

## 고지방식을 섭취한 난소절제 암컷 쥐의 수영운동이 백색지방조직의 항혈관신생에 미치는 효과

정선효<sup>†</sup>

목원대학교 테크노과학대학 의생명·보건학부, 교수  
(2020년 2월 17일 접수: 2020년 5월 6일 수정: 2020년 6월 9일 채택)

### Effect of swimming exercise on anti-angiogenesis of white adipose tissue in high-fat diet-fed female ovariectomized mice

Sun-Hyo Jeong<sup>†</sup>

*Division of Biomedical Engineering & Health, Science Management, Mokwon University,  
Doanbuk-ro 88, Seo-gu, Daejeon 302-729, Korea*

*(Received February 30, 2020; Revised May 30, 2020; Accepted June 9, 2020)*

**요약** : 본 연구는 수영운동이 백색지방조직의 혈관신생을 조절함으로써 비만을 개선하는지를 조사하였다. 고지방식을 섭취한 암컷 쥐는 모의 수술 군(Sham), 난소절제 수술 군(OVX) 및 수영운동을 실시한 난소절제 군(OVX + Swim)으로 나뉘었다. Sham에 비해 OVX는 몸무게, 지방조직무게 및 지방세포의 크기가 증가 되었다. 그러나 OVX + Swim의 이러한 요소들( 몸무게, 지방조직무게 및 지방세포의 크기)은 OVX에 비해 감소 되었다. Sham에 비해 OVX는 백색지방조직에서 혈관신생 촉진인자와 MMPs의 유전자 발현이 증가하였고, 혈관신생 억제인자들의 유전자 발현은 감소하였다. 그러나 OVX + Swim은 OVX에 비해 백색지방조직에서 혈관신생 촉진인자와 MMPs의 유전자 발현이 감소하였고, 혈관신생 억제인자들의 유전자 발현은 증가하였다. 이러한 연구결과들은 고지방식을 섭취한 난소절제 암컷 쥐에서 수영운동이 백색지방조직의 혈관신생을 억제함으로써 비만을 개선한다는 것을 제시하였다.

**주제어** : 수영운동, 백색지방조직, 혈관신생, 비만, 고지방식이

**Abstract** : This study investigated whether swimming exercises improves obesity through regulation of angiogenesis in white adipose tissue. Female mice with high-fat diets were divided into sham-operated group (Sham), ovariectomized group (OVX), and swim-trained ovariectomized group (OVX + Swim). Compared to the Sham, OVX increased body weight, adipose tissue mass and size of adipocyte. However, these factors (: such as body weight, adipose tissue mass and size of adipocyte)

<sup>†</sup>Corresponding author

(E-mail: [jsh0227@mokwon.ac.kr](mailto:jsh0227@mokwon.ac.kr))

\* This article is a revision of the first author's master's thesis from University.

\* 이 연구는 2019년 000 에서 발표된 것을 수정·보완하여 작성됨

of OVX + Swim decreased compared with OVX. Compared with the Sham, OVX increased the mRNA expression of angiogenic activator and MMPs and decreased the mRNA expression of angiogenic inhibitors in white adipose tissue. But OVX + Swim decreased the mRNA expression of angiogenic activator and MMPs and increased the mRNA expression of angiogenic inhibitors in white adipose tissue, compared with the OVX. These results suggested that swimming exercises the angiogenesis in white adipose tissue, resulting to improve obesity in high-fat diet-fed female OVX mice.

*Keywords : Swimming exercises, White adipose tissue, Angiogenesis, Obesity, High-fat diet*

## 1. 서론

전 세계적으로 비만은 가장 심각한 건강문제로 인식되고 있다. 비만과 결합되어 발생하는 복잡한 건강문제로는 고혈압, 고지혈증, 심혈관계 질환, 제2형 당뇨병 등 여러 만성질환이 있다. 따라서 전문가들은 비만 자체를 만성적인 질환으로 규정하고 치료할 것을 권하고 있다.

환경적 요인, 유전적 요인, 호르몬의 변화, 나이 등이 비만을 유발하는 중요한 인자로 작용하고 있다. 남녀 모두 나이가 증가할수록 비만이 증가되고 대사증후군의 유병률이 증가되는 경향을 나타낸다. 여성은 50대를 전후로 난소기능의 저하로 인한 폐경현상이 동반되면서 비만 발생이 증가한다. 폐경 전 여성에 비해 폐경 후 여성은 몸무게와 지방무게가 증가하였고, 혈중 총 콜레스테롤과 저밀도 지질단백질 콜레스테롤이 증가하였다[1,2]. 또한 폐경 후 여성은 허리-엉덩이둘레 비율(Waist-to-hip ratios)이 증가되면서, 만성질환의 발생과 매우 밀접한 관련이 있는 복부비만의 발생이 증가되었다[3]. 따라서 폐경 후 여성은 비만과 관련된 다양한 만성질환의 발병률이 높다는 점을 인지하고 비만의 예방과 치료에 집중하여야 할 것이다.

혈관신생(angiogenesis)은 기존에 존재하던 혈관에서 새로운 혈관이 형성되는 것이다. 혈관신생은 생체 내에 존재하는 모든 세포들에게 산소와 영양분을 공급하여 항상성을 유지하기 위한 정상적인 생리작용으로써 상처치유나 성장 과정에 필수적인 작용이다. 그러나 혈관신생이 과도하거나 부족한 경우 질병이 발생한다. 과도한 혈관신생은 암의 성장과 전이, 당뇨병성 망막질환, 노인성 황반변성과 같은 질환의 진행과정에서 중요한 역할을 하며, 부족한 혈관신생은 뇌졸중, 심근경색,

상처치유의 지연 등의 원인이 된다[4].

혈관신생은 지방조직의 확대에도 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 지방조직은 혈관이 고도로 발달되어 있고, 광범위하게 퍼져있는 혈관망에 의해 지방세포는 영양분을 공급받으며[5], 지방조직에서의 혈관 확장(angiogenic expansion)은 지방세포의 증식과 크기 성장을 위해 필요한 작용이다[6]. 따라서 지방조직 무게의 증가는 미소순환(microcirculation)의 확대가 반드시 동반되어야만 한다[7].

비만 발생과 관련된 지방조직의 증가는 인체의 에너지 불균형으로 발생한 과잉의 열량이 중성지방 형태로 지방조직에 저장되어 지방세포의 크기의 증가하는 과정뿐만 아니라 지방선구세포(preadipocyte)에서 지방세포(adipocyte)로 분화되는 지방세포생성(adipogenesis) 과정에 의한 것이다. 대부분의 조직은 성인기에 성장하지 않지만 지방조직은 성인시기 동안에도 성장하는 능력을 가지고 있으며, 비만 시기에 동반되는 지방조직의 성장은 지방세포생성뿐만 아니라 혈관신생과도 밀접한 관련이 있다[8]. 지방조직의 혈관 붕괴는 지방세포의 크기와 몸무게를 상당히 감소시켰다[9]. 유전적으로 비만이 유도된 ob/ob 쥐와 고지방식이 섭취로 비만이 유도된 C57BL/6 쥐 모두에게 혈관신생 억제제를 투여하였을 경우 몸무게와 지방무게가 감소되었으며, 이러한 연구결과들은 혈관신생 억제제에 의한 항비만 작용이 항혈관신생 작용(antiangiogenic activity)에 의한 것임을 제시하였다[10,11]. 또한 혈관신생 억제제가 처리된 쥐의 지방조직에서 혈관내피세포의 증식은 감소하고 사멸 세포(apoptotic cell)는 증가하는 혈관 리모델링(vascular remodeling)이 관찰되었다[11]. 이러한 연구결과들은 혈관신생과 비만과의 밀접한 관련성을 제시하고 있다.

현대사회에서는 비만을 일으키는 주된 환경적 요인인 잘못된 서구화된 식이 섭취와 운동 부족에 의한 비만 발생이 증가하고 있다. 따라서 현대인들은 잘못된 생활습관의 개선을 통한 비만 조절에 노력하고 있다.

지속적인 운동은 운동 시의 에너지 소비를 증가시키는 동시에 기초대사율(basal metabolic rate)도 증가시키므로 체중조절과 체지방조절을 위해 규칙적인 운동은 반드시 필요하다[12]. 또한 유산소 운동은 혈중 지질 성분을 유익한 방향으로 개선함으로써 심혈관계 질환의 치료 및 예방 효과를 나타내었다고 보고하였다[13,14].

고지방식이를 섭취한 수컷 쥐에서 유산소 운동인 수영운동은 수영운동을 실시하지 않은 쥐에 비해 몸무게, 지방조직무게 및 혈중 지질 성분들을 개선하였다[15]. 고지방식이를 섭취한 난소절제 암컷 쥐에서 수영운동은 몸무게와 지방조직무게를 감소시켰으며 지방조직에서 지방산 산화에 관여하는 유전자의 발현을 증가시키고 지방생성(lipogenesis)에 관여하는 유전자의 발현을 감소시킴으로써 수영운동이 비만과 지질개선의 효과가 있음을 보고하였다[16]. 또한 수영운동은 고지방식이 섭취로 비만이 유도된 쥐의 몸무게, 혈당 및 간조직의 지질 축적을 개선하였고 간조직에서의 PPAR $\alpha$ 와 지방산  $\beta$ -산화를 증가시키고 PPAR $\gamma$ 와 지방생성을 감소시킴으로써 고지방식이의 만성적인 섭취로 인한 부정적인 건강상태를 개선하였다[17].

이러한 연구결과들은 규칙적인 수영운동이 지질대사에 관여하는 유전자의 발현을 조절함으로써 비만을 조절하고 건강을 긍정적인 방향으로 개선하는 효과가 있다는 것을 시사하고 있다. 그러나 수영운동에 의한 비만 개선 효과와 백색지방조직에서의 혈관신생 작용과의 관련성에 관한 연구는 아직 미미한 상태이다.

따라서 본 연구는 비만 폐경기 여성의 동물실험모델인 고지방식이를 섭취한 난소가 절제된 암컷 쥐에서 규칙적인 수영운동이 백색지방조직에서의 혈관신생 작용에 관여함으로써 비만을 조절하는지를 규명하는데 연구목적이 있다.

## 2. 실험

### 2.1. 실험재료

#### 2.1.1. 실험식이

고지방식이 사료는 Research diets사(New Brunswick, NJ, USA)로부터 구입하여 실험에 사용하였으며 총 칼로리의 45%가 지방이 함유된 사료이다.

#### 2.1.2. 실험대상

본 연구에 사용된 실험동물은 (주)대한바이오링크(Chungbuk, Korea)로부터 구입한 7주령 된 C57BL/6J종 암컷 쥐이다. 모든 실험 쥐는 1주일간의 적응 기간이 지난 후 실험에 사용하였고, 8주 동안 12h light/darkness cycle 조건과 항균 상태에서 물과 먹이를 충분히 공급받으면서 사육되었다[18].

암컷 쥐는 무작위로 3그룹 즉, 모의 수술 그룹(Sham; sham-operated group), 난소절제 수술 그룹(OVX; ovariectomized group), 그리고 난소절제 수술 후 실험 기간 8주 동안 수영 운동을 실시한 그룹(OVX + swim)으로 분류하였고, 각 그룹 당 8마리씩 사용되었다(n=8/group). 난소가 절제된 암컷 쥐는 난소를 절제한 1주 후에 실험에 이용되었으며 모든 실험동물 쥐는 45% kcal fat이 함유된 고지방식이 사료(Research Diets, New Brunswick, NJ)를 실험 기간 8주 동안 섭취하였다. 모든 실험동물 쥐는 일주일에 2회의 몸무게를 측정하였고 12시간 동안의 공복시기가 지난 후 쥐를 죽였으며, 지방조직은 무게 측정 후 사용할 때까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 모든 실험동물은 목원대학교의 기관 동물관리(Institutional Animal Care) 및 사용위원회(Use Committee)의 승인(No. NVRQS AEC-16)을 받았으며 국가 연구위원회 지침(National Research Council Guidelines)에 따라 시행되었다.

#### 2.1.3. 수영운동 프로그램

난소가 절제된 암컷 쥐는  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 가 유지되는 1m $\times$ 1m 크기의 water bath (Jeiotech, Seoul, Korea)에서 8주 동안 하루에 1시간씩, 1주일에 5일씩 수영운동을 실시하였다. 수영운동 1회 실시 때마다 10분에서 1시간으로 점진적으로 수영운동 시간을 증가시키는 실험 시작 2주 동안의 적응훈련 기간을 가졌다.

## 2.2. 실험방법

### 2.2.1. 조직형태학적 분석

생식기 주변의 백색지방조직(parametrial adipose tissue)은 하루 동안 10% phosphate-buffered formalin에 고정하고 파라핀(paraffin)으로 포매한 후, 5  $\mu\text{m}$  두께로 절편하여 슬라이드를 만들어 탈수과정과 세척과정을 거친 후, hematoxyin(핵 염색)과 eosin(세포질 염색)을 이용하여 염색하였다. 염색한 조직의 형태학적 변화는 광학 현미경과 Image Analysis System (Image pro-plus, MD, USA)으로 분석하였다[15].

### 2.2.2. Total RNA 추출

지방조직의 total RNA를 분리하기 위해서 1ml Trizol (Invitrogen, Avenue Carlsbad, U.S.A.)에 100mg 지방조직을 넣고 20초 동안 homogenizer를 이용하여 조직을 균질화하고 5분 동안 상온에 두었다. 여기에 200 $\mu\text{l}$  chloroform (Sigma, U.S.A.)을 첨가하고 chloroform이 잘 섞이도록 15초 동안 가볍게 흔들어 혼합하고 3분 동안 상온에 보관한 후 13,000rpm에서 15분 동안 원심분리(4 $^{\circ}\text{C}$ )하였다. 원심분리된 용액의 맑은 상층액을 새로운 튜브에 분리하고 동량의 isopropanol (Sigma, U.S.A.)을 첨가하여 10분 동안 상온에 둔 후 13,000rpm에서 10분 동안 원심분리(4 $^{\circ}\text{C}$ )하였다. 용액을 제거하고 70% ethanol을 1ml 첨가하여 RNA pellet을 2회 세척 하였다. RNA pellet을 완전히 건조시킨 후 0.01% DEPC (Sigma, U.S.A.)가 처리된 증류수를 30 $\mu\text{l}$  첨가하여 가볍게 튜브를 두드리면서 RNA pellet을 녹였다.

### 2.2.3. 표적 유전자 발현분석

역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR : reverse transcription-polymerase chain reaction)을 이용하여 표적 유전자의 발현을 분석하였다. 2 $\mu\text{g}$ 의 total RNA, 0.5 $\mu\text{g}$ 의 reverse primer 및 0.01% DEPC water를 혼합하여 최종 14 $\mu\text{l}$  용액을 준비하여 15분 동안 75 $^{\circ}\text{C}$ 에서 반응시킨 후 얼음 속에 5분 동안 보관하며, 여기에 200 units M-MLV RT (Promega, Madison, WI, USA), 5X M-MLV reaction buffer, 10 mM dNTP mixture 및 0.01% DEPC water를 첨가하여 최종 25 $\mu\text{l}$  용액을 만든 후 42 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 반응시켜서 complementary DNA (cDNA)를 합

성하였다.

5 $\mu\text{l}$ 의 RT reaction에 10 $\mu\text{M}$  primer, 10mM dNTP, 10X reaction buffer ( $\text{Mg}^{2+}$ 포함), 5 units Taq polymerase (Solgent, Daejeon, South Korea) 및 0.01% DEPC water를 첨가하여 최종 50 $\mu\text{l}$  용액을 만든 후, RTC-100TM Programmable Thermal Controller (MJ Research, INC., Waltham, MA, USA) 기기를 이용하여 증폭시켰다. Table 1은 표적 유전자 분석에 이용된 primer sequences와 PCR conditions이다.

### 2.3. 분석방법

본 실험 결과는 SigmaPlot 2001 (SPSS Inc.) 통계프로그램을 이용하여 평균과 오차(mean  $\pm$  standard deviation, M  $\pm$  SD)로 나타내었고, 각 실험군 간의 유의성은 unpaired, student's t-test를 사용하여 분석하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 몸무게와 지방조직무게의 변화

비만을 결정하기 위해 사용되는 지표로는 여러 가지가 있지만 가장 우선적으로 몸무게와 체지방 무게의 증가를 측정하여 비만을 판정한다. 따라서 본 연구는 고지방식이를 8주 동안 섭취한 난소가 절제된 암컷 쥐에서 몸무게 변화에 대한 수영운동의 영향을 조사하였다(Fig. 1). 실험에 사용된 3그룹 즉, Sham, OVX 및 OVX + Swim의 실험시작 0주째 몸무게는 그룹 간 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다. 실험 8주째 몸무게를 분석한 결과, Sham의 몸무게에 비해 OVX의 몸무게는 통계적으로 유의하게 40.5% 증가되었고( $p < 0.05$ ), OVX + Swim의 몸무게는 OVX의 몸무게에 비해 통계적으로 유의하게 26.9% 감소되었다( $p < 0.05$ ).

수영운동에 의한 몸무게의 변화가 지방조직무게의 변화와 관련이 있는지 알아보기 위해 지방무게를 조사하였다(Fig. 2). Sham에 비해 OVX는 총 지방조직무게, 서혜부 주변 피하 백색지방조직(Inguinal adipose tissue) 무게 및 생식기 주변 내장 백색지방조직(parametrial adipose tissue) 무게가 각각 412.5%, 250% 및 360% 씩 통계적으로 유의하게 증가되었다( $p < 0.05$ ). 그리고 OVX에 비해 OVX + Swim은 총 지방조직무게,

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers and PCR conditions

Gene	Size (bp)	Primer sequences	Annealing (°C)	Cycle
FGF-2	293	F: 5' -aactacaactcaagcagaagagaga-3' R: 5' -ttaagatcagctcttagcagacat-3'	58	34
VEGF-A	561	F: 5' -gctctctgggtgactgga-3' R: 5' -caccgccttgctgtcaca-3'	58	38
MMP2	224	F: 5' -agatcttcttcaaggaccggtt-3' R: 5' -ggctggtcagtgctgggta-3'	58	34
MMP9	683	F: 5' -tgcgaccacatgaacttcg-3' R: 5' -gagaagaagaaaacctcttgg-3'	58	37
TSP-1	556	F: 5' -cctcattgtgtgactgagtaa-3' R: 5' -ttgtgtccttgatcataagaaac-3'	57	34
TIMP-1	170	F: 5' -ggcatcctctgtgctatcactg-3' R: 5' -gtcatcttgatctcataacgctgg-3'	58	34
TIMP-2	320	F: 5' -gagatcaagcagataaagatg-3' R: 5' -gaccagtccatccagaggc-3'	58	34
$\beta$ -actin	348	F: 5' -tggaatcctgtggcatccatgaaac-3' R: 5' -taaaacgcagctcagtaacagtccg-3'	58	28

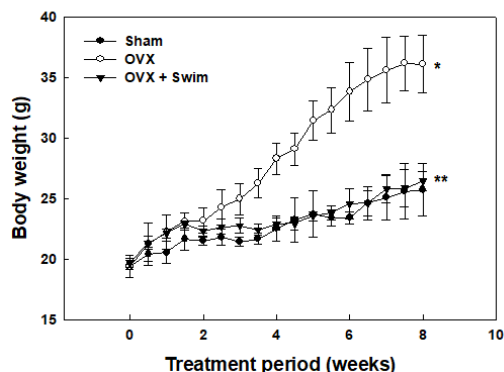


Fig. 1 Effects of swimming on body weight in high-fat diet-fed female ovariectomized mice.

All mice received a high-fat diet for 8 weeks. All values are expressed as  $M \pm SD$ . \*Significantly different *versus* Sham group,  $p < 0.05$ . \*\*Significantly different *versus* OVX group,  $p < 0.05$ . Sham; sham-operated group, OVX; ovariectomized group, OVX + Swim; swim-trained ovariectomized group.

서혜부 주변 피하 백색지방조직(Inguinal adipose tissue) 무게 및 생식기 주변 내장 백색지방조직

(parametrial adipose tissue) 무게가 각각 67.1%, 57.1% 및 65.2% 씩 통계적으로 유의하게 감소되었다( $p < 0.05$ ).

따라서 본 연구는 고지방식이를 8주 동안 섭취한 난소절제 암컷 비만 쥐에서 수영운동이 고지방식이 섭취로 증가된 몸무게와 지방조직무게를 감소시키는 효과가 있음을 보여주었다.

### 3.2. 지방세포의 형태학적 변화

지방조직무게는 과잉의 에너지가 백색지방세포에 축적되어 지방세포의 크기가 커지는 비대(hypertrophy)와 관련이 있으므로, 수영운동에 의한 지방조직무게의 감소가 백색지방세포의 크기 변화에 의한 것인지를 확인하였다(Fig. 3). 고지방식이를 섭취한 OVX는 Sham에 비해 지방세포의 크기가 증가되었으나, OVX의 커진 지방세포의 크기는 수영운동에 의해 현저히 감소되었다.

### 3.3. 혈관신생과 관련된 유전자 발현의 변화

수영운동에 의한 지방조직무게의 감소가 백색지방조직에서의 혈관신생 작용과 관련이 있는지를 조사하였다(Fig. 3 and Fig. 4). 혈관신생은 혈관신생 촉진인자들에 의해 혈관내피세포들이 활성화되면서 일어난다. 그리고 활성화된 내피세포

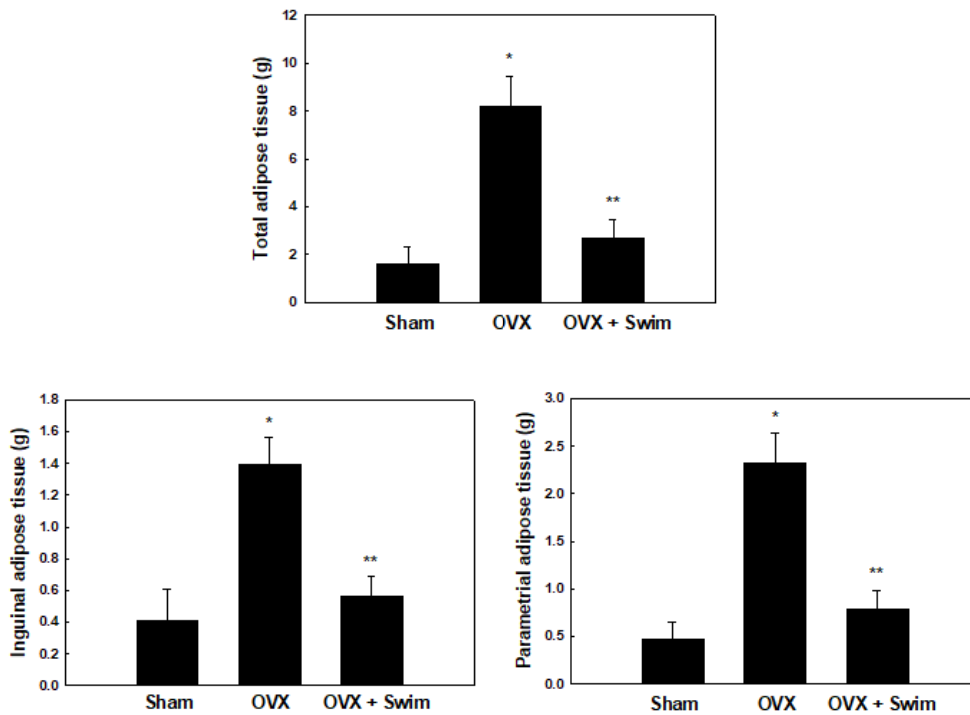


Fig. 2. Changes in adipose tissue mass by swimming in high-fat diet-fed female ovariectomized mice.

All mice received a high-fat diet for 8 weeks. All values are expressed as  $M \pm SD$ . \*Significantly different *versus* Sham group,  $p < 0.05$ . \*\*Significantly different *versus* OVX group,  $p < 0.05$ . Sham; sham-operated group, OVX; ovariectomized group, OVX + Swim; swim-trained ovariectomized group.

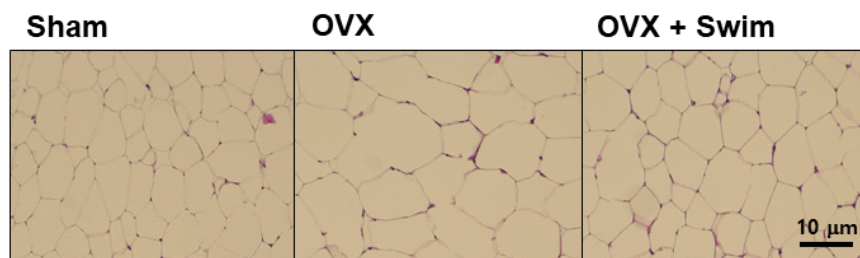


Fig. 3. Changes in adipocyte size by swimming in high-fat diet-fed female ovariectomized mice. All mice received a high-fat diet for 8 weeks. The parametrial adipose tissues were stained with hematoxylin and eosin (original magnification,  $\times 200$ ). Sham; sham-operated group, OVX; ovariectomized group, OVX + Swim; swim-trained ovariectomized group.

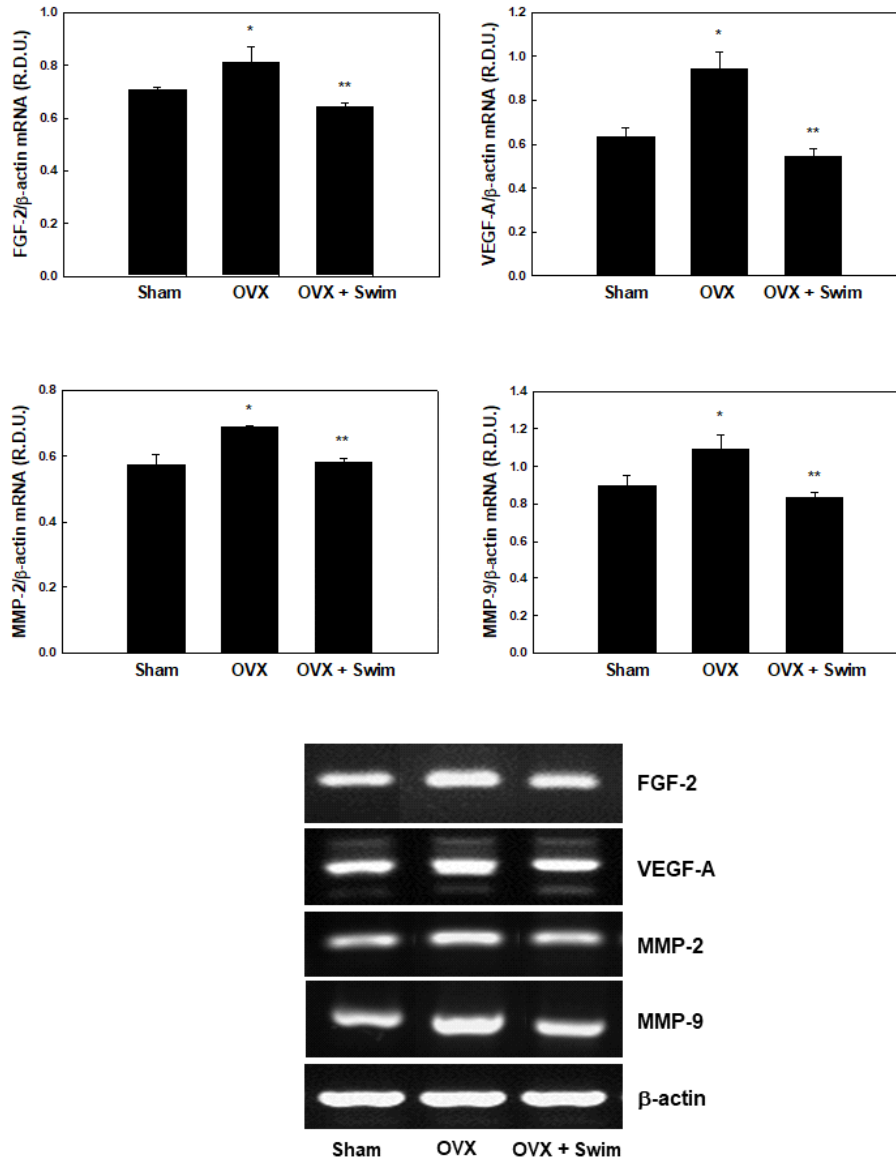


Fig. 4. Changes in angiogenic activators and MMPs by swimming in high-fat diet-fed female ovariectomized mice.

All mice received a high-fat diet for 8 weeks. All values are expressed as  $M \pm SD$ . \*Significantly different *versus* Sham group,  $p < 0.05$ . \*\*Significantly different *versus* OVX group,  $p < 0.05$ . Sham; sham-operated group, OVX; ovariectomized group, OVX + Swim; swim-trained ovariectomized group.

로부터 matrix metalloproteinases (MMPs)가 분비되고 활성화되며, 이러한 MMPs에 의해 혈관 내피세포 주변의 기저막과 세포외기질 (extracellular matrix, ECM)의 구성성분들이 분해되면서 혈관 리모델링이 이루어진다[19].

Sham에 비해 OVX는 혈관신생 촉진인자인 fibroblast growth factor-2 (FGF-2)와 vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) 유전자의 mRNA 발현이 각각 14.3%와 50%씩 증가하였다( $p < 0.05$ ). 그러나 OVX에서 증가된 FGF-2

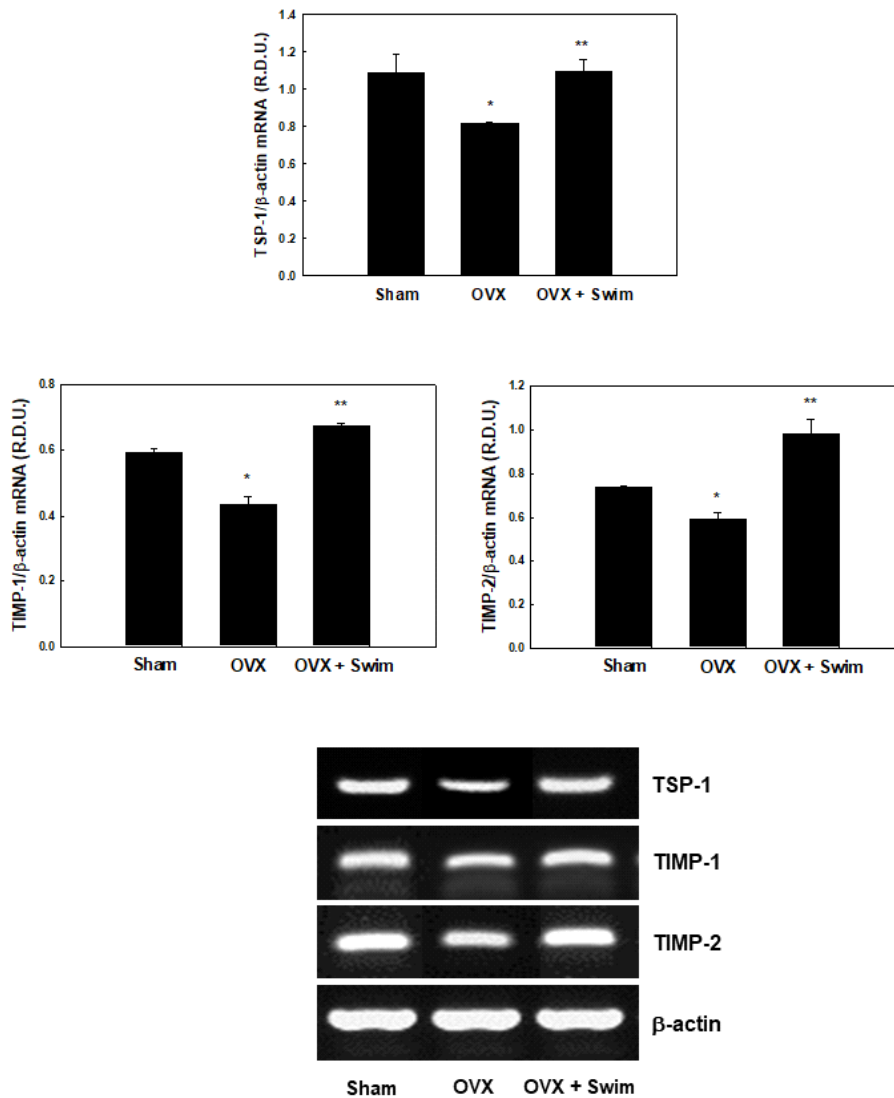


Fig. 5. Changes in angiogenic inhibitors by swimming in high-fat diet-fed female ovariectomized mice.

All mice received a high-fat diet for 8 weeks. All values are expressed as  $M \pm SD$ . \*Significantly different *versus* Sham group,  $p < 0.05$ . \*\*Significantly different *versus* OVX group,  $p < 0.05$ . Sham; sham-operated group, OVX; ovariectomized group, OVX + Swim; swim-trained ovariectomized group.



와 VEGF-A 유전자의 mRNA 발현은 수영운동에 의해 각각 25%와 44.4%씩 감소되었다( $p < 0.05$ ). 또한 MMPs 유전자의 발현을 조사한 결과, OVX의 MMP-2와 MMP-9 유전자의 mRNA 발현은 Sham에 비해 각각 16.7%와 22.2%씩 증가하였으나( $p < 0.05$ ), OVX에 비해 OVX + Swim은 각각 14.3%와 27.3%씩 감소하였다( $p < 0.05$ ).

반면 혈관신생 억제인자의 유전자 발현은 수영운동에 의해 촉진되었다(Fig. 4). Sham에 비해 OVX는 혈관신생 억제인자인 thrombospondin-1 (TSP-1), tissue inhibitor of metalloprotease-1 (TIMP-1) 및 TIMP-2 유전자의 mRNA 발현이 각각 27.3%, 33.3% 및 14.3%씩 감소하였다( $p < 0.05$ ). 그러나 OVX에 비해 OVX + Swim의 TSP-1, TIMP-1 및 TIMP-2 유전자의 mRNA 발현은 각각 37.5%, 75% 및 66.7%씩 증가하였다( $p < 0.05$ ).

따라서 본 연구는 수영운동이 백색지방조직에서 혈관신생에 관련된 유전자 발현의 조절을 통한 혈관신생 작용을 억제함으로써 지방조직무게의 감소가 일어난 것임을 시사하고 있다.

### 3.4. 고찰

지방조직의 성장과 확장으로 비만이 발생한다. 지방조직의 성장은 지방조직에서의 지방생성(lipogenesis), 지방축적, 지방세포생성(adipogenesis) 등에 관여하는 유전자의 발현이 관여할 뿐만 아니라, 지방조직의 확장을 위해 지방세포의 증식, 분화 및 성장에 필요한 영양분을 공급하는 광범위한 혈관분포의 구축이 필요하다. 혈관신생은 혈관신생 촉진인자들에 의해 자극되어 순차적인 단계로 진행되는 복잡한 과정으로 구성된다[19]. 즉 혈관신생 촉진인자인 VEGF와 FGF가 분비되어 기존 혈관내피세포에 존재하는 각각의 수용체에 결합함으로써 혈관내피세포들이 활성화되며, 이에 대한 초기 반응으로 단백질 분해효소(protease)인 MMPs가 분비되고 활성화되어 혈관내피세포 주변의 기저막과 세포외기질(ECM)이 분해되고, 그 결과 혈관내피세포들이 기존의 혈관으로부터 혈관신생이 자극되는 방향으로 이동하고 증식하게 된다. 그리고 혈관내피세포와 세포외기질의 상호작용을 통한 혈관내피세포들의 부착과 이동을 유도하게 되고, 이때 혈관내피세포 주변의 세포외기질이 계속 리모델링되며 이동하고 증식한 혈관내피세포들이 혈관강

(tube) 구조를 형성한다.

혈관신생 촉진인자는 tumor necrotic factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-2 (IL-2), VEGF, FGF 등이 있는데, 이중 VEGF-A라고도 부르는 VEGF는 혈관신생에 중요한 역할을 담당한다. 쥐의 VEGF 유전자의 비활성은 초기 배 발생 단계에서 배아 치사(embryonic lethality)를 나타내었으며, 혈관신생과 혈도(blood-island) 형성을 손상시켰다[20]. 그리고 VEGF receptor 1 결핍(Knockout) 쥐는 혈관형성에 결함이 나타났으며[21], VEGF receptor 2 결핍(Knockout) 쥐는 혈관내피세포의 분화와 발달에 손상이 나타났다[22].

고지방식이 섭취로 비만이 유도된 수컷 쥐는 활발히 성장 중인 지방세포에서 VEGF, FGF, VEGF receptor-2 등 혈관신생 촉진인자들의 분비가 증가하였으며, 그 결과 지방생성(lipogenesis)이 촉진되고 지방세포의 크기와 지방조직의 무게가 증가되었다[23]. 이러한 연구결과는 몸무게와 지방조직 무게의 조절이 혈관신생에 관여하는 인자들의 작용과 관련이 있음을 제시하고 있다.

폐경기 비만 여성은 유산소 운동만 실시한 경우 혈액 속의 혈관신생 biomarkers의 수준이 감소하지 않았지만, 12개월 동안 칼로리 제한 식단의 섭취 또는 칼로리 제한 식단과 유산소 운동의 병행 실시를 통해 몸무게가 감소하였고 혈액 속의 혈관신생 biomarkers (: VEGF, pigment epithelium-derived factor, plasminogen activator inhibitor-1)의 수준이 감소하였다[24]. 그리고 고지방식이를 섭취한 비만 수컷 쥐에서 레몬밤(*Melissa officinalis*) 잎으로부터 추출한 ALS-L1023의 처리는 지방조직에서 혈관신생 촉진인자인 VEGF-A와 FGF-2의 유전자 발현을 감소시켰을 뿐만 아니라 MMP-2와 MMP-9의 유전자의 발현을 감소시켰으므로, 지방조직에서의 혈관 밀도(blood vessel density)를 감소시켰고 지방조직무게와 몸무게를 감소시켰다는 연구결과가 보고되고 있다[25].

MMP 억제 작용과 혈관신생 억제 작용이 있는 식물 레몬밤 잎의 추출물이 처리된 비만 쥐는 지방세포에서 TIMP-1과 TIMP-2 및 혈관신생 억제자인 TSP-1의 유전자 발현이 증가함으로써 지방조직의 무게가 감소하였다[25,26]. 또한 비만 쥐에서 홍삼 추출물의 처리는 지방세포에서 혈관신생 억제인자들인 TSP-1, TIMP-1 및 TIMP-2의 mRNA 발현을 증가시켰으므로 지방조직의 무

계를 감소시키고 비만을 개선시켰다[27]. 따라서 이러한 연구결과들은 혈관신생이 억제됨으로써 지방조직의 확장이 억제되고 비만이 조절된다는 것을 시사하고 있다.

MMP의 작용은 혈관신생 억제제에 의해 억제된다고 보고되고 있다. 혈관신생 억제제인 TSP-1은 VEGF와의 직접적인 상호작용에 의해 MMP의 활성화를 억제하고 혈관내피세포의 이동을 저해하며, 혈관내피세포의 세포 자연사(apoptosis)를 증가시키는 조절기작을 통해 혈관신생을 억제하는 것으로 알려져 있다[28,29]. MMP의 작용은 TIMP에 의해서도 억제된다[30]. TIMP는 비활성형 MMP와의 1:1 결합을 통해 MMP의 작용을 억제함으로써 세포외기질의 파괴와 재형성 간의 균형을 조절하는 혈관신생 억제인자로 알려져 있다[31].

MMP 활성의 억제자인 TIMP-1은 혈관신생인자인 bFGF에 대한 세포의 반응을 차단시켰으며, TIMP-1의 RNA levles는 지방세포로 분화되지 않은 F442A 지방선구세포에 비해 지방세포로 분화된 지방세포에서 증가하였다는 연구에 의해 [32], TIMP는 혈관신생의 억제뿐만 아니라 지방세포 분화(adipocyte differentiation)의 억제에 관여하는 요소임을 알 수 있다.

인삼과 인삼의 구성성분인 ginsenosides는 3T3-L1 지방선구세포의 지방세포로의 분화과정에서 TIMP-1과 TIMP-2의 유전자 발현은 증가시켰고, MMP-2와 MMP-9의 유전자 발현을 감소시켰으므로 지방세포 분화를 억제하였다[33]. 따라서 이것은 혈관신생의 억제가 지방조직의 성장과 관련이 있는 지방세포생성을 억제한다는 것을 의미한다.

혈관신생 과정 중 ECM 파괴에 관여하는 중요한 효소인 MMP-2와 MMP-9는 지방세포가 분화하는 동안 증가하고 지방세포의 증식과 성숙에 중요한 영향을 미친다. 3T3F442A 지방선구세포의 지방세포로의 분화 동안 MMP-2와 MMP-9의 mRNA 발현과 단백질 활성이 증가된 반면, MMP 억제제를 지방선구세포에 처리한 경우 지방세포 분화가 감소되었다[34]. 지방조직의 미소순환(microcirculation)에 대한 심층분석을 통해 혈관신생이 지방세포생성보다 종종 선행된다는 것을 발견하였다[35]. 이러한 연구결과들은 MMPs의 증가가 혈관신생 작용을 촉진시키고 지방세포생성을 촉진한다는 것을 시사하고 있다.

따라서 여러 보고된 연구결과들은 혈관신생의

억제는 지방조직의 확장을 감소시키고[23-27], 혈관신생 억제인자의 증가 및 혈관신생 촉진인자와 MMP의 감소에 의해 지방조직의 확장을 위해 필요한 과정인 지방세포생성(adipogenesis)이 차단된다는 것을 제시함으로써[32-35], 혈관신생의 억제를 통해 지방세포생성이 억제되고, 결국 지방조직의 무게와 확장이 감소하는 결과가 초래된다는 것을 시사하고 있다.

본 연구는 고지방식이의 섭취로 비만이 유도된 OVX 암컷 쥐에서 수영운동이 몸무게와 지방조직 무게를 감소시키고, 백색지방조직에서 혈관신생 촉진인자인 VEGF와 FGF의 mRNA 발현과 MMPs (: MMP-2, MMP-9)의 mRNA 발현을 감소시킨 반면, 혈관신생 억제인자인 TSP-1, TIMP-1 및 TIMP-2의 mRNA 발현은 증가시킨다는 것을 발견하였다.

따라서 본 연구는 수영운동이 백색지방조직에서의 혈관신생에 관여하는 유전자의 작용을 조절함으로써 지방조직의 성장과 발달을 억제하고 비만을 개선한다는 것을 시사하고 있다. 그리고 본 연구는 수영운동이 폐경기 비만 여성의 비만과 비만 관련 질병의 개선을 위한 예방 및 치료적 접근방법임을 제시하고 있다.

#### 4. 결론

본 연구는 고지방식을 8주 동안 섭취한 난소절제 암컷 쥐에서 수영운동에 의한 비만 조절에 관한 분자생물학적 조절 기전을 알아보기 위해, 수영운동이 백색지방조직의 혈관신생에 미치는 영향을 조사하였다.

1. 고지방식을 섭취한 암컷 쥐에서 OVX는 Sham에 비해 몸무게, 지방조직 무게 및 지방세포의 크기가 증가되었다. 그러나 난소절제 암컷 쥐에서 수영운동은 8주 동안의 고지방식이 섭취로 증가된 몸무게, 지방조직 무게 및 지방세포의 크기를 감소시켰다.
2. 고지방식을 섭취한 암컷 쥐에서 OVX는 Sham에 비해 백색지방조직에서의 혈관신생 촉진인자들과 MMPs 유전자의 발현이 증가하였고 혈관신생 억제인자들의 유전자 발현은 감소하였다.

3. 고지방식이 섭취로 비만이 유도된 난소절제 암컷 쥐에서 수영운동은 OVX에 비해 백색 지방조직에서의 혈관신생 촉진인자들과 MMPs 유전자의 발현을 감소시킨 반면, 혈관신생 억제인자들의 유전자 발현을 증가시켰다.

결론적으로, 본 연구는 고지방식이로 비만이 유도된 난소절제 암컷 쥐는 수영운동에 의해 비만이 조절되었으며, 이것은 수영운동이 백색지방조직의 혈관신생 작용에 관여한 것에 기인한 것임을 제시하고 있다. 따라서 본 연구결과는 고지방식이를 섭취한 폐경기 비만 여성의 비만 조절에 대한 수영운동의 분자생물학적 정보를 제공할 것이다.

## References

1. L. R. Simkin-Silverman, R. R. Wing, "Weight Gain during Menopause. Is It Inevitable or Can It Be Prevented?", *Postgraduate Medicine*, Vol.108, No.3 pp. 47-56, (2000).
2. M. Abbey, A. Owen, M. Suzakawa, P. Roach, P. J. Nestel, "Effects of Menopause and Hormone Replacement Therapy on Plasma Lipids, Lipoproteins and LDL-receptor Activity", *Maturitas*, Vol.33, No.3 pp. 259-269, (1999).
3. R. I. Pasquali, F. Casimirri, A. M. Labate, O. Tortelli, G. Pascal, B. Anconetani, M. R. Gatto, R. Flaminia, M. Capelli, L. Barbara, "Body Weight, Fat Distribution and the Menopausal Status in Women. The VMH Collaborative Group", *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, Vol.18, No.9 pp. 614-621, (1994).
4. P. Carmeliet, R. K. Jain, "Angiogenesis in cancer and other diseases", *Nature*, Vol.407, No.6801 pp. 249-257, (2000).
5. A. Bouloumié, K. Lomède, C. Sengenès, J. Galitzky, M. Lafontan, "Angiogenesis in adipose tissue", *Annales d'endocrinologie*, Vol.63, No.2 pp. 91-95, (2002).
6. S. Corvera, O. Gealekman, "Adipose tissue angiogenesis: impact on obesity and type-2 diabetes", *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol.1842, No.3 pp. 463-472, (2014).
7. V. Christiaens, H. R. Lijnen, "Angiogenesis and development of adipose tissue", *Molecular and Cellular Endocrinology*, Vol.318, No.1-2 pp. 2-9, (2010).
8. D. L. Crandall, G. J. Hausman, J. G. Kral, "A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives", *Microcirculation*, Vol.4, No.2 pp. 211-232, (1997).
9. K. Sun, C. M. Kusminski, P. E. Scherer, "Adipose tissue remodeling and obesity", *The Journal of Clinical Investigation*, Vol.121, No.6 pp. 2094-2101, (2011).
10. E. Bråkenhielm, R. Cao, B. Gao, B. Angelin, B. Cannon, P. Parini, Y. Cao, "Angiogenesis inhibitor, TNP-470, prevents diet-induced and genetic obesity in mice", *Circulation Research*, Vol.94, No.12 pp. 1579-1588, (2004).
11. M. A. Rupnick, D. Panigrahy, C. Y. Zhang, S. M. Dallabrida, B. B. Lowell, R. Langer, M. J. Folkman, "Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.99, No.16 pp. 10730-10735, (2002).
12. Han DB, Payne WA, Mauer EB, *Focus on Health (7th ed.)*, pp.151-157, McGraw-Hill Higher Education, (2005).
13. L. B. Andersen, J. Haraldsdottir, "Coronary Heart Disease Risk Factors, Physical Activity, and Fitness in Young Danes", *Medicine and Science in Sports and Exercise*, Vol.27, No.2 pp. 158-163, (1995).
14. E. A. Richter, N. B. Ruderman, "AMPK and the Biochemistry of Exercise: Implications for Human Health and Disease", *The Biochemical Journal*, Vol.418, No.2 pp. 261-275, (2009).

15. S. Jeong, "The Effect of Swimming plus Hypolipidemic Agent on Obesity", *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol.36, No.1 pp. 34-46, (2019).
16. S. Jeong, "The study of mechanism on the regulation of obesity and health promotion by swimming in postmenopausal women", *Korean Public Health Research*, Vol.37, No.2 pp. 17-30, (2011).
17. V. F. Motta, M. B. Aguila, C. A. Mandarim-DE-Lacerda, "High-intensity interval training (swimming) significantly improves the adverse metabolism and comorbidities in diet-induced obese mice", *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, Vol.56, No.5 pp. 655-663, (2016).
18. S. Jeong, "Anti-obesity Effects of Genistein in Female Ovariectomy-induced Obese Mice", *Journal of Oil and Applied Science*, Vol.34, No.3 pp. 427-435, (2017).
19. M. Klagsbrun, M. A. Moses, "Molecular angiogenesis", *Chemistry and Biology*, Vol.6, No.8 pp. R217-R224, (1999).
20. N. Ferrara, K. Carver-Moore, H. Chen, M. Dowd, L. Lu, K. S. O'Shea, L. Powell-Braxton, K. J. Hillan, M. W. Moore, "Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene", *Nature*, Vol.380, No.6573 pp. 439-442, (1996).
21. F. Shalaby, J. Rossant, T. P. Yamaguchi, M. Gertsenstein, X. F. Wu, M. L. Breitman, A. C. Schuh, "Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice", *Nature*, Vol.376, No.6535 pp. 62-66, (1995).
22. G. H. Fong, J. Rossant, M. Gertsenstein, M. L. Breitman, "Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium", *Nature*, Vol.376, No.6535 pp. 66-70, (1995).
23. J. Li, X. Yu, W. Pan, R. H. Unger, "Gene expression profile of rat adipose tissue at the onset of high-fat-diet obesity", *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, Vol.282, No.6 pp. E1334-E1341, (2002).
24. C. Duggan, D. Tapsoba Jde, C. Y. Wang, A. McTiernan, "Dietary Weight Loss and Exercise Effects on Serum Biomarkers of Angiogenesis in Overweight Postmenopausal Women: A Randomized Controlled Trial", *Cancer Research*, Vol.76, No.14 pp. 4226-4235, (2016).
25. B. Y. Park, H. Lee, S. Woo, M. Yoon, J. Kim, Y. Hong, H. S. Lee, E. K. Park, J. C. Hahm, J. W. Kim, S. S. Shin, M. Y. Kim, M. Yoon, "Reduction of Adipose Tissue Mass by the Angiogenesis Inhibitor ALS-L1023 from *Melissa officinalis*", *Public Library of Science One*, Vol.10, No.11 pp. e0141612, (2015).
26. J. S. Kim, B. Y. Park, E. K. Park, H. S. Lee, J. C. Hahm, K. H. Bae, M. Y. Kim. "Screening of anti-angiogenic activity from plant extracts", *Korean Journal of Pharmacognosy*, Vol.37, No.4 pp. 253-257, (2006).
27. H. Lee, D. Park, M. Yoon, "Korean red ginseng (*Panax ginseng*) prevents obesity by inhibiting angiogenesis in high fat diet-induced obese C57BL/6J mice", *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*. Vol.53, pp. 402-408, (2013).
28. J. Lawler, "Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth", *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, Vol.6, No.1 pp. 1-12, (2002).
29. J. Lawler, M. Detmar, "Tumor progression: the effects of thrombospondin-1 and -2", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Vol.36, No.6 pp. 1038-1045, (2004).
30. D. E. Gomez, D. F. Alonso, H. Yoshiji, U. P. Thorgeirsson, "Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions", *European*

- Journal of Cell Biology*, Vol.74, No.2 pp. 111-122, (1997).
31. M. A. Moses, "The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors", *Stem Cells*, Vol.15, No.3 pp. 180-189, (1997).
  32. M. D. Johnson, H. R. Kim, L. Chesler, G. Tsao-Wu, N. Bouck, P. J. Polverini, "Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase", *Journal of Cellular Physiology*, Vol.160, No.1 pp. 194-202, (1994).
  33. J. Oh, H. Lee, D. Park, J. Ahn, S. S. Shin, M. Yoon, "Ginseng and Its Active Components Ginsenosides Inhibit Adipogenesis in 3T3-L1 Cells by Regulating MMP-2 and MMP-9", *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*. Vol.2012, Article ID 265023, (2012).
  34. A. Bouloumié, C. Sengenès, G. Portolan, J. Galitzky, M. Lafontan, "Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9: involvement in adipose differentiation", *Diabetes*, Vol.50, No.9 pp. 2080-2086, (2001).
  35. D. L. Crandall, G. J. Hausman, J. G. Kral, "A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives", *Microcirculation*, Vol.4, No.2 pp. 211-232, (1997).