Journal of the Korean Applied Science and Technology
Vol. 37, No. 1. February, 2020. 91~101
ISSN 1225-9098 (Print)
ISSN 2288-1069 (Online)
http://dx.doi.org/10.12925/jkocs.2020.37.1.91

트레드밀 운동이 고지방 식이 쥐 심근세포의 자가포식 관련 단백질 발현에 미치는 영향

정재훈[1*] · 강은범[2†]

[1]한양대학교 체육학과, 강사
[2]대전대학교 건강운동관리학과, 조교수
(2020년 2월 5일 접수: 2020년 2월 27일 수정: 2020년 2월 28일 채택)

Effect of treadmill exercise on autophagy related protein expression in the cardiac muscle of high-fat diet fed rats

Jeong, Jae-Hoon[1*] · Kang, Eun-Bum[2†]

[1]*Department of Physical Education, Hanyang University*
[2]*Department of Health and Exercise Management, Daejeon University*
(Received February 5, 2020; Revised February 27, 2020; Accepted February 28, 2020)

요 약 : 이 연구는 비만이 심장 조직에서 자가포식 관련 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 고지방 식이(20주)를 통해 비만을 유도한 후 8주간의 트레드밀 운동을 실시하고, 자가포식의 유도, 형성 그리고 자가포식포와 라이소좀 융합단계를 조절하는 단백질의 발현을 확인하였다. 실험동물(SD rat)은 20주간의 고지방식이(탄수화물: 20%, 지방: 60%, 단백질: 20%)를 통해 비만을 유도하였으며, 8주간의 트레드밀 운동(주 5일, 하루 30분, 5분; 8m/min, 5분; 11m/min, 20분; 14m/min)을 실시하였다. 집단 구분은 정상식이 비교군(n=10), 고지방식이 비교군(n=10), 고지방식이 운동군(n=10)으로 구분하였다. 8주간의 트레드밀 운동 실시 전과 후에 경구당부하검사를 실시하여 곡선 하 면적(area under the curve; AUC)을 산출하였으며, 공복시 인슐린 농도와 포도당 농도를 통해 인슐린 저항성 지표인 HOMA-IR과 체중 당 복부지방량(abdominal visceral fat/Body weight; AVF/BW)를 산출하여 비교하였다. 또한 심장 조직에서 자가포식 관련 단백질을 분석하여 운동 트레이닝의 효과를 검증하였다. 장기간의 고지방식이를 통해 HFD-CON 그룹에서는 비만이 유도되었으며, ND-CON 그룹에 비해 체중, AUC, HOMA-IR, AVF/BW가 증가되는 것으로 나타났다. 하지만 8주간의 트레드밀 운동을 실시한 HFD-TE 그룹에서는 AUC, HOMA-IR, AVF/BW가 개선되는 것으로 나타났다. 체중의 경우, 감소되는 경향은 있었지만, 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 자가포식 유도에 관여하는 mTOR와 AMPK는 비만상황에서 모두 감소되었지만, 운동을 통해 증가되는 것으로 나타났다. 자가포식 형성에 관련된 Beclin-1, BNIP3, ATG-7, p62, LC3는 비만상황에서 모두 증가하는 것으로 나타났으며, 운동을 통해 감소되는 것으로 나타났다. 자기포식포와 라이소좀 융합단계 조절하는 Cathepsin L과 LAMP2는 비만상황에서 모두 감소되었으며, 운동을 통해 증가하는 것으로 나타났다. 트레드밀 운동과 같은 신체활동은 대사성 질환에서 나타나는 병리학적 현상을 개선하고 자가포식

†Corresponding author
(E-mail: kbume23@dju.kr)

과정을 정상적으로 유도하는 것으로 나타났다. 따라서 트레드밀 운동이 심장 관련 질환의 예방 및 치료에 있어 일차적으로 고려해야할 필요성이 있다고 제안한다.

주제어 : 트레드밀 운동, 비만, 심근세포, 자가포식

Abstract : The purpose of this study was to investigate the influence of obesity on the expression of autophagy-related proteins in cardiac muscle. To this end, obesity was induced in rats through 20 weeks of high-fat diet, and the animals were then subjected to 8 weeks of treadmill exercise. Subsequently, the expression of proteins that regulate the induction of autophagy, formation of autophagosome, and fusion of autophagosome and lysosome was confirmed. Obesity was induced in the experimental animals (SD rats) through 20 weeks of high-fat diet (carbohydrate: 20%, fat: 60%, and protein: 20%), and they were subsequently subjected to 8 weeks of treadmill exercise (5 days/week, 30 min/day, 5 minutes; 8m/min, 5 minutes; 11m/min, 20 minutes; 14m/min). The experimental groups comprised the normal diet control group (ND-CON, n=10), high-fat diet comparison group (HFD-CON, n=10), and high-fat exercise group (HFD-TE, n=10). Oral glucose tolerance test was conducted before and after 8 weeks of treadmill exercise, and the area under the curve (AUC) was calculated. Through fasting insulin and fasting glucose levels, HOMA-IR, which is an index of insulin resistance, and abdominal visceral fat/body weight (AVF/BW) were calculated for comparison. Moreover, autophagy-related proteins were analyzed from cardiac tissue to investigate the effects of exercise training. Obesity was successfully induced in the HFD-CON group through long-term high-fat diet, and the HFD-CON group had higher body weight, AUC, HOMA-IR, and AVF/BW compared to the ND-CON group. The HFD-TE group, which underwent 8 weeks of treadmill exercise, showed improvements in AUC, HOMA-IR, and AVF/BW. Although the body weight tended to decrease as well, there was no statistically significant difference. mTOR and AMPK, which are involved in the induction of autophagy, both decreased in obesity but increased upon exercise. Beclin-1, BNIP3, ATG-7, p62, and LC3, which are related to the formation of autophagosomes, all increased in obesity and decreased after exercise. Cathepsin L and LAMP2, which regulate the fusion of autophagosome and lysosome, both decreased in obesity and increased upon exercise. Physical activity, including treadmill exercise, was found to induce normal autophagy and improve pathological phenomena observed in metabolic diseases. Therefore, the findings suggest the need to consider treadmill exercise as a primary means to achieve effective prevention and treatment of cardiac diseases.

Keywords : treadmill exercise, obesity, cardiac muscle, autophagy

1. 서 론

비만은 영양과잉, 신체활동의 부족으로 체내에 과도한 지방이 축적된 상태로 낮은 수준의 만성 전신성 염증질환 (a low-grade systemic inflammatory state)으로 정의되며 비만으로 유도된 염증은 인슐린 저항성, 심혈관질환, 그리고 제2형 당뇨와 같은 대사성질환의 발생위험을 증가시킨다고 알려져 있다[1]. 특히 심혈관질환은 한국인 사망의 가장 흔한 원인 중 하나이며, 비만이 이러한 심혈관질환의 위험을 증가시키는 직접적인 원인으로 비만 자체가 심장의 구조와 기능에 비정상적인 변화를 유발하기 때문인 것으로 알려져 있다.

심장 근육세포는 최종분화세포(terminally differentiated cell)로 재생 능력이 부족하기 때문에, 건강한 삶을 유지하기 위해 생존 가능한 심장 근육 세포의 유지는 심장 근육세포의 기능적

역할을 보존하기 위해 중요하며, 세포 사멸을 방지하는 중요한 본질이다[2]. 이러한 측면에서 손상된 단백질과 파손된 세포 내 소기관들의 제거하는 자가포식(Autophagy) 현상은 심장의 보호기전에 대한 중요한 통찰력을 제공한다[2].

자가포식 과정은 세포 내 다양한 스트레스 환경(영양소 고갈, 성장인자 결핍, 소포체 스트레스)에 반응하여 유도되는 분해 시스템으로 비정상적으로 조절이 되면 신경퇴행성질환, 당뇨병, 심장질환과 같은 다양한 질환과 관련이 깊은 것으로 보고되고 있다[3,4]. 일반적으로 자가포식 과정은 주로 세포 내 노화된 단백질과 손상 또는 수명이 다한 기관을 제거하기 위하여 일련의 단계를 거쳐 autophagosome이 형성되면 라이소좀(lysosome)과의 융합(fusion)으로 최종 분해하여 체내 독성의 축적을 억제하게 된다[5]. 특히 자가포식 과정은 심장 보호에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[6]. 자가포식은 심장 조직의 정상적인 발달, 심근 세포 말단 분화 및 정상적인 심장 가소성에 기여한다는 것이다[7]. 결국 이러한 메커니즘의 결함은 심장 항상성 및 심장 스트레스에 대한 반응에 영향을 미쳐 심부전과 관련이 깊다고 알려져 있다[8].

최근 운동과 자가포식 현상에 대한 연구를 살펴보면, 운동과 자가포식의 관련성에 있어서는 다양한 결과들이 보고되고 있다. 실시한 운동의 종류와 강도, 분석시점 그리고 활용한 실험동물의 상태와 분석에 활용한 근섬유 특징에 따라 다양한 결과가 보고되고 있다. 현재 발표되는 대부분의 연구에서 운동이 자가포식 관련 신호전달의 변화를 유도한다고 보고되고 있다[9,10]. 설치류(mice)를 대상으로 장기간의 자발적 휠 런닝은 autophagy flux (p62/SQSTMQ 단백질을 제외한 Beclin 1, BNIP3 and LC3-II)를 증가시켰으며, 이러한 increased basal autophagy 는 지구성 운동으로 유도된 골격근의 적응과 신체활동 개선에 필요하다고 보고하고 있다[11]. Lee 등[2]은 설치류(mice)를 대상으로 한 차례의 운동을 통해 심장 근육에서 자가포식 현상이 증가되었다고 보고하였다. 하지만 비만 상황에서 장기간의 운동이 심장 근육세포의 자가포식 관련 단백질을 조절할 수 있는지에 대한 연구는 많이 부족한 실정이다. 이처럼 비만이 심혈관질환의 위험을 증가시키는 직접적인 원인으로 보고되고 있는 현 상황에서 이와 관련된 연구주제는 많은 연구자들의 관심을 가져야 한다고 생각한다.

비만개선을 위한 치료적 방법으로 식이요법과 운동치료가 많이 활용되고 있다. 특히 운동은 많은 연구를 통해 안정 시 대사량 증가와 지방 분해효소의 증가로 체중과 체지방을 감소시키는데 효과적이라고 알려져 있다[12-14]. 또한 인슐린 민감성의 향상을 통해 지방합성을 감소시키고 저밀도 지단백 콜레스테롤, 중성지방 및 총 콜레스테롤 수준의 감소시켜 대사성 질환의 발병을 억제하고 비만을 개선하는데 효과적이라고 알려져 있다[15,16]. 이처럼 운동을 통한 비만개선은 체내 에너지 대사에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다. 하지만 아직까지 비만상황에서 장기간의 운동이 심장 근육세포의 자가포식 과정에 어떻게 기여하는지에 대한 연구는 많이 부족하기 때문에 본 연구는 비만개선을 위한 운동이 심장 근육세포의 자가포식 과정에 미치는 영향을 분석하여 비만이 심장 근육의 건강에 미치는 영향과 운동을 통한 개선효과를 알아보고자 한다.

2. 연구방법

2.1. 실험동물 및 고지방식이

본 연구는 실험을 실시하기 전에 H대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 얻은 후에 진행하였다. 실험동물은 8주령 Sprague Dawley계 수컷 쥐를 ㈜KOATECH으로부터 분양받아 24주령이 될 때까지 H대학교 동물사육실(온도 22±2℃, 습도 50±5%, 명암주기 12시간)에서 사육하였다. 24주령이 되었을 때 비만을 유도하기 위한 실험동물(n=20)은 20주간 중앙실험동물에서 구입한 고지방사료(D12492; 탄수화물: 20%, 지방: 60%, 단백질: 20%)를 공급하고 식이량과 물은 자유 공급하였다. 실험동물은 정상식이 비교집단(Normal Diet-Control; ND-CON, n=10), 고지방식이 비교집단(High Fat Diet-Control; HFD-CON, n=10), 고지방식이 운동집단(High Fat Diet-Treadmill Exercise; HFD-TE, n=10)으로 구분하였다. 체중은 실험실용 저울을 이용하여 전체 실험기간 동안 주 2회 측정하여 평균값을 사용하였다.

2.2. 운동방법

HFD-TE 그룹은 rodent 트레드밀(DJ2-242, Daejong Instrument Industry Co. Seoul, Korea)에서 경사도를 0%로 고정시킨 후에 하루 30분씩

5일간 사전 적응훈련을 실시하였다. 사전 적응훈련을 마친 후 본 운동은 주 5일, 8주간 실시하였다. 경사도를 0%로 고정시킨 후에 점증적 부하의 강도로 실시하였다(운동시작 5분; 8 m/min, 다음 5분; 11 m/min, 마지막 20분; 14 m/min). 이 연구에서 활용한 운동 프로토콜은 Kim 등[17]이 제시한 중강도 운동 프로그램을 수정하여 실시하였다.

2.3. 포도당부하검사

20주간의 고지방 식이를 통해 비만이 유도된 실험동물을 대상으로 고지방식이 사전(24주령)과 사후(43주령), 그리고 8주간의 트레드밀 운동수행 전(44주)과 후(51주)에 포도당부하검사를 실시하였다. 포도당부하검사는 고지방 식이를 통해 유발한 비만으로 체내 포도당과 인슐린의 기능변화를 알아보고 포도당 처리능력에 변화가 있는지를 확인하였다. 공복 상태에서 30% 글루코스 용액(1.0g/kg body weight)을 경구 투여하고 꼬리정맥에서 총 5회(0분, 30분, 60분, 90분, 120분)에 각각 채혈하여 혈당 측정기를 이용하여 혈당을 측정하였다. 얻어진 혈당데이타를 이용하여 총 글루코스 분비반응면적(area under the curve: AUC)을 분석하였다. 총 글루코스 분비반응면적은 NCSS 2007 프로그램으로 분석하였다.

2.4. 조직 적출 및 혈액검사

8주간 트레드밀 운동이 끝나고 24시간 후에 럼푼/졸리틸 혼합액(2:1, 10mg/kg)을 복강 내 주사하여 마취한 후 혈액, 복부지방 조직 그리고 단백질 발현 측정을 위한 심장 조직을 적출하였다. 혈액은 배대동맥채혈(Abdominal aorta blood collection)을 통해 실시하고 원심분리기를 이용하여 glucose, insulin 분석을 위한 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 녹십자의료재단에 의뢰하여 분석하였다. 복부지방은 복부를 절개하여 복부지방 조직을 적출한 후 차가운 생리식염수로 씻어내고 거즈로 수분을 제거하여 무게를 측정하였다. 심장 조직은 빠르게 적출하여 액체질소에 급냉하여 분석 시까지 −80℃의 초저온 냉동기에 보관하였다.

2.5. HOMA-IR 분석

HOMA-IR 분석을 위한 glucose, insulin의 농도는 녹십자의료재단에 의뢰하여 분석하였으며, HOMA-IR index는 다음 공식에 따라 계산하였다. HOMA-IR = fasting serum glucose (mmol/L) * fasting serum insulin (μIU/mL)/22.5

2.6. Western blot

심장 조직은 lysis 완충액과 함께 homogenizer를 이용하여 조직을 파쇄한 후 4℃에서 13,000g로 15분간 원심분리한 후 상층액을 Bradford meathod에 따라 총 단백질량을 정량하였다. 단백질은 30μg으로 SDS-Polyacrylamide gel(7%, 10%)에서 전기영동 후 PVDF membrane (Amersham, Arlington Heights, IL, USA)으로 전이시키고, 3% BSA가 첨가된 1x TBS-T 용액으로 1시간동안 실온에서 blocking 시킨 후, 각각의 1차 항체와 4℃에서 (12시간 이상) 반응시켰다. 본 연구에서는 BNIP3(#3769, Cell signaling), P62(#5114), BECLIN-1(#3738), LC3(#2775), ATG7(#2631), AMPK(#2532), p-AMPK(#2535) mTOR(#2983), p-mTOR (#2974), Cathepsin L(ab6314, Abcam), LAMP2(sc-8100, Santa Cruz), α-Tubulin (sc-5286) 항체를 사용하였다. 다음날 TBS-T 완충액으로 10분간 3회 세척 후 각각의 1차 항체에 반응하는 2차 항체와 실온에서 1시간동안 반응시킨 후에 다시 TBS-T 완충액으로 10분간 3회 세척후, WBLR solution(Western Blotting Luminol Reagent SC-2048, Santacruz Biotechnology, USA)에 membrane을 넣고 1분간 발색하고 얻어진 membrane을 이미지 분석 시스템(Molecular Imager ChemiDoc XRS System, Bio-Rad, USA)을 이용하여 스캔한 후 Quantity One 1D Analysis Software(Bio-Rad, USA)를 이용하여 단백질량을 산출하였다.

2.7. 자료처리방법

본 연구에서 얻어진 모든 자료는 윈도우용 18.0 SPSS 통계 프로그램을 이용하여 기술 통계치(mean±SD)를 산출하였다. 체중, 복부지방량, AUC, HOMA-IR 그리고 심장 조직에서 자가포식 관련 단백질의 집단 간 차이 분석을 위해 일원변량분석(one way ANOVA)을 실시하고, 집단 간 유의한 차이가 있을 경우 Bonferroni 방법을 이용하여 사후 검증을 실시하였다. 이때 통계적 유의수준은 α=.05로 설정하였다.

3. 결 과

3.1. 체중, AUC, HOMA-IR, AVF/body weight

고지방 식이기간과 운동기간의 체중변화는 〈Table 1〉에 제시된 바와 같다. 먼저, 고지방 식이 24주차(during HFD, initial BW)의 체중을 분산분석한 결과 ND-CON 그룹, HFD-CON 그룹, HFD-TE 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이는 없는 것으로 나타났다[F=0.847, p〉.05]. 고지방 식이 43주차(during HFD, final BW)의 체중을 분산분석한 결과 ND-CON 그룹, HFD-CON 그룹, HFD-TE 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다[F=22.472, p〈.05]. 트레드밀 운동 1주차(during TE, initial BW)의 체중을 분산분석한 결과 ND-CON 그룹, HFD-CON 그룹, HFD-TE 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다[F=24.245, p〈.05]. 트레드밀 운동 8주차((during TE, final BW)의 체중을 분산분석한 결과 ND-CON 그룹, HFD-CON 그룹, HFD-TE 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다[F=23.142, p〈.05]. 경구당부하검사를 통해 얻어진 AUC, HOMA-IR, AVF/body Weight에 대한 결과는 〈Table 2〉에 제시하였다. AUC 결과를 변량 분석을 실시한 결과, 그룹 간에 [F=22.193, p〈.05] 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다. 인슐린 저항성 평가를 위해 공복시 인슐린 농도와 포도당 농도를 이용해서 HOMA-IR에 대한 결과를 변량 분석 실시한 결과, 그룹 간에 [F=22.193, p〈.05] 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다. 체중에 대한 복부지방량 결과를 변량 분석 실시한 결과, 그룹 간에 [F=67.228, p〈.05] 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다.

3.2. mTOR와 AMPK 단백질 변화

트레드밀 운동에 따른 자가포식의 유도 신호전달과 관련이 깊은 mTOR와 AMPK의 결과는 〈Fig. 1〉에 제시하였다. 먼저, mTOR의 경우, ND-CON 그룹, HFD-CON 그룹, HFD-TE 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다[F=58.627, p〈.001]. 사후검증을 실시한 결과, ND-CON 그룹에 비해 HFD-CON 그룹은 발현량이 통계적으로 유의하게 감소되었으며(p〈.001), HFD-CON 그룹에 비해 HFD-TE 그룹은 발현량이 통계적으로 유의하게 증가한 것으로 나타났다(p〈.001). AMPK의 경우, ND-CON 그룹, HFD-CON 그룹, HFD-TE 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다[F=23.038, p〈.001]. 사후검증을 실시한 결과, ND-CON 그룹에 비해 HFD-CON 그룹은 발현량이 통계적으로 유의하게 감소되었으며(p〈.001), HFD-CON 그룹에 비해 HFD-TE 그룹은 발현량이 통계적으로 유의하게 증가한 것으로 나타났다(p〈.001).

Table 1. Comparisons of body weight, AUC, HOMA-IR and AVF/body weihgt

Metabolic parameter		ND-CON	HFD-CON	HFD-TE
During HFD	Initial BW (g)	460.50±14.46	466.60±20.29	471.10±19.51
	Final BW (g)	572.10±25.14	713.00±71.04*	707.30±53.03*
During TE	Initial BW (g)	574.90±21.66	718.40±69.63*	711.80±52.94*
	Final BW (g)	594.60±24.24	742.10±65.59*	704.90±52.33*
AUC		42978.00±5914.89	56731.50±3744.12*	44394.00±5325.04**
HOMA-IR		1.55±0.29	5.54±1.40*	4.16±1.13*,**
AVF/BW (%)		5.71±0.45	9.75±0.97*	8.60±0.89*,**

Values are presented as means ± SD, ND; Normal diet, HFD; High fat diet, TE; treadmill exercise, BW; Body weight, HOMA-IR; homeostasis model assessment-insulin resistance; AVF; abdominal visceral fat. *Denotes statistical difference from the ND-CON group. **Denotes statistical difference from the HFD-CON group (p〈.05).

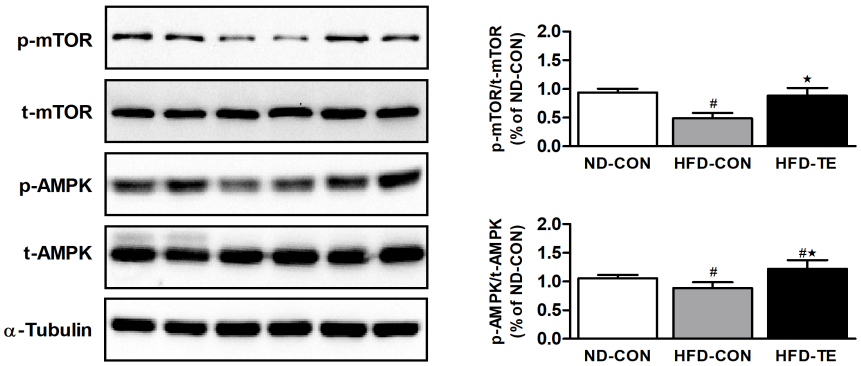

Fig. 1. The effects of treadmill exercise on expression of mTOR and AMPK protein in HFD-fed rats.

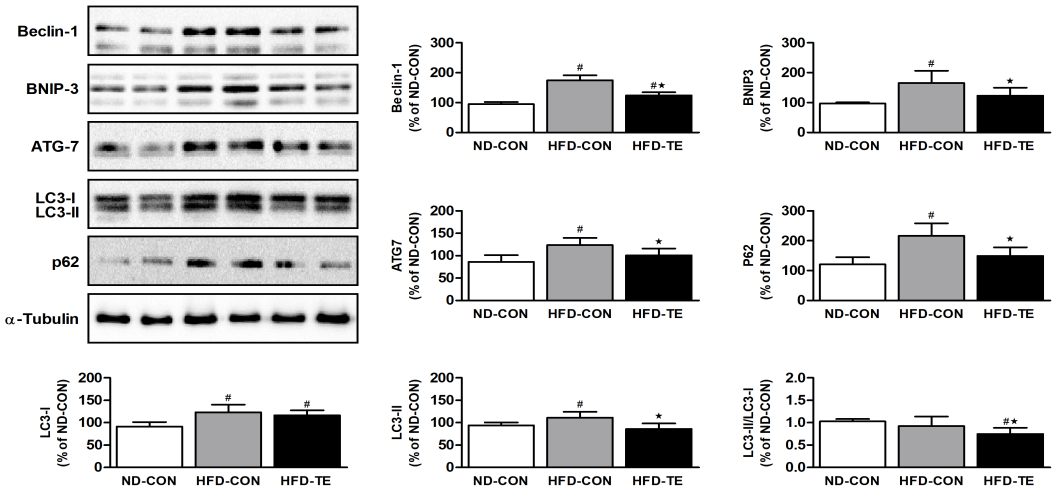

Fig. 2. The effects of treadmill exercise on expression of autophagy-related protein in HFD-fed rats.

3.3. 자가포식에 관련된 단백질 변화

자가포식에 관련된 인자(Beclin-1, BNIP3, ATG-7, p62, LC3)의 결과는 〈Fig. 2〉에 제시하였다. 먼저, Beclin-1의 경우, ND-CON 그룹, HFD-CON 그룹, HFD-TE 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다 [F=109.324, p<.001]. BNIP3의 경우, ND-CON 그룹, HFD-CON 그룹, HFD-TE 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다 [F=14.698, p<.001]. ATG-7의 경우, ND-CON 그룹, HFD-CON 그룹, HFD-TE 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다 [F=14.768, p<.001]. p62의 경우, ND-CON 그룹, HFD-CON 그룹, HFD-TE 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다 [F=22.966, p<.001]. LC3-I의 경우, ND-CON 그룹, HFD-CON 그룹, HFD-TE 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다 [F=16.763, p<.001]. LC3-II의 경우, ND-CON 그룹, HFD-CON 그룹, HFD-TE 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다 [F=12.947, p<.001]. LC3-II/LC3-I ratio의 경

우, ND-CON 그룹, HFD-CON 그룹, HFD-TE 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다[F=8.900, p<.001].

3.4. Cathepsin L, LAMP2 단백질 변화

자가포식포와 라이소좀 융합단계 조절 단백질의 변화는 〈Fig. 3〉에 제시된 바와 같다. 먼저 Cathepsin L의 경우, ND-CON 그룹, HFD-CON 그룹, HFD-TE 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다[F=47.258, p<.001]. LAMP2의 경우, ND-CON 그룹, HFD-CON 그룹, HFD-TE 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다[F=100.380, p<.001].

3. 고 찰

본 연구는 장기간의 고지방식이를 통해 비만을 유도하고 트레드밀 운동을 실시해서 비만관련 병리학적인 현상과 심장 근육세포의 자가포식 과정에 어떤 영향을 미치는지에 대해 알아보았다. 먼저 트레드밀 운동은 비만으로 유도된 체중증가, 복부내장지방량 감소 그리고 체내 인슐린 저항성 개선에 효과적인 것으로 나타났다. 또한 심장 근육세포의 비정상적인 자가포식 과정을 개선한 것으로 나타났다. 이에 대한 자세한 논의는 다음과 같다.

HFD-CON 그룹이 ND-CON 그룹에 비해 체중이 증가되고, AVF/BW 역시 증가된 것으로 나타났다. 특히 ND-CON 그룹에 비해 HFD-CON 그룹에서 공복 시 포도당 농도와 인슐린 농도의 상승과 이에 따른 HOMA-IR, AUC가 증가되는 결과를 보여주고 있다. 물론 이러한 현상이 내당능 장애 혹은 제2형 당뇨병으로 단정할 수는 없지만, 정상식이 집단에 비해 혈당처리능력은 저하되고 고인슐린혈증이 나타나고 있다는 것은 확인할 수 있다. 하지만 트레드밀 운동은 체중과 AVF/BW를 감소시켰으며, 인슐린 저항성 지표 중 하나인 HOMA-IR과 경구당부하검사를 통해 얻어진 AUC가 개선되는 효과가 나타났다. 즉, 비만은 대사성 질환의 발생원인 중 하나이며 촉진시키는 역할을 하지만, 유산소 운동은 포도당과 중성지방의 에너지 동원율을 증가시키고, 이를 통해 체내 지방량 감소, 체중감소 현상이 나타난다고 보고하였다[18,19]. 또한 인슐린 민감성 증가를 통한 혈당처리능력 개선을 통해 인슐린 저항성도 개선된다고 보고하고 있다[20,21]. 본 연구의 결과는 비만 모델에서 운동의 긍정적인 개선효과를 보고한 기존 연구와 일치하는 것으로 나타났다. 즉, 식이로 유도된 체내 에너지대사의 병리적 현상을 트레드밀 운동이 예방하고 개선시킬 수 있는 것으로 나타났다.

자가포식은 손상된 세포 소기관을 제거하고 세포 항상성을 유지함으로서 세포의 품질 관리를 수행하는 과정이다. 하지만 체중이 증가함에 따라 자가포식의 효율성은 감소된다고 알려져 있다[22]. 즉 비만으로 인해 유도된 자가포식 항성성 조절의 악화는 비만, 인슐린저항성, 당뇨병 및 죽상동맥경화증을 포함한 대사 장애와 관계가 깊다는 것이다. 이 연구에서는 자가포식과정을 조절하는 AMPK와 mTOR의 발현을 확인하였다. HFD-CON 그룹에서는 두 단백질 모두 감소된 것으로 나타났으며, HFD-TE 그룹에서는 모두 발현이 증가된 것으로 나타났다. AMPK는 자가포식의 중요한 조절 인자로 활성화된 AMPK는

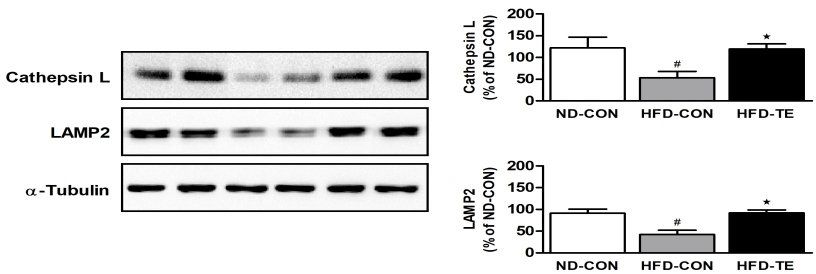

Fig. 3. The effects of treadmill exercise on expression of Cathepsin L and LAMP2 protein in HFD-fed rats.

심장 비대 및 심부전에 대한 보호 효과가 있다고 알려져 있다[23]. AMPK는 직접적으로 mTOR 상위 조절자를 인산화하고 mTORC1의 subunit 인 RAPTOR의 Ser722와 Ser792를 인산화함으로써 mTOR의 활성을 억제하여 자가포식을 증가시킨다고 알려져 있다. 특이한 점은 HFD-TE 그룹에서 mTOR 인산화가 증가된 것으로 나타났다. AMPK 인산화를 통해 자가포식이 유도되는 과정에서 mTOR가 억제되어야 하지만, 오히려 HFD-TE 그룹에서 mTOR 활성이 증가된 것으로 나타났다. 이와 관련해서 명확한 근거를 제시할 수는 없지만, mTOR 신호전달의 활성화[24] 혹은 mTOR 신호전달과는 별개로 자가포식과정이 유도되거나[25], 비만상황에서 운동을 통한 신진대사 활성 증가현상이 mTOR의 활성화를 유도했을 것으로 판단된다[26]. 본 연구에서는 AMPK의 활성화를 통해 자가포식이 유도된 것으로 판단되며, 비만과 운동처치를 통한 자가포식은 기존에 알려진 mTOR 활성 억제를 통한 자가포식 유도와는 다른 신호전달 과정을 통해서도 나타날 수 있음을 암시한다.

최근까지 보고된 운동과 자가포식 현상에 대한 연구를 살펴보면 활용된 동물의 질환유무, 실시한 운동의 종류와 강도, 분석시점 등에 따라 다양한 결과가 보고되고 있다. 하지만 운동이 자가포식 과정의 조절을 통해 심부전과 같은 심장 질환에 효과적이라는 연구들이 증가하고 있다[27,28]. 자기포식 과정과 관련해서 Beclin-1, BNIP3, ATG7, P62 그리고 LC3는 자가포식포(autophagosome)를 형성하는 일련의 단계에 관련된 단백질로 본 연구에서는 자가포식포 형성과 관련된 단백질들의 발현을 확인하였다. Beclin-1, BNIP3, ATG-7, LC3-II/LC3-I ratio는 모두 HFD-CON 그룹에 비해 HFD-TE 그룹에서 모두 감소된 것으로 나타났다. 자가포식포 형성에 관련된 단백질들은 비만 상황에서 증가하고 오히려 운동을 통해 감소된 것으로 나타났다. 자가포식포 형성에 관련된 단백질의 결과만으로 해석하면 오히려 비만상황에서 자가포식이 증가되고 운동을 토해 감소된 것으로 해석할 수 있지만, 자가포식포(autophagosome)와 라이소좀(lysosome)의 융합(fusion) 단계를 조절하는 LAMP-2 단백질과 리소좀 내 단백질 분해효소인 cathepsin L 단백질의 발현 수준은 오히려 감소된 것으로 나타났다. 즉 비만상황에서는 자가포식포와 라이소좀의 융합단계가 억제되면서 자가포식 최종단계로의 진입이 감소된 것이며, 운동 상황에서는 자가포식포와 라이소좀의 융합단계가 진행되면서 최종적으로 자가포식 과정이 증가된 것으로 해석할 수 있다. 운동을 통한 자가포식포 형성 단백질의 발현 감소는 아마도 자가포식의 최종 단계 진입에 따른 정상화 단계로 자가포식 현상의 정상적인 진행과정으로 판단된다. 즉 비만상황에서는 자가포식포의 비정상적인 침작 증가 현상이 나타났지만, 운동을 통해 자가포식 과정이 정상적으로 진행된 것으로 판단된다. 즉 운동을 통해 자가포식 과정이 활성화되면서 정체되어있던 자가포식포와 라이소좀의 융합단계가 증가된 것으로 판단된다. 물론 이와 관련해서 정확한 근거 제시를 위해서는 시간대 별로 관련 단백질의 발현 양상을 확인하는 추가적인 연구도 필요할 것으로 판단된다. Beclin-1의 overexpression은 autophagy를 자극하여 심장 기능 장애 및 병리학적 리모델링을 악화시키고[29], p62 단백질의 발현은 효율적인 autophagy 과정에 필수적이지만 과발현이 되면 autophagy 활성이 오히려 억제되기 때문에 적절한 발현수준이 유지되어야 한다고 알려져 있다[30,31]. 또한, 본 연구의 결과는 Beclin-1의 downregulation이 LAMP2 발현 증가를 통해 autophagic 회전율 (autophagic turnover, autolysosome의 증가)을 증가시키고, 세포 생존 능력을 회복시킨다는 결과[32,33]와 일치하는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 종합하면 비만상황에서 운동을 통한 자가포식 관련 단백질(Beclin-1, BNIP3, ATG7, P62)의 하향조절은 autophagic 회전율을 정상적으로 조절하기 위한 과정이며 나아가 비만으로 유도된 비정상적인 자가포식 과정이 개선되는 과정으로 해석할 수 있다.

4. 결 론

이 연구는 고지방 식이로 유도된 비만상황에서 운동이 심장 조직의 자가포식 관련 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하였다. 장기간의 고지방 식이는 만성적인 비만상황에서 나타나는 체중증가, 인슐린 저항성 지표 그리고 복부지방량 증가 현상이 나타났지만, 트레드밀 운동을 통해 이러한 병리학적 현상이 개선되는 것으로 판단된다. 자가포식 관련 단백질 발현 분석을 통해 비만은 초기 자가포식의 형성을 과도하게 유발하지만, 자기포

식포와 라이소좀 융합단계 조절하는 단백질의 발현을 억제해 실질적인 자가포식을 억제되었다. 하지만, 트레드밀 운동은 비정상적인 자가포식의 초기 단계를 하향조절하고, 자기포식포와 라이소좀 융합을 촉진하는 자가포식 후기 단계를 상향조절하여 자가포식 과정이 정상적으로 일어날 수 있도록 개선한 것으로 판단된다. 결론적으로 트레드밀 운동과 같은 신체활동은 대사성 질환에서 나타나는 병리학적 현상을 개선하고 자가포식 과정을 정상적으로 유도하는 것으로 나타났다. 따라서 트레드밀 운동과 같은 유산소성 운동은 심장 관련 질환의 예방 및 치료에 있어 일차적으로 고려해야할 필요성이 있다고 제안한다.

감사의 글

이 논문은 2017년 대한민국 교육부와 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (NRF-2017S1A5B5A07063275)

References

1. K. E. Wellen, G. S. Hotamisligil, “Inflammation, stress, and diabetes”, *The Journal of clinical investigation*, Vol.115, No.5, pp. 1111-1119, (2005).
2. Y. Lee, E. B. Kang, I. Kwon, L. Cosio-Lima, P. Cavnar, G. T. Javan, “Cardiac Kinetophagy Coincides with Activation of Anabolic Signaling”, *Medicine and science in sports and exercise*, Vol.48, No.2, 219-226, (2016)
3. C. He, D. J. Klionsky,(2009). “Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy”, *Annual review of genetics*, Vol.43, 67-93, (2009).
4. Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., & Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182), 1069-1075.
5. D. Glick, S. Barth, K. F. Macleod, “Autophagy: cellular and molecular mechanisms”, *The Journal of pathology*, Vol.221, No.1, pp. 3-12, (2010).
6. S. Sciarretta, D. Yee, V. Shenoy, N. Nagarajan, J. Sadoshima, “The importance of autophagy in cardioprotection”, *High blood pressure and cardiovascular prevention*, Vol.21, No.1, pp.21-28, (2014).
7. A. B. Gustafsson, R. A. Gottlieb, “Recycle or die: the role of autophagy in cardioprotection”, *Journal of molecular and cellular cardiology*, Vol.44, No.4, pp.654-661, (2008).
8. S. Lavandero, M. Chiong, B. A. Rothermel, J. A. Hill, “Autophagy in cardiovascular biology”, *The Journal of clinical investigation*, Vol.125, No.1, pp. 55-64, (2015).
9. C. He, M. C. Bassik, V. Moresi, K. Sun, Y. Wei, Z. Zou, Z. An, J. Loh, J. Fisher, Q. Sun, S. Korsmeyer, M. Packer, H. I. May, J. A. Hill, H. W. Virgin, C. Gilpin, G. Xiao, R. Bassel-Duby, P. E. Scherer, B. Levine, “Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis”, *Nature*, Vol.481, No.7382, pp. 511-515, (2012).
10. A. M. Sanchez, H. Bernardi, G. Py, R. B. Candau, “Autophagy is essential to support skeletal muscle plasticity in response to endurance exercise”, *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, Vol.307, No.8, pp. R956-969, (2014).
11. V. A. Lira, M. Okutsu, M. Zhang, N. P. Greene, R. C. Laker, D. S. Breen, K. L. Hoehn, Z. Yan, “Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of physical performance”, *Federation of American Societies for Experimental Biology*, Vol.27, No.10, pp. 4184-4193, (2013).
12. A. Boss, V. Lecoultre, C. Ruffieux, L. Tappy, P. Schneiter, “Combined effects of endurance training and dietary unsaturated fatty acids on physical performance, fat

oxidation and insulin sensitivity", *The British journal of nutrition*, Vol.103, No.8, pp. 1151-1159, (2010).
13. B. Morio, C. Montaurier, P. Ritz, N. Fellmann, J. Coudert, B. Beaufrere, M. Vermorel, "Time-course effects of endurance training on fat oxidation in sedentary elderly people", *International Association for the Study of Obesity*, Vol.23, No.7, pp. 706-714, (1999).
14. A. Tremblay, E. T. Poehlman, J. P. Despres, G. Theriault, E. Danforth, C. Bouchard, "Endurance training with constant energy intake in identical twins: changes over time in energy expenditure and related hormones", *Metabolism*, Vol.46, No.5, pp. 499-503. (1997).
15. G. A. Kelley, K. S. Kelley, S. Roberts, W. Haskell, "Efficacy of aerobic exercise and a prudent diet for improving selected lipids and lipoproteins in adults: a meta-analysis of randomized controlled trials", *BMC medicine*, Vol.9, No.74, (2011).
16. V. B. O'Leary, C. M. Marchetti, R. K. Krishnan, B. P. Stetzer, F. Gonzalez, J. P. Kirwan, "Exercise-induced reversal of insulin resistance in obese elderly is associated with reduced visceral fat", *Journal of applied physiology*, Vol.100, No.5, pp. 1584-1589, (2006).
17. H. B. Kim, M. H. Jang, M. C. Shin, B. V. Lim, Y. P. Kim, K. J. Kim, E. H. Kim, C. J. Kim,(2003). "Treadmill exercise increases cell proliferation in dentate gyrus of rats with streptozotocin-induced diabetes", *Journal of diabetes and its complications*, Vol.17, No.1, pp. 29-33, (2003).
18. R. L. Bradley, J. Y. Jeon, F. F. Liu, E. Maratos-Flier, "Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice", American journal of physiology. *Endocrinology and metabolism*, Vol.295, No.3, pp. E586-E594, (2008).
19. X. Rao, J. Zhong, X. Xu, B. Jordan, S. Maurya, Z. Braunstein, T. Y. Wang, W. Huang, S. Aggarwal, M. Periasamy, S. Rajagopalan, K. Mehta, Q. Sun, "Exercise protects against diet-induced insulin resistance through downregulation of protein kinase Cbeta in mice", *Public Library of Science*, Vol.8, No.12, pp. e81364, (2013).
20. J. A. Hawley, S. J. Lessard, "Exercise training-induced improvements in insulin action", *Acta physiologica*, Vol.192, No.1, pp. 127-135, (2008).
21. B. A. Irving, C. K. Davis, D. W. Brock, J. Y. Weltman, D. Swift, E. J. Barrett, G. A. Gaesser, A. Weltman, "Effect of exercise training intensity on abdominal visceral fat and body composition", *Medicine and science in sports and exercise*, Vol.40, No.11, pp. 1863-1872, (2008).
22. Y. Zhang, J. R. Sowers, J. Ren, "Targeting autophagy in obesity: from pathophysiology to management", *Nature reviews. Endocrinology*, Vol.14, No.6, pp. 356-376, (2018).
23. E. P. Daskalopoulos., C. Dufeys, C. Beauloye, L. Bertrand, S. Horman, "AMPK in cardiovascular diseases", *Experientia. Supplementum*. Vol.107, pp. 179-201, (2016).
24. K. Matsunaga, T. Saitoh, K. Tabata, H. Omori, T. Satoh, N. Kurotori, I. Maejima, K. Shirahama-Noda, T. Ichimura, T. Isobe, S. Akira, T. Noda, T. Yoshimori, "Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages", *Nature cell biology*, Vol.11, No.4, pp.385-396, (2009).
25. C. Hiebel, T. Kromm, M. Stark, C. Behl, "Cannabinoid receptor 1 modulates the autophagic flux independent of mTOR- and BECLIN1-complex", *Journal of neurochemistry*, Vol.131, No.4, pp. 484-497, (2014).
26. S. Pons, V. Martin, Portal L, R. Zini, D. Morin, A. Berdeaux, B. Ghaleh, "Regular treadmill exercise re stores cardioprotective

signaling pathways in obese mice inde pendently from improvement in associated co-morbidities", *Journal of molecular and cellular cardiology*, Vol.54, pp. 82-89, (2013).
27. J. C. Campos, B. B. Queliconi, P. M. Dourado, T. F. Cunha, V. O. Zambelli, L. R. Bechara, A. J. Kowaltowski,P. C. Brum, D. Mochly-Rosen, J. C. Ferreira, "Exercise training restores cardiac protein quality control in heart failure", *Public Library of Science*, Vol.7, No.12, pp. e52764, (2012).
28. N. N. Wu, H. Tian, P. Chen, D. Wang, J. Ren, Y. Zhang, "Physical Exercise and Selective Autophagy: Benefit and Risk on Cardiovascular Health", *Cell*, Vol.8, No.11, pp. e1436, (2019).
29. H. Zhu, P. Tannous, J. L. Johnstone, Y. Kong, J. M. Shelton, J. A. Richardson, V. Le, B. Levine, B. A. Rothermel, J. A. Hill, "Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress", *The Journal of clinical investigation*, Vol.117, No.7, pp.1782-93, (2007).
30. G. Bjorkoy, T. Lamark, A. Brech, H. Outzen, M. Perander, A. Overvatn, H. Stenmark, T. Johansen, "p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death", *The Journal of cell biology*, Vol.171, No.4, pp.603-614, (2005).
31. Y. T. Zheng, S. Shahnazari, A. Brech, T. Lamark, T. Johansen, J. H. Brumell, "The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway", *Journal of immunology*, Vol.183, No.9, pp. 5909-5916. (2009).
32. X. Ma, H. Liu, S. R. Foyil, R. J. Godar, C. J. Weinheimer, J. A. Hill, A. Diwan, "Impaired autophagosome clearance contributes to cardiomyocyte death in ischemia/reperfusion injury", *Circulation*, Vol.125, No.25, pp. 3170-3181. (2012).
33. X. C. Ma, R. J. Godar, H. Y. Liu, A. Diwan, "Enhancing lysosome bio genesis attenuates BNIP3-induced cardiomyocyte death", *Autophagy*, Vol.8, No.3, pp. 297-309, (2012).