포인 위성세포(satellite cell)의 증식과 분화를 조절하여 근세포의 재생에 관여하게 된다(Grounds et al. 1992, Olson and Klein 1994).

건강한 육체와 삶을 위한 저항성 운동은 근육 증가에 도움이 되며 적절한 강도의 운동 자극, 휴식, 영양에 의한 근육의 회복과 재생성 과정은 관련 유전자의 발현에 의해 영향을 받는다. 따라서 본 연구는 8주간의 사다리를 이용한 점진적 저항성 운동과 더불어 오디분말, 오디추출물, 누에분말의 섭취가 흰쥐의 골격근에서 androgen receptor(AR) mRNA와 myogenic regulatory factors(MRFs)의 발현에 효과가 있는지 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

6주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐(Semtako Inc., Osan, Korea) 50두를 분양받아 일주일간 순화 기간을 거친 후 균간 체중을 고르게 분리하고, 꼬리에 개체를 구분할 수 있도록 표시하였다. 그리고 시료 투여 및 저항성 운동 여부에 따라 대조군(Control group, CON; n = 10), 운동군(Resistance exercise group, REG; n = 10), 오디분말 운동군(Mulberry powder intake and resistance exercise group, MP REG; n = 10), 오디추출물 운동군(Mulberry extract intake and resistance exercise group, ME REG; n = 10), 누에분말 운동군(Silkworm powder intake and resistance exercise group, SP REG; n = 10)으로 구분

하였다. 동물실험은 원광대학교 동물실험윤리위원회에서 동물실험 승인서(승인번호: 승인KWU12-55)를 발급 받은 후 진행하였다.

2. 시험물질의 조제

본 실험에 사용한 오디와 누에는 2012년 부안군 농가에서 구매하여 -20°C에 보관하면서 사용하였다. 오디 분말은 동결건조하여 분말로 분쇄하였고 누에 분말(양원잠-수컷, 5령 3일)은 액체질소로 동결 후 동결건조하여 분말로 분쇄하였다. 오디추출물은 오디 50 kg에 70% EtOH 500 l를 가하여 40°C에서 4시간 동안 2회 추출 후 각각 2시간 동안 농축하였다. 2회 농축액을 합하여 2시간 동안 농축 후 농축액 80 l를 동결건조하여 시료로 사용하였다.

3. 실험동물 사육 및 사료 섭취량 측정

실험동물은 익산시 소재 원광대학교 동물자원연구센터 동물실험실에서 폴리실폰 사육 상자에 1상자 당 5마리씩 총 50마리를 사육하였다. 사육실 온도는 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도는 상대 습도의 $50\% \pm 5\%$ 로 일정하도록 조절하였으며, 12시간(07:00 ~ 19:00)을 주기로 명암을 조절하였다. 대조군과 운동군은 고형사료(Semtako Inc., Osan, Korea)를 섭취하도록 하고 시료 투여 집단은 고형사료에 각각의 시료(2.1 g/kg; Mulberry powder, 0.235 g/kg; Mulberry extract, 2.1 g/kg; Silkworm powder)가 배합된 사료를 섭취하도록 하였으며 필터로 여과된 정제수를 자유롭게 섭취하도록 하였다.

4. 저항성 운동 방법

본 실험은 동일한 시간대에 저항성 운동인 사다리 운동을 자체 제작한 전용 사다리(98*27 cm, 2 cm grid, 80° incline)를 이용하여 실시하였다. 저항성 사다리 운동은 기존의 사다리 운동 방법(Hornberger and Farrar 2004, Kwon et al. 2004, Lee et al. 2004, Troy et al. 2004, Yang et al. 2006)을 변형하여 실시하였다. 1주일간 주당 3일, 1일 5회씩 부하 없이 맨몸 사다리 운동을 거친 후 7주간 주당 2일, 1일 10회씩 점진적인 과부하 하에서 실시하였다. 저항성 운동 부하는 최대중량의 50%(최초 체중의 50%)부터 시작하여 매회 처음 지정된 무게에서 20 g ~ 100 g씩 부하를 증가시켰고, 반복 간 2분의 휴식 시간을 가졌다. 초기 3주간은 20 ~ 50 g씩 매회 부하를 증가시켰고 그 후 4주간은 50 ~ 100 g씩 매회 부하를 증가시켰다. 세트가 끝나는 시점인 10번째 중량을 최대중량으로 기록하였다. 그러나 세트가 끝나기 전에 운동 수행이 불가능하게 되면 바로 전 시점의 중량으로 세트를 완료하였으며 더는 운동을 할 수 없게 되기 전 시점의 중량을 최대중량으

로 기록하였다.

5. 시료채취

실험 시료로써 조직 채취는 8주간 저항성 운동이 끝난 후에 실시하였으며 부검 전 12시간 절식하고 ether로 마취시킨 후 사다리 운동에서 주동근으로 작용하는 장무지굴근(flexor hallucis longus)을 오른쪽 뒷다리에서 적출하였다.

6. 분자 생화학적 분석방법

6.1. Total RNA의 추출 및 cDNA의 합성

적출한 골격근을 최대한 빠른 시간에 액화질소(liquid nitrogen)로 동결시킨 후, 분석 때까지 -80°C 냉동고에 보관하여 사용하였다. RNA 추출은 상품화된 키트인 RNeasy Lipid Tissue Mini Kit(Qiagen, CA, USA)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 추출하였다. RNA 추출, 침전, 세척 과정을 거친 후 건조된 pellet에 Nuclease-free water 40 μl 를 첨가하여 total RNA를 분리한 후 Spectrophotometer(Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 RNA의 농도를 측정하였다. 역전사 반응은 상품화된 키트인 TOPscript™ cDNA Synthesis Kit(Enzymomics, DA, Korea)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 cDNA를 합성하였다. 반응 조성은 RNA 1.5 μg , buffer 2 μl , dNTP 2 μl , reverse transcriptase 1 μl , primer 1 μl 이며, total volume은 Nuclease-free water로 20 μl 로 맞추었다. 이들 반응물은 50°C에서 60분간 신장 과정을 통하여 cDNA를 합성하였으며, 다음 단계의 실험을 위하여 -20°C에서 보관하였다.

6.2. Real-timequantitative polymerase chain reaction(qPCR)

AR(TaqMan Gene Expression Assay ID Rn00560747_m1, Applied Biosystems, CA, USA), Myo D(TaqMan Gene Expression Assay ID Rn01457527_g1, Applied Biosystems, CA, USA), Myogenin(TaqMan Gene Expression Assay ID Rn01490689_g1, Applied Biosystems, CA, USA) mRNA를 특이적으로 검출하도록 디자인된 시발체(primer)와 탐색자(probe)는 Applied Biosystems사로부터 구입하였다. qPCR 반응액은 TaqMan universal Master mix 2X(Applied biosystems, CA, USA) 10 μl , 10pmol forward primer 0.5 μl , 10 pmol reverse primer 0.5 μl , DNA template 1 μl , Nuclease-free water 8 μl 를 넣어 총 부피가 20 μl 가 되게 하였다. 핵산 증폭은 pre-denaturation은 95°C에서 10분, denaturation은 95°C에서 15초, annealing은 60°C에서 1분으로 하여 40 cycle을 수행하였다. 각 검체마다 상대정량을 위해서 housekeeping 유전자인 18s rRNA(Applied Biosystems, CA, USA)도 동

일한 방법으로 증폭하였다.

6.3. 18s rRNA를 이용한 target gene의 normalization과 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 상대정량

Housekeeping gene인 18s rRNA를 이용하여 흰쥐의 장무지굴근에서 AR, MyoD, Myogenin mRNA를 상대적으로 정량하였다. 각각의 target gene Ct값을 18s rRNA Ct값으로 normalization($Ct_{target} - Ct_{18s}$)하고 이를 ΔCt (target gene-18s)라고 하였다. 대조군(CON) 10마리의 target mRNA의 Ct값과 18s rRNA Ct값의 평균을 구하여 $Ct_{calibrator}$ (mean target gene-mean 18s)를 계산하였다. 이 $\Delta Ct_{calibrator}$ 로 각 처리군(CON, REG, MP REG, ME REG, SP REG)의 ΔCt 를 다시 normalization하게 되는데, 이를 $\Delta\Delta Ct$ ($\Delta Ct - \Delta Ct_{calibrator}$)라고 하였다. 이 $\Delta\Delta Ct$ 를 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 로 최종적인 상대 정량값으로 표현하여 각 처리군에서 target gene의 골격근 내 발현 정도를 배수 변화(fold change)로 비교하였다(Livak and Schmittgen 2001).

7. 통계분석

실험결과 분석은 3번의 반복실험 결과를 One-way ANOVA(R i386 3.0.1) Duncan 사후검정) 비교를 실시하여 $p < 0.05$ 일 때 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 장무지굴근내 AR mRNA 발현의 변화

Real time PCR로 얻은 Ct 값은 먼저 18s rRNA로 보정하고, 이를 대조군으로 2차 보정하여 사다리 운동과 시료 섭취에 따른 AR mRNA 발현의 변화를 관찰하였다. 사다

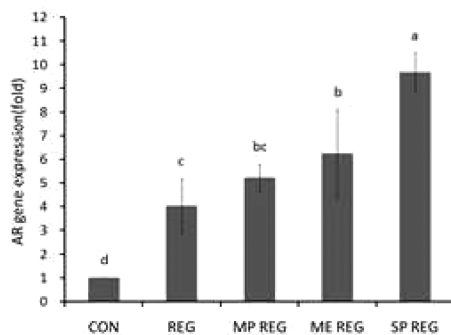


Fig. 1. Real-time PCR of AR mRNA expression in the flexor hallucis longus. All data are mean S.D. values expressed the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ that shows the difference between each the control group and the treated groups. The value of $2^{-\Delta\Delta Ct}$ is the fold change of AR mRNA. Small letters inside the figure represent mean separation by Duncan's multiple range test at $p < 0.001$ ($n = 3$). CON: control group, REG: resistance exercise group, MP REG: mulberry powder intake and resistance exercise group, ME REG: mulberry extract intake and resistance exercise group, SP REG: silkworm powder intake and resistance exercise group.

리 운동과 시료 섭취에 따른 흰쥐 장무지굴근에서의 AR mRNA의 발현은 Fig. 1과 같다. 대조군과 비교하여 모든 저항성 운동 집단에서 통계적으로 유의한 차이를 보였으며 운동군에서 4.04 ± 1.12 , 오디분말 운동군에서 5.23 ± 0.56 , 오디추출물 운동군에서 6.24 ± 1.85 , 누에분말 운동군에서 9.68 ± 0.82 배를 나타내었다. 운동군과 비교하여 오디추출물 운동군과 누에분말 운동군에서 유의한 차이를 나타냈으며 오디분말 운동군의 경우 운동군과 비교하여 유의한 차이를 나타내지 않았지만 대조군과 비교하여 유의한 차이를 나타내었다.

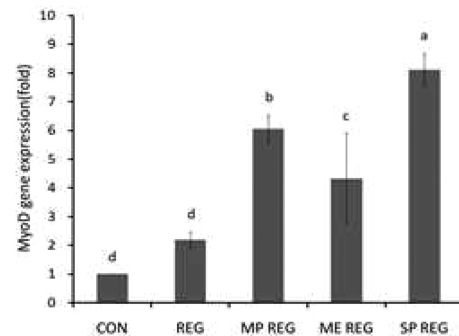


Fig. 2. Real-time PCR of MyoD mRNA expression in the flexor hallucis longus. All data are mean S.D. values expressed the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ that shows the difference between each the control group and the treated groups. The value of $2^{-\Delta\Delta Ct}$ is the fold change of MyoD mRNA. Small letters inside the figure represent mean separation by Duncan's multiple range test at $p < 0.001$ ($n = 3$). CON: control group, REG: resistance exercise group, MP REG: mulberry powder intake and resistance exercise group, ME REG: mulberry extract intake and resistance exercise group, SP REG: silkworm powder intake and resistance exercise group.

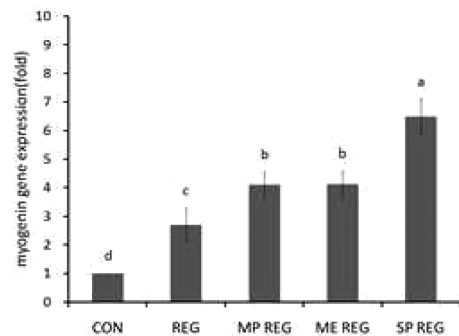


Fig. 3. Real-time PCR of myogenin mRNA expression in the flexor hallucis longus. All data are mean S.D. values expressed the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ that shows the difference between each the control group and the treated groups. The value of $2^{-\Delta\Delta Ct}$ is the fold change of myogenin mRNA. Small letters inside the figure represent mean separation by Duncan's multiple range test at $p < 0.001$ ($n = 3$). CON: control group, REG: resistance exercise group, MP REG: mulberry powder intake and resistance exercise group, ME REG: mulberry extract intake and resistance exercise group, SP REG: silkworm powder intake and resistance exercise group.

2. 장무지굴근내 MRFs 발현의 변화

Real time PCR로 얻은 Ct 값은 먼저 18s rRNA로 보정하고, 이를 대조군으로 2차 보정하여 사다리 운동과 시료 섭취에 따른 MyoD, myogenin mRNA 발현의 변화를 관찰하였다. 8주간 저항성 운동을 실시한 후 흰쥐 장무지굴근에서의 MyoD mRNA의 발현은 Fig. 2와 같으며 대조군과 비교하여 운동군에서 2.19 ± 0.27 , 오디분말 운동군에서 6.04 ± 0.48 , 오디추출물 운동군에서 4.32 ± 1.59 , 누에분말 운동군에서 8.11 ± 0.57 배를 나타내었다. 운동군과 비교하여 모든 시료 섭취 집단에서 유의한 차이를 나타내었다. Myogenin mRNA의 경우 Fig. 3과 같다. 대조군과 비교하여 운동군에서 2.70 ± 0.57 , 오디분말 운동군에서 4.11 ± 0.42 , 오디추출물 운동군에서 4.13 ± 0.45 , 누에분말 운동군에서 6.50 ± 0.61 배를 나타내었다. 대조군과 비교하여 모든 저항성 운동군에서 유의한 차이를 나타냈으며 운동군과 비교하여 모든 시료 섭취 집단에서 유의한 차이를 나타내었다.

고 찰

본 연구는 6주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 대상으로 8주간 오디, 누에의 섭취 및 사다리 운동을 통한 점진적 저항성 운동을 실시하여 근비대를 유도한 후, 흰쥐의 골격근에서 AR mRNA와 MRFs의 발현에 효과가 있는지 확인하고자 하였다. 그 결과 사다리 운동과 시료 섭취는 흰쥐 골격근에서 AR mRNA 발현을 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다. 대조군과 비교하여 모든 저항성 운동 집단에서 통계적으로 유의한 차이를 보였으며 운동군에서 4.04 ± 1.12 , 오디분말 운동군에서 5.23 ± 0.56 , 오디추출물 운동군에서 6.24 ± 1.85 , 누에분말 운동군에서 9.68 ± 0.82 배를 나타내었다. 운동군과 비교하여 오디추출물 운동군과 누에분말 운동군에서 유의한 차이를 나타냈으며 오디분말 운동군의 경우 운동군과 비교하여 유의한 차이를 나타내지 않았지만 대조군과 비교하여 유의한 차이를 나타내었다.

androgen receptor(AR) 유전자는 X 염색체의 Xq11-12 위치에 존재하며 그 크기는 약 110 kDa 정도이며(Chang et al. 1988) 유전자의 발현은 근육과 뼈, 신경, 내분비 조직(endocrine tissues) 등과 같은 조직에서 풍부히 발현된다(Lindzey et al. 1994). AR은 호르몬이 존재하지 않을 경우 세포질(cytoplasm)에 위치하고 있으며 테스토스테론과 같은 androgen과 결합하게 되면 핵으로 이동하게 되어 androgen response elements(ARE)라고 불리는 특별한 염기서열에 결합한다. 이러한 AR의 ARE 결합은 더 나아가 근육에 관련된 전사인자(transcription factors)와 상호작용

을 통해 skeletal α -actin과 같은 근육 유전자의 발현을 촉진하게 된다(Mckenna et al. 1999). 그리고 근육에서의 AR mRNA 발현의 증가는 테스토스테론과 같은 androgen에 의해 근육에서 일어나는 특징 중 하나이다. Androgen 처리에 의한 골격근에서 AR mRNA 농도의 증가는 쥐나 사람을 대상으로 한 많은 연구에서 검증되었다(Antonio et al. 1999, Kadi et al. 2000, Lee et al. 2003, Bhasin et al. 2006, Sheffield-Moore et al. 2006).

MRFs 발현 결과를 살펴보면 사다리 운동과 시료 섭취는 흰쥐 골격근에서 MRFs 발현을 증가시키는 것으로 나타났다. MyoD mRNA의 경우 대조군과 비교하여 운동군에서 2.19 ± 0.27 , 오디분말 운동군에서 6.04 ± 0.48 , 오디추출물 운동군에서 4.32 ± 1.59 , 누에분말 운동군에서 8.11 ± 0.57 배를 나타내었다. 운동군과 비교하여 모든 시료 섭취 집단에서 유의한 차이를 나타내었다. Myogenin mRNA의 경우 대조군과 비교하여 운동군에서 2.70 ± 0.57 , 오디분말 운동군에서 4.11 ± 0.42 , 오디추출물 운동군에서 4.13 ± 0.45 , 누에분말 운동군에서 6.50 ± 0.61 배를 나타내었다. 대조군과 비교하여 모든 저항성 운동군에서 유의한 차이를 나타냈으며 운동군과 비교하여 모든 시료 섭취 집단에서 유의한 차이를 나타내었다.

MyoD는 근육모세포로 분화하기 위해 발생초기에 발현되며 myogenin은 근육모세포의 융합 및 근육 유전자 활성화 그리고 분화인자로서 활동한다(Molkentin and Olson 1996). C2C12 myoblast에 AR을 과발현시키자 myoblast 분화에 필수적인 myogenin 단백질 및 mRNA의 발현이 현저히 증가하였다고 보고하였다(Lee 2002). MyoD와 myogenin은 손상된 근섬유의 재생을 위해 활성화된 위성세포의 핵 속에서 발현되는데, 이 중 MyoD는 somite cell을 muscle precursor인 myoblast로 전환시키는 과정에 관여하며, myogene는 myoblast가 증식하고 융해되어 myotube를 형성함으로써 수많은 핵을 가진 myofiber로 성장하는 과정을 조절하는 것으로 알려져 있다(Grounds et al. 1992, Olson and Klein 1994).

오디는 비타민과 미네랄이 풍부하고 다양한 기능성을 가진 건강식품으로 cyanidin 3-glucoside(C3G), γ -aminobutyric acid(GABA), rutin 등의 항산화, 항당뇨, 항염증 및 항고지혈증 등의 여러 생리작용이 보고되었다(Asano et al. 2001, Oh et al. 2002). 누에는 풍부한 단백질, 아미노산, 펩티드, 미네랄 등 영양적 가치가 있는 성분을 포함하고 있고 1-deoxynojirimycin(DNJ)의 혈당 강하(Chung et al. 1997), 테스토스테론 증가(Ryu et al. 2010) 및 간독성 예방(Ryu et al. 1999) 등의 효과가 있다. 본 실험을 통해 오디와 누에의 섭취가 근비대 관련 유전자인 AR mRNA와 MRFs의 발현의 증가에 직접적인 영향을 미친다고 볼 수 없고 매

우 복잡한 근비대의 신호전달과 조절기전의 어느 부분에 관여하는지 확인할 수 없다. AR mRNA와 MRFs를 포함한 일부 근비대 관련 유전자의 경우 저항성 운동만으로 근육에서 현저한 발현을 나타낸다(Bamman et al. 2001, Psilander et al. 2003). 하지만 본 실험의 경우 운동군에 비해 오디와 누에 섭취군에서 더 많은 유전자의 발현이 나타났다. 다양한 생리적 작용이 있는 오디와 누에의 섭취가 근육의 손상과 회복을 통한 복잡한 과정의 한 부분에 작용하여 영향을 미치고 그에 따라 AR mRNA와 MRFs의 발현이 증가한 것으로 판단된다.

양잠산물인 누에와 오디를 활용한 운동보조제 개발을 위해 시료 섭취 및 저항성 운동에 따른 rats의 AR mRNA와 MRFs의 발현에 관한 실험을 진행하였다. 저항성 운동 동안 오디와 누에의 섭취는 AR mRNA와 MRFs의 발현을 유의하게 증가시켰으며 이에 따라 근육 증가와 관련된 기전에 영향을 미친 것으로 판단된다.

적 요

본 연구는 8주간의 사다리를 이용한 점진적 저항성 운동과 더불어 오디분말, 오디추출물, 누에분말의 섭취가 흰쥐의 골격근에서 androgen receptor(AR) mRNA와 myogenic regulatory factors(MRFs)의 발현에 효과가 있는지 확인하고자 하였다. 6주령의 Rat 50두를 분양받아 일주일간 순화 기간을 거친 후 군간 체중을 고르게 분리하고 시료 투여 및 저항성 운동 여부에 따라 대조군, 운동군, 오디분말 운동군, 오디추출물 운동군, 누에분말 운동군으로 설정하였다. 시료 투여집단은 고품사료에 각각의 시료가 배합된 사료를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 저항성 운동 방법은 1주일간 주당 3일, 1일 5회씩 부하 없이 맨몸 사다리 운동을 거친 후 7주간 주당 2일, 1일 10회씩 점진적인 과부하 하에서 실시하였다. 8주간 저항성 운동이 끝난 후 오른쪽 뒷다리에서 장무지굴근을 적출한 후 RNA 추출 및 cDNA를 합성하여 -20°C에 보관 후 실험에 사용하였다. AR mRNA와 MRFs를 특이적으로 검출하도록 디자인된 시발체와 탐색자를 구입하여 housekeeping 유전자인 18s rRNA와 함께 Real Time PCR을 이용하여 증폭하였다. 18s rRNA를 이용하여 흰쥐의 장무지굴근에서 AR mRNA와 MRFs를 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 법을 통해 상대정량하여 골격근 내 발현 정도를 배수변화로 비교하였다. 실험 결과 사다리 운동과 시료 섭취는 흰쥐 골격근에서 AR mRNA의 발현을 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다. 대조군과 비교하여 모든 저항성 운동 집단에서 통계적으로 유의한 차이를 보였으며 운동군에서 4.04 ± 1.12 , 오디분말 운동군에서 5.23 ± 0.56 , 오디추출물 운동군에서 6.24 ± 1.85 , 누에분말

운동군에서 9.68 ± 0.82 배를 나타내었다. 운동군과 비교하여 오디추출물 운동군과 누에분말 운동군에서 유의한 차이를 나타냈으며 오디분말 운동군의 경우 운동군과 비교하여 유의한 차이를 나타내지 않았지만 대조군과 비교하여 유의한 차이를 나타내었다. MyoD mRNA의 경우 대조군과 비교하여 운동군에서 2.19 ± 0.27 , 오디분말 운동군에서 6.04 ± 0.48 , 오디추출물 운동군에서 4.32 ± 1.59 , 누에분말 운동군에서 8.11 ± 0.57 배를 나타내었다. 운동군과 비교하여 모든 시료 섭취 집단에서 유의한 차이를 나타내었다. Myogenin mRNA의 경우 대조군과 비교하여 운동군에서 2.70 ± 0.57 , 오디분말 운동군에서 4.11 ± 0.42 , 오디추출물 운동군에서 4.13 ± 0.45 , 누에분말 운동군에서 6.50 ± 0.61 배를 나타내었다. 대조군과 비교하여 모든 저항성 운동군에서 유의한 차이를 나타냈으며 운동군과 비교하여 모든 시료 섭취 집단에서 유의한 차이를 나타내었다. 본 실험을 통해 오디와 누에의 섭취는 저항성 운동에 따른 수컷 흰쥐의 골격근에서 근육 관련 유전자인 AR mRNA와 MRFs의 발현에 긍정적인 영향을 미치며 추후 근육 증가를 목적으로 한 운동보조제 개발을 위한 기초 자료가 될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 국책기술개발사업(PJ008274)의 지원에 의해 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Antonio J, Wilson JD, George FW (1999) Effects of castration and androgen treatment on androgen-receptor levels in rat skeletal muscles. *Journal of Applied Physiology* **87**, 2016-2019.
- Asano N, Yamashita T, Yasuda K, Ikeda K, Kizu H, Kameda Y, Kato A, Nash RJ, Lee HS, Ryu KS (2001) Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.). *J Agric Food Chem* **49**, 4208-4213.
- Bamman MM, Shipp JR, Jiang J, Gower BA, Hunter GR, Goodman A (2001) Mechanical load increases muscle IGF-I and androgen receptor mRNA concentrations in human. *American Journal of Physiology* **280**, 383-390.
- Bhasin S, Calof OM, Storer TW, Lee ML, Mazer NA, Jasuja R (2006) Drug insight: Testosterone and selective androgen receptor modulators as anabolic therapies for chronic illness and aging. *Nature Clinical Practice. Endocrinology and Metabolism* **2**, 146-159.
- Cha JY, Kim YS, Kang PD, Ahn HY, Eom KE, Cho YS (2010) Biological activity and chemical characteristics of fermented silkworm powder by mold. *J Life Sci* **20**(2), 237-244.
- Chang CS, Kokontis J, Liao ST (1988) Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of human and rat androgen receptors. *Proceedings of the national academy of*

- sciences of the United States of America **85**, 7211~7215.
- Charge SB and Rudnicki MA (2004) Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological Reviews* **84**, 209~238.
- Chung SH, Kim MS, Ryu KS (1997) Effect of silkworm extract on intestinal α -glycosidase activity in mice administered with a high carbohydrate-containing diet. *Kor J Seric Sci* **39**, 86~92.
- Ferrari G, Cusella-De Angelis M, Coletta M, Stornaioulo A, Paolucci E, Cossu E, Mavilio F (1998) Skeletal muscle regeneration by bone marrow derived myogenic progenitors. *Science* **279**, 1528~1530.
- Fry AC, Kraemer WJ, Stone MH, Warren BJ, Fleck SJ, Kearney JT (1994) Endocrine responses to overreaching before and after 1 year of weightlifting. *Can J Appl Physiol* **19**(4), 400~410.
- Grounds MD, Garrett KL, Iai MC, Wright WE, Bilharz MW (1992) Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. *Cell Tissue Res* **267**, 99~104.
- Heo SI, Jin YS, Jung MJ, Wang MH (2007) Antidiabetic properties of 2,5-dihydroxy-4,3'-di(β -D-glucopyranosyloxy)-trans-stilbene from mulberry (*Morus bombycis koidzumi*) root in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Med Food* **10**, 602~607.
- Hornberger TA and Farrar RP (2004) Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol* **29**(1), 16~31.
- Kadi F, Bonnerud P, Erickson A, Thornell LE (2000) The expression of androgen receptors in human neck and limb muscles: effects of training and self-administration of androgenic-anabolic steroids. *Histochemistry and Cell Biology* **113**, 25~29.
- Kang PD, Kim JW, Jung IY, Kim KY, Kang SW, Kim MJ, Ryu KS (2006) Study on the Unsaturated Fatty Acids in the Pupae of Silkworm, *Bombyx mori*. *Korean J Seric Sci* **48**(1), 21~24.
- Kim AJ, Park SJ, Rho JO (2008) Mulberry fruit extract consumption is inversely associated with hyperlipidemia in middle-aged men. *Korean J Food & Nutr* **21**, 121~126.
- Kim HB, Kim JB, Kim SL (2005) Varietal analysis and quantification of resveratrol in mulberry fruits. *Korean J Seric Sci* **47**(2), 51~55.
- Kim SK (1991) Beneficial medicine, mulberry fruit. In *Bonchohak*. Younglimsa, Seoul, Korea. p598~605.
- Kim SY, Park KJ, Lee WC (1998) Antiinflammatory and antioxidative effects of *Morus* spp. fruit extract. *Korean J Medicinal Crop Sci* **6**, 204~209.
- Kraemer WJ (1998) Endocrine responses to resistance exercise. *Med Sci Sports Exerc* **20**, 152~157.
- Kraemer WJ, Volek JS, Bush JA, Putukian M, Sebastianelli WJ (1998) Hormonal responses to consecutive days of heavy-resistance exercise with or without nutritional supplementation. *J Appl Physiol* **85**(4), 1554~1555.
- Kwon YE, Chung DM, Park H (2004) Effects of the chronic application of hGH and climbing to the aged female SD rats on their morphological and enzymological properties especially in FHL. *The Korean Journal of Exercise Nutrition* **8**, 37~42.
- LaFramboise WA, Jayaraman RC, Bombach KL, Ankrapp DP (2009) Acute molecular response of mouse hindlimb muscles to chronic stimulation. *Am J Physiol Cell Physiol* **297**(3), 566~570.
- Lee DK (2002) Androgen receptor enhances myogenin expression and accelerates differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **294**, 408~413.
- Lee SH, Barton ER, Lee HS, Farrar RP (2004) Viral expression of insulin-like growth factor-1 enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. *J Appl Physiol* **96**, 1097~1104.
- Lee WJ, Thompson RW, McClung JM, Carson JA (2003) Regulation of androgen receptor expression at the onset of functional overload in rat plantaris muscle. *American Journal of Physiology* **285**, 1076~1085.
- Lindzey J, Kumar MV, Grossman M, Young C, Tindall DJ (1994) Molecular mechanisms of androgen action. *Vitamins and Hormones* **49**, 383~432.
- Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402~408.
- Maier A, Zhou Z, Bornemann (2002) The expression profile of myogenic transcription factors in satellite cells from denervated rat muscle. *Brain Pathol* **12**, 170~177.
- McKenna NJ, Lanz RB, O' Mally BW (1999) Nuclear receptor coregulators; cellular and molecular biology. *Endocrine Review* **20**, 321~344.
- Molkentin JD, Olson EN (1996) Defining the regulatory networks for muscle development. *Curr Opin Genet Dev* **6**, 445~453.
- Olson EN and Klein WH (1994) BHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. *Genes Dev* **8**(1), 1~8.
- Ozanne DM, Brady ME, Cook S, Gaughan L, Neal DE, Robson CN (2000) Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the f-actin cross-linking protein filamin. *Molecular Endocrinology* **14**, 1618~1626.
- Oh HC, Ko EK, Jun JY, Oh MH, Park SU, Kang KH, Lee HS, Kim YC (2002) Hepatoprotective and free radical scavenging activities of phenyl flavonoids, coumarin and stilbene from *Morus abla*. *Planta Med* **68**, 932~934.
- Phillips SM, Tipton KD, Aarland A, Wolf SE, Wolfe RR (1997) Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans. *Am J Physiol* **273**, 99~107.
- Phillips SM, Hartman JW, Wilkinson SB (2005) Dietary protein to support anabolism with resistance exercise in young men. *J Am Coll Nutr* **24**(2), 134~139.
- Psilander N, Damsgaard R, Pilegaard H (2003) Resistance exercise alters MRF and IGF-I mRNA content in human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* **95**, 1038~1044.
- Robert AF and Charles HL (2007) Protein kinase B/Akt: a nexus of growth factor and cytokine signaling in determining muscle mass. *Journal of Applied Physiology* **103**, 378~387.
- Ryu KS, Lee HS, Chung SH, Kang PD (1997) An activity of lowering blood-glucose levels according to preparative condition of silkworm powder. *Kor J Seric Sci* **39**(1), 79~85.
- Ryu KS, Lee HS, Kim SY (1999) Effects of *Bombyx mori* larvae extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *J Life Sci* **9**(4), 375~381.
- Ryu KS, Lee HS, Kang PD, Kim KY, Kim MJ, Lee KG (2010) Testosterone secretion effect according to the growth stage of silkworm (*Bombyx mori* L.). *Int J Indust Entomol* **20**(2), 75~77.

- Sheffield-Moore M, Paddon-Jones D, Casperson SL, Gilkison C, Volpi E, Wolf SE (2006) Androgen therapy induces muscle protein anabolism in older women, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **91**, 3844~3849.
- Troy A, Hornberger Jr. TA, Farrar RP (2004) Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Appl Physiol Nutr Metab* **29**, 16~31.
- Volek JS (2004) Influence of nutrition on responses to resistance training. *Med Sci Sports Exerc* **36**(4), 689~696.
- Williams AG, Ismail AN, Sharma A, Jones DA (2002) Effects of resistance exercise volume and nutritional supplementation on anabolic and catabolic hormones. *Eur J Appl Physiol* **86**(4), 315~321.
- Yang JY, Nam JH, Park H, Cha YS (2006) Effects of resistance exercise and growth hormone administration at low doses on lipid metabolism in middle-aged female rats. *Eur J Pharmacol* **539**, 99~107.