ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science **2015** Vol. 25. No. 11. 1214~1222 DOI : http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2015.25.11.1214

The Effects of Pueraria and Rehmannia Glutinosa Intake and Exercise on Epigenetic Modification in Ovariectomized Rat Skeletal Muscle

Hyun Ji Jung[1], Hye Jin Kim[1], Oran Kwon[2] and Won Jun Lee[1]*

[1]*Department of Exercise Science, College of Health Sciences, Ewha Womans University, Seoul 120-808, Korea*
[2]*Department of Nutritional Science and Food Management, College of Health Sciences, Ewha Womans University, Seoul 120-808, Korea*

Received September 22, 2015 / Revised October 13, 2015 / Accepted October 13, 2015

The purpose of this study was to determine the effect of *Pueraria* lobate-root based combination supplementation containing *Rehmannia glutinosa* and exercise on histone modification in ovariectomized rat hindlimb skeletal muscle. Sixty rats were fed with high fat diet and randomly assigned into the following groups for 8 weeks: 1)HSV; High fat+Sedentary+Vehicle, 2)HSP; High fat+Sedentary+PR, 3)HSH; High fat+Sedentary+Estradiol, 4)HEV; High fat+Ex+Vehicle, 5)HEP; High fat+Ex+PR, 6)HEH; High fat+Ex+Estradiol. Exercise consisted of low intensity treadmill exercise(1-4th wk:15 m/min for 30 min, 5-8th wk: 18 m/min for 40 min, 5 times/week). The result of this study showed that exercise and *Pueraria* and *Rehmannia glutinosa* intake suppressed weight gain. Furthermore, exercise and *Pueraria* and *Rehmannia glutinosa* intake increased muscle mass. This study observed H3K9 acetylation and demethylation in plantaris muscle in exercised group, but no difference in soleus muscle. To test whether the decrease in *HDAC4, HDAC5* and *G9a* mRNA levels after exercise and *Pueraria/Rehmannia glutinosa* intake, *HDAC4, HDAC5* and *G9a* mRNA levels were determined by real-time PCR. Only exercise induced *HDAC5* and *G9a* mRNA reduction in plantaris muscle, but not in soleus muscle. In conclusion, these data demonstrates that exercise and *Pueraria/Rehmannia glutinosa* intake effect on body compositions. These changes are regulated by epigenetic modifications, such as histone acetylation and methylation. Future studies should focus on gene-specific epigenetics and other epigenetic mechanism for *Pueraria/Rehmannia glutinosa* intake.

Key words : Epigenetic modification, exercise, ovariectomized rat, pueraria/rehmannia glutinosa, skeletal muscle

서 론

중년 이후 여성들에게 찾아오는 생물학적 변화인 폐경기(menopause)는 체지방율 증가, 골밀도 감소와 우울증 등을 초래하여 삶의 질을 저하 시키는 원인이 된다. 이러한 변화는 여성 호르몬으로 잘 알려진 에스트로겐(estrogen)의 감소로 인해 유도 된다. 에스트로겐의 결핍은 골격근, 뼈, 심혈관계 그리고 뇌의 기능에 부정적 변화를 가져오며[31], 지방 산화에 기여하는 유전자의 발현을 감소시키고[7], 대사적 이상을 일으켜 당뇨로 발전 할 수 있는 잠재적 위험을 높이는 것으로 보고되어 있다[29].

위와 같은 다양한 증상들을 개선시키기 위한 방법으로 폐경기 여성들에게 에스트로겐 보충 치료법이 사용되어 왔는데, 에스트로겐 치료법은 폐경기 후에 관찰되는 내장지방 질량의 증가를 억제 시킬 수 있다고 보고되었다[31]. 특히, 에스트로겐 성분의 대부분을 차지하는 에스트라디올(estradiol; E2)의 투여는 고밀도 지단백질(HDL)을 증가시키고, 저밀도 지단백질(LDL)과 중성지방 그리고 총 콜레스테롤을 감소시킨다고 알려져 있다[9]. 또한 골격근에서는 에너지 대사에 중요한 역할을 하는 효소인 Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)를 활성화 시킨다[6]. 그러나 장기간 에스트로겐 투여는 오히려 암을 발생시키는 등의 부작용을 초래할 수 있다는 연구 결과들이 발표 되면서, 에스트로겐과 유사 기능을 하는 천연 대체제에 대한 관심 및 연구가 급증하고 있다.

에스트로겐의 천연 대체제로 잘 알려져 있는 갈근(*Pueraria* lobata)은 과거로부터 다양한 의료 목적으로 사용된 천연 약초 식품으로서 항산화(antioxidant), 저콜레스테롤혈증(hypocholesterolemia), 항혈전증(anti-thrombosis) 등의 효과를 가진다고 보고되었다[5, 10]. 이소플라본(isoflavones)은 에스트로겐의 분비를 유도하는 물질로 알려져, 식물성 여성 호르몬 대체제로 여겨진다. 갈근에 함유된 대표적인 활성 이소플라본 물질은 푸에라린(puerarin)으로써 난소가 제거된 쥐에게 8주간 섭취 시켰을 때, 대퇴골의 골밀도 소실 감소와 체중 증가 억제 등 다양한 대사적 변화를 유도하는 것으로 밝혀져 있다[17].

***Corresponding author**
Tel : +82-2-3277-2563, Fax : +82-2-3277-2846
E-mail : jun@ewha.ac.kr
This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

또한 중성지방(triglycerides; TG), 총콜레스테롤(total cholesterol; TC)과 저밀도콜레스테롤(LDL-C)을 점차 감소시키고, 고밀도콜레스테롤(HDL-C)을 증가시켜 관상동맥질환 환자에게 나타나는 인슐린 저항성을 개선시키는 것으로 보고되었다[27, 34]. 이러한 대사적 개선 효과에도 불구하고 푸에라린의 효능을 설명할 수 있는 분자적 기전에 관한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다.

지황(*Rehmannia glutinosa*) 또한 이소플라본 물질로서 대표적인 함유물은 카탈폴(catalpol)이다. 카탈폴은 당뇨 치료에 효과적인 물질로 사용되어 왔으며, 당뇨 모델 쥐에서 혈중 글루코스 농도를 낮추는 효과가 보고되었다[8]. 관련 연구에 따르면 당뇨로 인한 당수송체(GLUT4) 발현 감소 현상이 카탈폴 처치에 의해 억제된다고 설명 하였지만[28], 카탈폴에 의한 대사적 개선 효과를 뒷받침 할 대사 관련 유전자 및 단백질에 대한 기전 연구는 아직 부족한 실정이다.

위와 같이 여성 호르몬 대체 물질인 푸에라린과 카탈폴의 효과로 인해 나타나는 대사적 개선 효과는, 운동에 의한 골격근의 적응으로도 나타날 수 있음은 잘 알려진 사실이다. 골격근은 움직임의 기능뿐만 아니라 호르몬, 대사, 신경, 면역 등의 기능을 조절하는 물질들을 분비하는 내분비 기관으로서도 중요한 역할을 하는데, 운동으로 인한 골격근에서의 IL-6 분비, AMPK 활성으로 인한 대사적 개선 효과는 근수축 반응이 매개하는 인슐린 신호 체계 변화에 의한 결과임은 잘 밝혀져 있다[4, 11, 12, 30].

위와 같이, 대사 개선에 영향을 미치는 물질들과 운동으로 인한 신체적 개선 효과들은 근본적으로 유전자 수준에서의 발현 변화가 있어야 가능한 것으로 연구되어 왔다. 그러나 최근 DNA 염기서열의 변화 없이도 유전자의 발현 및 기능이 변화 할 수 있다는 후성 유전(epigenetics)에 대한 관심이 높아지면서, 섭취 물질이나 운동과 같은 후천적 요인에 의해 대사 관련 유전자들의 발현이 어떻게 조절될 수 있는가에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

후성 유전적 변화 기전에는 DNA 메틸화, 히스톤(histone) 변화, non-coding RNA 등이 있다. 이러한 후성 유전적 변화는 유전자 발현 변화와 대사적 개선을 유도하며, 결국 후천적으로 신체에 가해지는 환경적 요인 중 대표적인 요소인 영양소의 섭취, 그리고 운동이 어떠한 메커니즘을 통해 건강을 유지시키거나 개선시킬 수 있는지에 대한 답을 제시할 수 있다[19, 22]. 그 중 히스톤의 후성적 변화는 DNA가 감겨있는 히스톤 꼬리의 라이신(lysine; K), 아르기닌(arginine; R), 세린(serine; S) 혹은 트레오닌(threonine; T) 부분에 인산기, 아세틸기나 메틸기가 붙어 염색질의 구조적 변형이 일어나는 것이다. 히스톤의 아세틸화와 메틸화는 라이신 잔기에서 주로 일어나는데, 특히 히스톤 H3의 K9에서 이루어진다. H3K9에 아세틸화가 일어나면 염색질 구조가 느슨해지는 진정염색질(euchromatin) 구조를 형성하여 전사 활성 과정에 기여하고, 이와 상반되게 히스톤 H3의 K9에서의 메틸화는 이질염색질(heterochromatin) 구조를 형성하여 유전자 침묵(silent)을 유도해 전사를 억제시킨다[26]. 히스톤의 아세틸화는 서로 반대의 작용을 하는 히스톤 아세틸전이효소(histone acetyltransferases: HATs)와 히스톤 탈아세틸효소(histone deacetylase: HDACs)에 의하여 조절되는데, Gcn5와 SRC-1 효소가 전사 활성화 기능을 하는 반면 Class I HDACs 효소들과 Class II HDACs 효소들이 전사 억제 기능에 관여하는 것으로 알려져 있다[23, 33]. 라이신의 잔기에는 하나에서 세 개까지 메틸기(mon-, di-, tri-methylation)가 결합 할 수 있는데, 라이신의 위치와 메틸화 수준에 따라 다양한 전사 활동 패턴을 보인다[15, 16]. H3K9 di-methylation (H3K9me2)과 tri-methylation (H3K9me3)의 신호는 침묵 유전에서 눈에 띄게 나타난다[1, 2]. 히스톤 메틸화(histone methylation)는 히스톤 메틸전이효소(histone methyltransferase; HMT)와 히스톤 탈메틸효소(histone demethylases; HDM)에 의해 조절되는데 H3K9 부분에서는 di-methlyation을 일으키는 G9a 효소와 tri-methylation 일으키는 Suv39h, Clr4 등 효소들이 전사를 억제하며, 탈메틸화를 일으키는 JHDM1a, JHDM2b, JMJD2B 등의 효소들이 전사 활성 기능을 한다[16, 23].

종합해보면, 폐경기에 나타나는 신체적, 대사적 이상은 에스트로겐 유사 대체제와 운동으로 개선될 수 있으며, 그 기전을 후성 유전적 접근을 통해 규명 할 필요성이 있다. 따라서 본 연구에서는 난소적출수술을 시행하여 폐경기가 유도 된 흰 쥐에게 나타나는 갈근/지황 추출물 섭취와 운동의 신체적 개선 효과를 골격근에서 나타나는 후성 유전적 변화를 관찰함으로써 알아보고자 한다.

재료 및 방법

연구대상

본 연구에 사용된 쥐(rat)는 8주령(8-week old, 몸무게 200-210 g)의 SD 암컷 쥐로(n=60), 난소 제거 수술을 실시한 뒤 고지방 식이를 하였다. 이 쥐들을 운동 그룹(exercise)과 비운동 그룹(sedentary)으로 나누고 각각 estradiol 섭취 그룹, 갈근과 지황의 3:1 복합물(HT051) 섭취 그룹, 물 섭취 그룹으로 나누어 개별 사육하였다. 사육 온도는 23.1℃, 습도는 64.1%를 유지하였다. 본 연구는 이화여자대학교 동물실험윤리위원회로부터의 승인 후 진행되었다(IACUC No.14-038).

운동방법

난소 적출 수술을 실시한 뒤 일주일의 회복기간을 거친 후, 본 운동의 하루 전에 속도 8 m/min, 경사 0°의 조건으로 15분간 트레드밀 운동에 대한 적응 훈련을 실시하였다. 적응 훈련 후, 본 운동은 매일 오전 10시부터 경사 0°의 조건에서 하루 1회, 주 5일 빈도로 8주간 실시하였다. 처음 1-4주는 15 m/min

30분, 5-8주는 18 m/min 속도로 40분간 실시하였다.

면역조직화학염색법(Immunohistochemistry)

적출된 근육(가자미근과 족저근)의 횡단면을 4~5 mm 두께로 잘라 tissue processer 기계에 넣고 탈수(dehydration), 투명(clearing), 파라핀 침투(paraffin infiltration) 과정을 거친 뒤, 70℃로 녹인 파라핀으로 조직을 포매(embedding) 하였다. 포매 후 박절기(cutting machine)에서 5 μm 두께로 박절한 조직 절편을 슬라이드에 올려 37℃의 열판에서 건조시켰다. 이후 탈파라핀(deparaffinization), 함수(hydration)를 거친 후 0.02 %의 tritonX-100을 함유한 PBST로 15분간 permiabilization 과정을 거친 뒤, 5% BSA로 30분 동안 blocking 하였다. 이후 H3K9 acetylation polyclonal rabbit antibody, H3K9 di-methylation polyclonal rabbit antibody (Cell Signaling Technology, USA)를 5% BSA에 1:500으로 희석 한 뒤 4℃에서 12시간 처리하였다. 그 후, alexa 488, 568-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)를 5% BSA에 1:250으로 희석하여 상온에서 60분간 반응시킨 후 4′,6-diamidino-2phenylinodole (DAPI)로 20분간 핵 염색을 실행 하였다. 사진은 digital imaging system이 갖춰진 Axiovert 200 fluorescence microscope (Carl Zeiss, Germany)로 촬영하였다.

RNA 추출 및 cDNA 합성과 quantitative RT-PCR analysis

족저근 50 mg당 1 ml, 가자미근 25 mg 당 0.5 ml의 trizol을 넣어 조직을 분쇄하였다. 이후 1:5의 비율의 chloroform을 첨가해 15초간 혼합한 뒤, 4℃에서 13,000 rpm으로 15분간 원심분리 후, 상층액을 분리하여 1:1 비율의 isopropanol을 섞어 12,000 rpm으로 10분간 4℃에서 원심분리 하였다. 원심분리된 상층액을 버리고 추출된 RNA pellet을 DEPC water에 녹인 뒤 65℃에서 15분간 heat-inactivation 하고, ice에 10분간 처리하였다. Nanophotometer를 이용하여 RNA 농도를 측정 하였고, 측정된 농도를 정량하여 1 μg/μl의 RNA를 cDNA master mix (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)와 혼합하여 25℃ 10분, 42℃ 60분, 99℃ 5분의 조건으로 polymerase chain reaction (PCR)을 실행하여 cDNA를 합성하였다.

*HDAC4, HDAC5*와 *G9a*의 mRNA 발현을 측정하기 위하여 2X SYBR Green qPCR master mix (Kapa Biosystems, USA)를 이용하여 quantitative RT-PCR (ABI prism 7700 system) 분석을 실시하였다. 측정값의 신뢰를 위해 모든 샘플을 2회 반복 측정한 뒤, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*의 발현양으로 목표 유전자의 mRNA 발현양을 보정하였다. 사용된 primer들은 모두 Macrogen (Macrogen, KOREA)에서 제작하였으며, 각 유전자의 primer sequence는 Table 1에 제시하였다.

자료처리

본 연구에서는 8주의 처치 후 각 집단의 체중에 대한 근질량의 비와 Real-time PCR을 통한 *HDAC4, HDAC5, G9a*의 집단별 mRNA 데이터 값에 대해 각각의 이원분산분석(Two-Way ANOVA)을 실시하여, 갈근/지황 복합물의 섭취와 운동이 미치는 효과의 통계적 유의성과 상호작용 효과를 유의 수준 0.05를 기준으로 검증하였다. 집단 간 사후 검증은 Tukey 방법을 사용하였다.

결 과

체중

8주간의 트레드밀 운동과 갈근/지황 복합물 섭취에 의한 체중 변화는 Table 2와 같다. 실험 전 각 그룹의 체중에는 유의한 차이가 없었지만(p=0.709), 8주간의 트레드밀 운동과 갈근/

Table 1. Primer sequences for real-time RT-PCR in this study

Gene	Forward primer (5′->3′)	Reverse primer (5′->3′)
HDAC4	CACCGTGCCCAGCACTCCAG-	GGCCTGTGACAAGGGGCGTC
HDAC5	TTCTTCAACTCCGTAGCC	TCCCATTGTCGTAGCG
G9a	CAAGGATGGTGAGGTCTACTGC	GCTCTTGATATCCCAGAACCG
GAPDH	ATGACAATGAATACGGCTACAGCAA	GCAGCGAACTTTATTGATGGTATT

Table 2. Body and hind limb muscle and relative muscle weight

	Body weight (g)		Muscle mass (mg)		Muscle mass/Body weight (mg/g)	
	Baseline	8-weeks	Soleus	Plantaris	Soleus	Plantaris
HSV	206.10 ± 2.25	384.74 ± 12.96	119.956 ± 4.137	343.400 ± 11.207	0.313 ± 0.010	0.896 ± 0.029
HSP	205.53 ± 2.80	325.23 ± 9.86	120.511 ± 3.791	324.478 ± 8.815	0.372 ± 0.013	1.000 ± 0.026
HSH	208.87 ± 1.97	315.18 ± 3.57	114.422 ± 3.205	312.011 ± 8.872	0.363 ± 0.010	0.990 ± 0.024
HEV	206.83 ± 2.34	353.75 ± 12.58	118.622 ± 4.858	340.200 ± 9.467	0.336 ± 0.010	0.967 ± 0.026
HEP	209.155 ± 1.41	308.17 ± 6.28	123.167 ± 2.919	336.566 ± 6.611	0.402 ± 0.014	1.096 ± 0.033
HEH	209.20 ± 2.37	309.03 ± 9.64	122.825 ± 3.648	324.925 ± 1.429	0.400 ± 0.015	1.058 ± 0.030

지황 복합물 섭취 후 체중 변화는 그룹 간 유의한 차이를 나타내었다. 운동과 갈근/지황 복합물이 쥐의 체중에 미치는 효과를 검증하기 위하여 이원분산분석(Two-way ANOVA)을 실시한 결과 물 섭취와 estradiol 섭취, 갈근/지황 섭취 그룹간에는 유의한 차이가 있었다(p=0.000). 사후 검증 결과 갈근/지황 섭취 그룹과 estradiol 섭취 그룹은 유의한 차이가 없었지만(p=0.894), 이 두 그룹과 물 섭취 그룹 간에는 각각 유의한 차이가 있었다(p=0.000). 8주간 운동을 한 그룹과 하지 않은 그룹 간에도 유의한 차이를 보였다(p=0.028). 그러나 두 요인의 상호작용 효과는 통계적으로 유의하지 않았다(p=0.452).

근질량

8주간의 트레드밀 운동과 갈근/지황 복합물 섭취에 따른 근육량을 가자미근(soleus)과 족저근(plantaris)을 적출하여 각각의 체중에 대한 근질량의 비를 산출하였다(Table 2). 그 결과, 가자미근에서 갈근/지황, estradiol과 물 섭취 효과에 따른 유의한 차이가 있었고(p=0.000), 운동의 효과 또한 유의하게 나타났다(p=0.005). 하지만 이 두 요인의 상호작용 효과는 나타나지 않았다(p=0.860). 사후검정 결과, 갈근/지황 섭취 그룹과 estradiol 섭취 그룹 모두 물 섭취 그룹과의 유의한 차이가 있었고(p=0.000), 갈근/지황 섭취 그룹과 estradiol 섭취 그룹 간에는 유의한 차이가 없었다(p=0.851). 족저근에서도 갈근/지황, estradiol과 물 섭취 효과에 따른 유의한 차이가 나타났고(p= .000), 운동의 효과도 유의하게 나타났다(p=0.001). 사후 검증 결과 갈근/지황 섭취 그룹과 estradiol 섭취 그룹 모두 물 섭취 그룹과의 유의한 차이가 있었고(p<.05), 갈근/지황 섭취 그룹과 estradiol 섭취 그룹 간에는 유의한 차이가 없었다(p=0.380).

가자미근(Soleus)에서 H3K9 아세틸화와 메틸화

가자미근에서 8주간의 운동과 갈근/지황 섭취에 의한 H3K9 아세틸화와 메틸화 변화를 관찰하기 위해 면역조직화학염색법을 실시하여 현미경으로 관찰하였다. 운동을 하지 않고, 물을 섭취한 HSV 그룹에서 타그룹과 비교하였을 때 H3K9의 아세틸화(붉은색)가 억제 된 것으로 관찰 되었다. 그러나 H3K9 메틸화를 관찰한 결과 그룹 간 차이가 없었다(Fig. 1, 2).

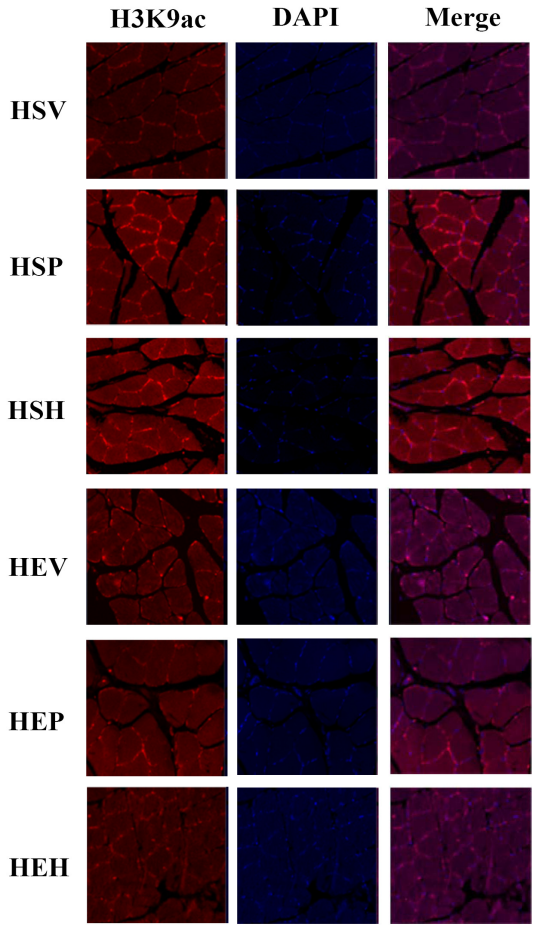

Fig. 1. Immunohistochemistry image of H3K9AC (red) and dapi (blue) staining with skeletal muscle crosssections of soleus.

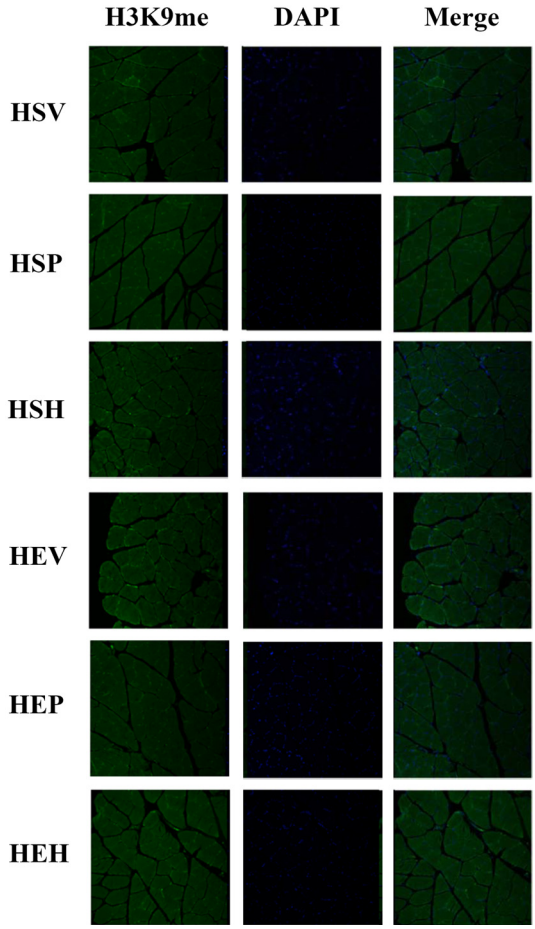

Fig. 2. Immunohistochemistry image of H3K9ME (green) and dapi (blue) staining with skeletal muscle crosssections of soleus.

족저근(Plantaris)에서 H3K9 아세틸화와 메틸화

족저근에서 운동하지 않은 그룹들에 비해 운동한 그룹들에서 전체적인 H3K9 부분의 아세틸화가 일어난 것(붉은색)이 관찰 되었다. 반면 운동한 그룹들에 비해 운동 하지 않은 그룹들의 H3K9 메틸화(녹색)가 관찰 되었다(Fig. 3, 4).

가자미근(Soleus)에서 HDAC4 mRNA 발현

가자미근에서 *HDAC4*의 mRNA 발현양을 관찰하기 위하여 Real-time PCR을 통한 그룹별 데이터 값에 대해 이원분산분석(Two-way ANOVA)을 실시하였다. 그 결과 8주 동안의 갈근/지황, estradiol과 물의 섭취와 운동 모두 유의한 효과가 나타나지 않았고(p>0.05), 운동과 갈근/지황 섭취의 상호작용 효과도 나타나지 않았다(p=0.984) (Fig. 5A).

족저근(Plantaris)에서 HDAC4 mRNA 발현

족저근에서 8주간의 갈근/지황, estradiol과 물 섭취에 의한 *HDAC4*의 mRNA 발현양이 유의한 차이를 보였으며(p=0.040), 사후검증 결과, estradiol 섭취 그룹과 물 섭취 그룹간의 유의한 차이만 나타났다(p=0.037). 운동의 효과는 유의하지 않았으며(p=0.826), 두 요인의 유의한 상호작용 효과 또한 나타나지 않았다(p=0.524) (Fig. 6A).

가자미근(Soleus)에서 HDAC5 mRNA 발현

가자미근에서 8주간의 갈근/지황, estradiol과 물의 섭취와 운동 모두 *HDAC5* mRNA 발현양에 유의한 효과를 미치지 않았고(p>0.05), 운동과 갈근/지황 섭취의 상호작용 효과도 나타나지 않았다(p=0.623) (Fig. 5B).

족저근(Plantaris)에서 HDAC5 mRNA 발현

족저근에서 8주간의 갈근/지황, estradiol과 물의 섭취 그룹간 *HDAC5* mRNA 발현양에는 유의한 차이가 없었지만(p=0.153), 운동에 따른 유의한 차이가 나타났다(p=0.007). 운동과 갈근/지황 섭취의 상호작용 효과는 나타나지 않았다(p=0.852) (Fig. 6B).

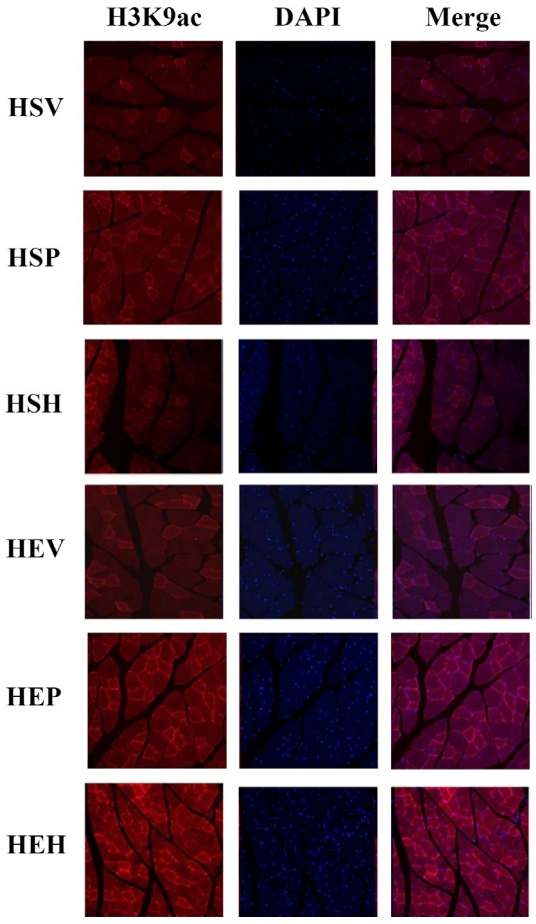

Fig. 3. Immunohistochemistry image of H3K9AC (red) and dapi (blue) staining with skeletal muscle crosssections of plantaris.

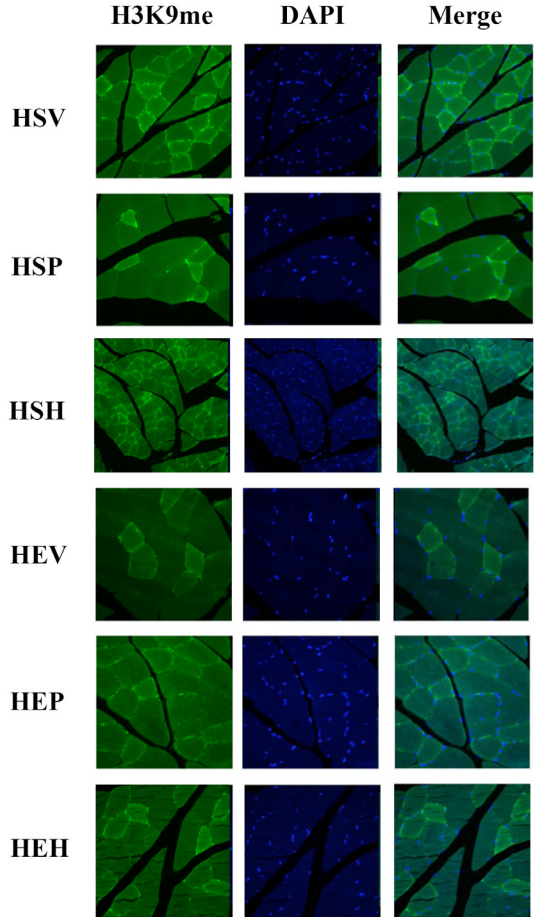

Fig. 4. Immunohistochemistry image of H3K9ME (green) and dapi (blue) staining with skeletal muscle crosssections of plantaris.

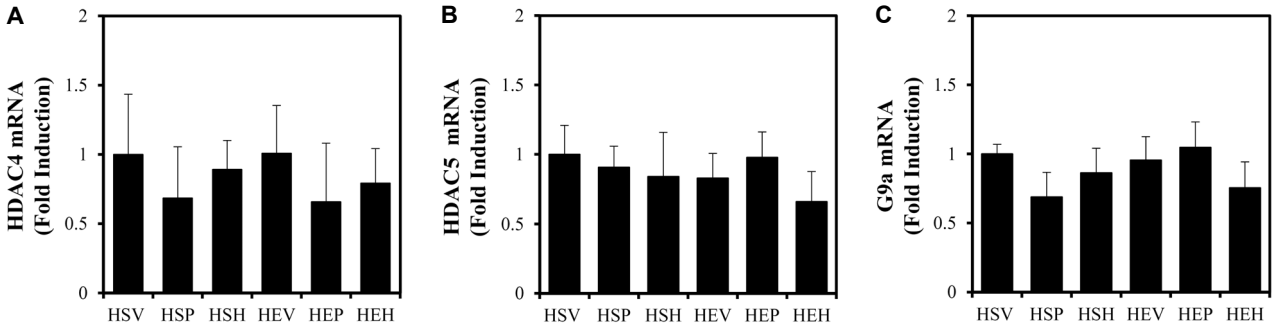

Fig. 5. Target mRNA levels determined by real-time RT-PCR in soleus muscle. *HDAC4* (A), *HDAC5* (B), *G9a* (C). Target mRNA values are shown normalized to the *GAPDH* mRNA level for each sample. Samples were analyzed in duplicate in parallel with *GAPDH*. Values are means ± SE from nine independent experiments. **p*<0.05 vs. control.

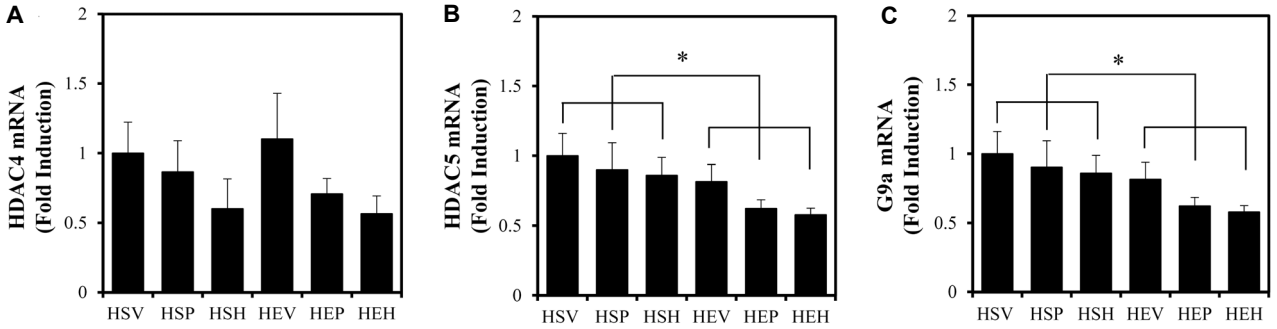

Fig. 6. Target mRNA levels determined by real-time RT-PCR in plantaris muscle. *HDAC4* (A), *HDAC5* (B), *G9a* (C). Target mRNA values are shown normalized to the *GAPDH* mRNA level for each sample. Samples were analyzed in duplicate in parallel with *GAPDH*. Values are means ± SE from nine independent experiments. **p*<0.05 vs. control.

가자미근(Soleus)에서 G9a mRNA 발현

가자미근에서 8주간의 갈근/지황, estradiol과 물의 섭취와 운동 모두 *G9a* mRNA 발현을 유의하게 변화시키지 못하였다 (p>0.05). 운동과 갈근/지황 섭취의 상호작용 효과도 나타나지 않았다(p=0.510) (Fig. 5C).

족저근(Plantaris)에서 G9a mRNA 발현

족저근에서 8주간의 갈근/지황, estradiol과 물의 섭취는 *G9a* mRNA 발현양을 유의하게 변화시키지 못했고(p=0.153), 운동에 의해 유의한 차이를 보였다(p=0.007). 운동과 갈근/지황 섭취의 상호작용 효과는 나타나지 않았다(p=0.852) (Fig. 6C).

고 찰

운동은 골격근을 자극하여 지질과 글루코스 대사를 조절하는 AMPK를 활성화 시킨다. AMPK가 활성화 되면 지방산 산화 및 GLUT4가 증가한다. 이러한 기전을 바탕으로 운동은 골격근에서 지방산화 및 당 흡수와 인슐린 수용력을 증가 시킬 수 있다[4, 11, 12, 30]. 여성 호르몬인 에스트로겐과 유사 기능을 하는 천연 약초인 갈근과 지황의 주요 함유물인 푸에라린과 카타폴 또한 항산화 작용, 골밀도 감소 억제의 기능을 하는 것으로 알려져 있다[8, 10, 17]. 그러나 운동과 갈근 및 지황이 신체 전반에 미치는 긍정적인 생리적 효과에 관한 연구 결과들이 보고되고 있음에도 불구하고 작용 기전에 관한 연구가 미흡하고, 후성 유전적 연구는 더욱 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 난소 제거 수술을 시행하여 폐경기가 유도된 쥐에게 고지방 식이를 섭취 시키면서, 갈근/지황 섭취와 운동이 신체 조성 변화에 영향을 미치는지 관찰하고, 이러한 변화가 과연 후성 유전적 기전을 통한 효과인지에 대해 알아보고자 하였다. 그 결과 첫째, 8주간의 운동을 한 그룹은 대조군에 비해 체중이 유의하게 감소하였다. 갈근/지황을 섭취한 그룹도 체중이 유의하게 감소하였고, estradiol 섭취 그룹과 유사한 효과를 나타내었다. 운동과 갈근/지황 섭취의 상호작용 효과는 나타나지 않았지만, 두 요인 모두 체중 감소 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 선행 연구들에서 제시된 운동의 효과로, 글루코스 대사 활성과 지방 산화 증가에 의한 결과로 볼 수 있다[4, 13, 14, 32]. 또한 갈근 및 지황이 여성 호르몬인 에스트로겐과 유사 기능을 하여, 에스트로겐의 기능으로 보고되어있는 총 콜레스테롤 감소, 공복 시 글루코스 감소, GLUT4 증가, 체중 증가 억제의 기능을 하는 것으로 해석 할 수 있다[17, 25, 27, 34].

둘째, 대표적인 지근(slow-twitch muscle)과 속근(fast-twitch muscle)인 가자미근과 족저근의 상대적 질량을 각각 비교한 결과, 8 주간 운동 실시 그룹의 가자미근과 족저근 질량 모두 운동을 하지 않은 그룹에 비해 유의하게 증가하였다. 갈근/지황을 섭취한 그룹도 대조군에 비해 가자미근과 족저근의 질량이 모두 유의하게 증가 하였고, estradiol 섭취 그룹과 유사한 효과를 나타내었다. 운동과 갈근/지황 섭취의 상호작용 효과는 나타나지 않았지만, 두 요인 모두 가자미근과 족저근 질량의 증가 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다. 운동을 수행하면서 일어나는 근수축 자극은 대표적인 근비대 신호전달 경로인 PI3K/AKT 경로를 통해 근단백질을 활성화하고, 반대로는 Atrogin-1/MURF-1 등과 같은 ubiquitin 합성 효소 활성의 억제를 통하여 근단백질의 손실을 막아줌으로써 근부피 유지 및 증대에 중요한 역할을 한다고 잘 알려져 있다[3]. 그러나 본 연구에서 투여한 갈근/지황의 근질량 증가 효과에 관한 연구는 전무했기 때문에, 에스트로겐의 결핍으로 인한 근감소증을 개선시키는데 있어 갈근/지황의 효과를 증명하였다고 할 수 있겠으나, 작용 기전에 대한 연구가 필요 할 것으로 생각된다.

셋째, 본 연구에서 제시한 갈근/지황의 섭취, 운동이 폐경기 쥐의 체중 감소와 근질량 증가에 기여한 기전에 있어 히스톤의 후성 유전적 변화가 영향을 미쳤음을 확인하였다. 운동이나 물질 섭취를 하지 않은 통제 그룹인 HSV의 가자미근에서 H3K9 아세틸화가 억제된 것이 관찰되었는데, 에스트로겐 기능이 저하된 쥐에게 고지방 식이 섭취만을 시킨 HSV 그룹의 가자미근에서 H3K9의 탈아세틸화가 일어나 후성적으로 유전자 발현이 억제된 것으로 보여진다. 그러나 H3K9 메틸화가 눈에 띄게 관찰되지 않았다는 점으로 미루어볼 때, HSV 그룹에서의 메틸화에 의한 유전자 발현 억제 효과는 없었음을 알 수 있었다. 속근인 족저근에서는 가자미근에 비하여 H3K9 아세틸화, 메틸화 변화가 모두 두드러지게 나타났다. 특히 운동을 한 그룹과 운동을 하지 않은 그룹을 나누어 비교했을 때 운동을 한 그룹의 족저근에서 H3K9 아세틸화가 눈에 띄게 관찰되었다. 또한, 운동을 한 그룹에 비해 운동을 하지 않은 그룹의 족저근에서 H3K9 메틸화가 눈에 띄게 관찰 되었다. 이는 운동이 H3K9의 아세틸화와 탈메틸화를 유도해 전사가 활성화 되고, 운동을 하지 않은 그룹은 고지방 식이와 난소제거로 인한 에스트로겐 활성의 저하로 인하여 H3K9의 탈아세틸화와 메틸화가 일어나 전사가 억제 된다는 사실을 증명한 것이라고 볼 수 있다.

넷째, 근육에서 히스톤 H3K9 탈아세틸화 조절 효소인 *HDAC4*와 *HDAC5*, 메틸화 조절 효소인 *G9a* mRNA의 발현양을 비교한 결과 가자미근에서 *HDAC4, HDAC5, G9a* 모두 유의한 차이가 나타나지 않았고, 족저근에서는 운동 그룹의 *HDAC5*와 *G9a* mRNA 발현양이 운동하지 않은 그룹보다 유의하게 감소하였다. 이는 신체활동 부족으로 인한 근육에서의 HDAC family 활성과 HDAC5의 증가로 인해 GLUT4 유전자의 히스톤에서 탈아세틸화가 일어난다는 선행연구와 유사한 결과로[20], 본 연구에서 제시한 운동에 의한 *HDAC5* mRNA 발현의 감소는 폐경기 대사 기능을 개선시키는 기전에 있어 운동이 중요한 요소임을 뒷받침해주는 결과라 할 수 있겠다. 나아가 HDAC4와 HDAC5는 골격근 분화 및 형성에 중요한 역할을 하는 MEF2 (myocyte enhancer factor2)의 활동을 억제함으로써 근육 분화 유전자를 차단하며, 골격근에서 증가된 HDAC5는 운동 후 나타나는 지근 섬유의 증가를 약화시킨다는 보고가 있었는데[21, 24], 본 연구에서도 운동이 *HDAC* mRNA 발현을 감소시킴으로써 근질량을 증가시켰을 것이라 생각된다. 또한, H3K9 메틸 전이효소인 *G9a* mRNA 역시 운동 그룹의 족저근에서 유의하게 감소 하였음을 알 수 있었다. 이는 G9a가 분화되지 않은 C2C12 근원세포에서 높게 발현되고, 분화하는 동안 감소하였음을 제시하며 G9a가 골격근 분화과정을 조절한다고 보고한 Ling (2012)의 연구 결과를 뒷받침하는 결과로, 운동에 의한 *G9a* mRNA의 발현 감소가 근질량 증가에 영향을 미쳤을 것이라 생각된다.

본 연구 결과를 바탕으로 다음과 같이 제언하고자 한다. 본 연구에서는 가자미근에서의 *HDAC4*와 *HDAC5* mRNA 발현양에는 차이가 없었다. 이러한 현상은 족저근에서 운동의 이점으로 나타나는 후성 유전적 변화가 가자미근에서 보상적으로 작용한 것으로 해석된다. 따라서 근육 형태별 후성 유전 변화의 보상 기전에 관한 연구가 필요할 것이라 생각된다. 또한 난소 제거와 고지방식이 쥐모델에 있어 운동과 갈근/지황 섭취가 대사 및 근질량 개선에 미치는 영향을 전체적(global)인 후성 유전학적 측면에서 접근하였지만, 특정 유전자에 특이적으로 일어나는 후성 유전학적 변화 양상을 연구하지는 못하였다. 향후 대사 및 근육 특이적으로 조절되는 유전자들의 발현 기전을 후성 유전적 관점으로 규명해야 할 것이다. 마지막으로, 본 연구에서 운동에 의한 후성 유전적 변화를 관찰할 수 있었던 반면, 갈근과 지황 섭취가 체중 증가를 억제하고, 근질량은 증가시켰지만 후성 유전적 접근으로는 변화를 관찰할 수 없었다. 이것은 히스톤의 변형이 아닌 다른 후성 유전적 기전의 경로를 통하여 변화가 유도 된 것으로 생각되며, 이에 대해 차후의 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부 및 한국산업기술진흥원의 항노화 산업 제품화 기술개발사업의 일환으로 수행하였음(N0000697, 항노화산업 지원을 위한 인프라구축 및 제품개발).

References

1. Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C. and Kouzarides, T. 2001.

Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410,** 120-124.
2. Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Schones, D. E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I. and Zhao, K. 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129,** 823-837.
3. Bodine, S. C., Stitt, T. N., Gonzalez, M., Kline, W. O, Stover, G. L., Bauerlein, R., Zlotchenko, E., Scrimgeour, A., Lawrence, J. C., Glass, D. J. and Yancopoulos, G. D. 2001. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy *in vivo*. *Nat. Cell. Biol.* **3,** 1014-1019.
4. Carey, A. L., Steinberg, G. R., Macaulay, S. L., Thomas, W. G., Holmes, A. G., Ramm, G., Prelovsek, O., Hohnen-Behrens, C., Watt, M. J., James, D. E., Kemp, B. E., Pedersen, B. K. and Febbraio, M. A. 2006. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation *in vitro* via AMP-activated protein kinase. *Diabetes* **10,** 2688-2697.
5. Chung, M. J., Sung, N. J., Park, C. S., Kweon, D. K., Mantovani, A., Moon, T. W., Lee, S. J. and Park, K. H. 2008. Antioxidative and hypocholesterolemic activities of water-soluble puerarin glycosides in HepG2 cells and in C57 BL/6J mice. *Eur. J. Pharmacol.* **578,** 159-170.
6. D'Eon, T. M., Souza, S. C., Aronovitz, M., Obin, M. S., Fried, S. K. and Greenberg, A. S. 2005. Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. *J. Bio. Chem.* **280,** 35983-35991.
7. Domingos, M. M. 2012. Resistance training restores the gene expression of molecules related to fat oxidation and lipogenesis in the liver of ovariectomized rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* **112,** 1437-1444.
8. Dong, Z. and Chen, C. X. 2013. Effect of catalpol on diabetic nephropathy in rats. *Phytomedicine* **20,** 1023-1029.
9. Godsland, I. F. 2001. Effects of postmenopausal hormone replacement therapy on lipid, lipoprotein, and apolipoprotein (a) concentrations: analysis of studies published from 1974-2000. *Fertil. Steril.* **75,** 898-915.
10. Guerra, M. C., Speroni, E., Broccoli, M., Cangini, M., Pasini, P., Minghett,A., Crespi-Perellino, N., Mirasoli, M., Cantelli-Forti, G. and Paolini, M. 2000. Comparison between chinese medical herb Pueraria lobata crude extract and its main isoflavone puerarin antioxidant properties and effects on rat liver CYP-catalysed drug metabolism. *Life. Sci.* **67,** 2997-3006.
11. Henriksen, E. J. 2002. Invited Review: Effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance. *J. Appl. Physiol.* **93,** 788-796.
12. Holloszy, J. O. 2005. Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity. *J. Appl. Physiol.* **99,** 338-343.
13. Kiens, B. 2006. Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance. *Physiol. Rev.* **86,** 205-243.
14. Kiens, B., Alsted, T. J. and Jeppesen, J. 2011. Factors regulating fat oxidation in human skeletal muscle. *Obes. Rev.* **12,** 852-858.
15. Kim, A., Kiefer, C. M. and Dean, A. 2007. Distinctive signatures of histone methylation in transcribed coding and noncoding human {beta}-globin sequences. *Mol. Cell. Biol.* **27,** 1271-1279.
16. Kouzarides, T. 2007. Chromatin modifications and their functions. *Cell* **128,** 693-705.
17. Lim, D. W., Kim, J. G. and Kim, Y. T. 2013. Effects of dietary isoflavones from puerariae radix on lipid and bone metabolism in ovariectomized rats. *Nutrients* **5,** 2734-2746.
18. Ling, B. M., Bharathy, N., Chung, T. K., Kok, W. K., Li, S., Tan, Y. H., Rao, V. K., Gopinadhan, S., Sartorelli, V., Walsh, M. J. and Taneja, R. 2012. Lysine methyltransferase G9a methylates the transcription factor MyoD and regulates skeletal muscle differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 841-846.
19. Ling, C. and Ronn, T. 2014. Epigenetic adaptation to regular exercise in humans. *Drug. Discov. Today* **19,** 1015-1018.
20. McGee, S. L. and Hargreaves, M. 2006. Exercise and skeletal muscle glucose transporter 4 expression: molecular mechanisms. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **33,** 395-399.
21. McKinsey, T. A., Zhang, C. L. and Olson, E. N. 2001. Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11,** 497-504.
22. Nitert, M. D., Dayeh, T., Volkov, P., Elgzyri, T., Hall, E., Nilsson, E., Yang, B. T., Lang, S., Parikh, H., Wessman, Y., Weishaupt, H., Attema, J., Abels, M., Wierup, N., Almgren, P., Jansson, P. A., Ronn, T., Hansson, O., Eriksson, K. F., Groop, L. and Ling, C. 2012. Impact of an exercise intervention on DNA methylation in skeletal muscle from first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* **61,** 3322-3332.
23. Peterson, C. L. and Laniel, M. A. 2004. Histones and histone modifications. *Curr. Biol.* **14,** 546-551.
24. Potthoff, M. J., Wu, H., Arnold, M. A., Shelton, J. M., Backs, J., McAnally, J., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R. and Olson, E. N. 2007. Histone deacetylase degradation and MEF2 activation promote the formation of slow-twitch myofibers. *J. Clin. Invest.* **117,** 2459-2467.
25. Prasain, J. K., Peng, N., Rajbhandari, R. and Wyss, J. M. 2012. The Chinese Pueraria root extract (*Pueraria lobata*) ameliorates impaired glucose and lipid metabolism in obese mice. *Phytomedicine* **20,** 17-23
26. Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C. P., Allis, C. D. and Jenuwein, T. 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406,** 593-539.
27. Shi, W. G., Qu, L. and Wang, J. W. 2002. Study on interventing effect of puerarin on insulin resistance in patients with coronary heart disease. *Zhongguo ZhongXiYi JieHe ZaZhi* **22,** 21-24.
28. Shieh, J. P., Cheng, K. C., Chung, H. H., Kerh, Y. F., Yeh, C. H. and Cheng, J. T. 2011. Plasma glucose lowering mechanisms of catalpol, an active principle from roots of Rehmannia glutinosa, in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Agric. Food. Chem.* **59,** 3747-3753.

29. Spangenburg, E. E., Wohlers, L. M. and Valencia, A. P. 2012. Metabolic dysfunction under reduced estrogen levels: Looking to exercise for prevent. *Exerc. Sport. Sci. Rev.* **40,** 195-203.
30. Thompson, P. D., Crouse, S. F., Goodpaster, B., Kelley, D., Moyna, N. and Pescatello, L. 2001. The acute versus the chronic response to exercise. *Med. Sci. Sports. Exerc.* **33,** S438-S445.
31. Turgeon, J. L., Carr, M. C., Maki, P. M., Mendelsohn, M. E. and Wise, P. M. 2006. Complex actions of sex steroids in adipose tissue, the cardiovascular system, and brain: Insights from basic science and clinical studies. *Endocr. Rev.* **27,** 575-605.
32. Venables, M. C. and Jeukendrup, A. E. 2008. Endurance training and obesity: effect on substrate metabolism and insulin sensitivity. *Med. Sci. Sports. Exerc.* **40,** 495-502.
33. Wade, P. A. 2001. Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Hum. Mol. Genet.* **10,** 693-698.
34. Wu, K., Liang, T., Duan, X., Xu, L., Zhang, K. and Li, R. 2013. Anti-diabetic effects of puerarin, isolated from *Pueraria lobata* (Willd.), on streptozotocin-diabetogenic mice through promoting insulin expression and ameliorating metabolic function. *Food. Chem. Toxicol.* **60,** 341-347.

초록 : 난소 절제 쥐의 골격근에서 갈근 및 지황 섭취와 운동이 후성 유전적 변화에 미치는 영향

정현지[1] · 김혜진[1] · 권오란[2] · 이원준[1]*
([1]이화여자대학교 건강과학대학 체육과학과, [2]이화여자대학교 건강과학대학 식품영양학과)

본 연구는 난소 제거 수술을 시행하여 폐경기를 유도시킨 뒤 고지방 식이를 섭취한 쥐에게서 나타난 신체 변화에 있어 운동과 갈근/지황 섭취에 의한 개선 효과를 관찰하고, 그러한 효과가 골격근에서의 후성 유전적 발현 변화에 의한 것임을 규명하고자 하였다. 8주령의 쥐(rat, n=60)의 난소를 제거한 뒤 고지방 식이를 유도하면서 트레드밀 운동(exercise)을 실시하는 그룹과 비운동(sedentary) 그룹으로 나누었다. 두 그룹을 각각 estradiol, 갈근과 지황의 3:1 복합물(HT051), 그리고 물 섭취 군으로 다시 나누어 총 8주간 경구 투여를 함께 실시하였다. 그 결과 운동 그룹과 갈근/지황 섭취 그룹에서 체중이 유의하게 감소하였고, 가자미근과 족저근의 근질량 또한 운동 그룹과 갈근/지황 섭취 그룹에서 유의하게 증가하였다. 한편, 가자미근에서 물을 섭취하며 운동하지 않은 그룹의 H3K9 아세틸화가 억제 되었고 H3K9의 메틸화에는 변화가 없었다. 족저근의 경우 운동 그룹에서 H3K9 아세틸화가 현저하게 눈에 띄었고, 반대로 메틸화는 줄어든 것이 관찰되었다. 나아가 H3K9의 아세틸화와 메틸화를 조절하는 대표적인 효소 중 *HDAC4, HDAC5, G9a* 유전자의 mRNA 발현양을 정량한 결과, 가자미근에서는 모두 유의한 차이가 없었고 족저근에서 운동 한 그룹의 *HDAC5*와 *G9a* 유전자의 mRNA 발현양이 유의하게 감소하였지만 *HDAC4*의 mRNA는 차이가 없었다. 또한 운동과 갈근/지황의 상호작용 효과는 나타나지 않았다. 본 연구를 통하여 운동과 갈근/지황 섭취가 체중 감소, 근질량 증가에 영향을 미치고, 이러한 현상은 히스톤 H3K9 부분의 아세틸화와 메틸화에 의한 유전자 발현 조절이 그 기전으로 작용한다는 것을 알 수 있었다.