

저항성 운동과 유산소 운동 훈련의 병행이 노화쥐 골격근 유형별 혈관신생 관련 단백질 발현에 미치는 영향

여효성^{1,†}

¹분당서울대학교병원 재활의학과, 박사후 연구원
(2021년 5월 31일 접수; 2021년 6월 21일 수정; 2021년 6월 25일 채택)

Effect of a combination of resistance and aerobic exercise training on angiogenesis-related protein expression in different type of skeletal muscle of aged rats

Hyo-Seong Yeo[†]

*Rehabilitation Medicine of Seoul National University Bundang Hospital
(Received May 31, 2021; Revised June 21, 2021; Accepted June 25, 2021)*

요약 : 이 연구는 노화된 흰쥐를 대상으로 규칙적인 저항성 운동에 유산소 운동을 병행하는 훈련을 실시하여 골격근에서 나타나는 혈관신생 관련 단백질 발현의 반응을 관찰하기 위해 수행되었다. 연구의 목적을 위해 자연적으로 노화된 SD계열 흰쥐(20-24개월령, $N=18$)를 사용하여 통제(CON, $n=6$), 저항성 운동(RE, $n=6$), 저항성+유산소 운동(RE+AE, $n=6$) 집단으로 구분하였다. 저항성 운동 집단은 실험동물용 사다리를 이용하여 매회 3세트×4회의 운동을 실시하였고 저항성 운동+유산소 운동 집단은 매회 2세트×3회의 사다리 오르기와 추가적인 30분간의 트레드밀 달리기를 수행하였다. 총 8주간의 운동 훈련 종료 후 가자미근과 장지신근을 적출하여 분석에 사용하였다. 골격근에서 혈관신생 관련 단백질들(HIF-1 α , VEGF, FLK-1, Ang-1, Ang-2)의 발현 수준을 분석하기 위해 western blot을 실시하였다. 연구결과, 저항성+유산소 운동 집단에서 가자미근(type I 근육)의 HIF-1 α , VEGF, FLK-1, Ang-1, Ang-2 단백질 발현이 통제 집단에 비해 높았으며 저항성 운동만 수행할 경우 HIF-1 α , VEGF, Ang-1, Ang-2 단백질 발현이 통제 집단에 비해 높았다. 또한 가자미근에서 저항성+유산소 운동훈련 집단의 Ang-2 to Ang-1 ratio가 저항성 운동 집단에 비해 높아 운동훈련 유형별 차이를 보였다. 한편, 장지신근(type II 근육)에서 HIF-1 α 는 저항성 운동 훈련에 의해서만 증가된 반면 VEGF와 FLK-1 단백질 발현은 두 훈련 유형 모두에서 증가되었고 운동 훈련 유형별 차이는 관찰되지 않았다. 또한 장지신근의 angiopoietin 단백질들의 발현은 운동 훈련에 의한 차이가 없었다. 그러므로 노화에서 규칙적인 운동 훈련은 운동 유형에 관계없이 골격근 혈관신생 반응을 유도하며, 특히 저항성 운동에 유산소 운동의 병행은 type I 근조직 유형에서 혈관신생에 대한 추가적인 긍정적 효과를 가질 수 있다.

주제어 : 노화, 저항성 운동, 복합 운동, 혈관신생, 골격근 유형

[†]Corresponding author
(E-mail: but0918@gmail.com)

Abstract : This study was performed to observe the responses of angiogenesis-related protein expression in skeletal muscle of aged rats by regular resistance exercise training with aerobic exercise. For the purpose of the study, naturally aged SD rats (20–24 months, $N=18$) were used and divided into control (CON, $n=6$), resistance exercise (RE, $n=6$), and resistance + aerobic exercise (RE + AE, $n=6$) groups. RE group performed 3 sets \times 4 exercises each session using a ladder for laboratory animals, and RE +AE group performed 2 sets \times 3 times of ladder climbing and additional treadmill running (30 min) each session. After 8 weeks of exercise training, soleus muscle and extensor digitorum longus muscle (EDL) were extracted and used for analysis. Western blot was performed to analyze the expression levels of angiogenesis-related proteins (HIF-1 α , VEGF, FLK-1, Ang-1, Ang-2) in skeletal muscle. As a result of the study, the expression of HIF-1 α , VEGF, FLK-1, Ang-1, and Ang-2 proteins in soleus muscle (type I muscle) was higher in RE +AE than in CON group, and HIF-1 α , VEGF, Ang-1, Ang-2 protein expression of RE group was higher than that of CON group. Furthermore, Ang-2 to Ang-1 ratio of RE + AE group was higher than that of RE group, showing differences by exercise type. In EDL muscle (type II muscle), HIF-1 α was increased only by RE group, whereas VEGF and FLK-1 protein expressions were increased in both training types, and no difference was observed between the types of exercise training. In addition, there was no difference in angiopoietin protein expressions in EDL muscle by exercise training. Therefore, in aging, regular exercise training induces skeletal muscle angiogenic response regardless of exercise type, and in particular, the combination of aerobic exercise with resistance exercise may have an additional positive effect on angiogenesis in type I muscle.

Keywords : Aging, Resistance exercise, Combined exercise, Angiogenesis, Skeletal muscle type

1. 서론

노화는 신체에서 일어나는 여러 변화들의 점진적 축적의 결과이며, 전반적인 생리 기능의 효율성 및 항상성 유지 기능의 감퇴를 동반한다[1]. 노화성 근감소증(sarcopenia)이라 불리는 노화 관련 골격근량 및 근력의 감소는 기능적 능력 저하와 손상 발생률 증가 뿐 아니라 낙상과 만성 대사 질환 증가를 유도하여 궁극적으로 삶의 질에 부정적인 영향을 미친다[2]. 또한 노화가 진행되면서 동화저항성(anabolic resistance)이 증가하여 신체활동과 같은 동화 자극에 대한 골격근의 반응성이 저하되며[3], 이러한 변화는 근섬유 유형에 따라 서로 다르게 나타난다[4]. 따라서 노인의 근감소증을 예방하거나 개선하기 위한 효과적인 치료 전략의 개발이 요구되며 이를 위해 근육의 기능에 관여하는 다양한 요인들을 살펴볼 필요가 있다.

혈액을 통한 근육 조직으로의 영양 및 성장 인자의 원활한 관류는 근육이 최적의 기능을 유지하기 위한 필수적인 조건으로 알려져 있다. 또한

조직의 혈관화(vascularization)는 동맥 혈류뿐만 아니라 복잡한 모세혈관 층에서 발생하는 관류도 포함하며, 근육에 산소, 영양소 및 성장 인자를 전달하는 미세 혈관 순환이 근육량과 건강을 최적으로 유지하는 데 매우 중요한 것으로 인정되고 있다[5]. 한편 노화는 골격근 모세혈관 밀도를 감소시킴으로써 골격근 섬유의 관류 장애를 초래할 수 있다. 부적절한 관류는 근육으로의 산소, 영양소 및 기타 성장 인자의 전달을 제한하여 단백질 동화 자극에 반응하는 능력에 부정적인 영향을 미칠 수 있으며, 심박출량의 변화와 관계없이 노화는 운동 중 근육의 혈류를 변화시키고 이는 산소 공급과 요구 간에 불균형을 초래한다[6].

근육 조직으로의 충분한 관류가 이루어지기 위해서는 혈관신생(angiogenesis) 과정이 요구되며, 혈관신생은 성장 중인 근섬유로의 충분한 산소와 영양분 공급을 위해 핵심적인 역할을 한다[7]. VEGF(vascular endothelial growth factor)는 성인 골격근에서 새로운 모세혈관 형성에 있어 필수적이며 VEGF의 발현은 HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 alpha)에 의해 조절된다[8].

또한 노화된 골격근에서 VEGF의 감소가 관찰되었으며[9], 이러한 감소 현상은 노인에서 근섬유 유형(type I vs. type II)에 관계없이 동일한 것으로 보고된 바 있다[10]. 그러나 최근 노화 쥐를 대상으로 골격근 조직 유형별로 혈관신생 관련 단백질의 변화를 살펴본 연구에서는 HIF-1 α , VEGF 그리고 VEGF receptor-2로 알려진 FLK-1(fetal liver kinase-1) 단백질의 발현이 가자미근(type I)과 장지신근(type II)에서 서로 상이하게 나타나[11] 이에 대한 정보는 명확하지 않다. HIF-1 α -VEGF-VEGFR-2 신호전달 체계를 통한 혈관신생 외에도 angiopoietin 단백질 발현에 의한 혈관신생 과정이 존재한다. Angiopoietin은 혈관의 안정성에 관여하는 Ang-1(angiopoietin-1)과 투과성을 높이는 Ang-2(angiopoietin-2)로 구분되며[12] 현재까지 노화에 따른 정보는 부족한 상황이다.

한편, 운동훈련은 노년기에 시작하더라도 혈관신생을 통해 모세혈관을 개선시키고[13] 노인 하지의 혈류 분포와 능력을 향상시킨다[6]. 골격근에서 혈관생성 단백질인 HIF-1 α 와 VEGF의 경우에도 운동을 통해 개선되는 효과를 입증한 선행연구들이 보고되어 왔다. 노화된 실험쥐를 대상으로 반복적인 유산소 훈련을 수행할 경우 HIF-1 α mRNA 수준을 증가시키며[14], 저항성 운동 훈련 유형의 경우에도 type I과 type II 근섬유의 근횡단면적 증가와 함께 HIF-1 α 수준이 유의하게 증가하였다[15]. VEGF와 수용체인 FLK-1의 경우에도 노화된 개체에서 유산소 운동[16] 및 저항성 운동[17] 훈련을 통해 개선되는 것으로 보고된 바 있다. 뿐만 아니라 또 다른 혈관생성 지표인 Ang-1,-2의 경우 유산소 운동을 수행하거나[18] 골격근에 과부하를 주게 되면[19] 혈관의 투과성을 증가시키는 Ang-2이 혈관의 안정성을 높이는 Ang-1보다 증가되어 혈관신생 반응이 유도될 수 있다.

그러나 현재까지 운동을 통해 골격근의 혈관신생 과정을 살펴본 선행연구들은 대부분 유산소성 운동과 저항성 운동을 개별적으로 실시하여 그 결과를 제시해왔다. 그러나 최근 저항성 운동과 유산소성 운동의 병행을 통해 오히려 혈관신생 뿐만 아니라 근성장과 기능에 더욱 긍정적인 효과를 기대할 수 있다는 연구 결과가 보고되었다[20]. 또한 저항성 운동을 기피하는 경향이 있는 노인들에게 저항성 운동시간을 줄이며 근기능 개선에 효율적인 운동방법을 제시하는 것은 운동지

속을 위한 중요한 과제로 여겨진다. 뿐만 아니라 근섬유 유형별 혈관 발달이 서로 다른 것으로 보고된 바 있기 때문에[15] 각 유형에 따른 반응을 비교조사 할 필요성이 제기된다. 따라서 이 연구는 자연적으로 노화된 실험동물을 대상으로 8주간 저항성 운동과 저항성+유산소 운동 훈련을 실시하여 각 골격근 유형(가자미근 vs. 장지신근)에서 나타나는 혈관신생 관련 단백질의 발현을 조사하고자 계획되었다. 연구의 결과는 노인을 대상으로 운동을 증재하거나 치료하는 분야에 유용한 기초정보로 활용될 것이다.

2. 연구방법

2.1. 실험동물

연구를 수행하기 위해 20-24개월간 자연적으로 노화된 흰쥐(SD-rat) 총 18마리를 사용하였다(Samtako, Kyung gi-do, Korea). 규칙적인 운동의 효과를 운동 유형별로 비교평가하기 위해 통제 집단(CON, control, $n=6$), 저항성 운동 집단(RE, resistance exercise, $n=6$) 그리고 저항성+유산소 운동 집단(RE+AE, RE+aerobic exercise, $n=6$)으로 구분하였다. 실험동물용 사육실에서 각 케이지 당 2마리씩 사육하였고, 탄수화물 67.5%, 지방 11.7%, 단백질 20.8%로 조성된 고형사료(Samtako, Korea)를 섭취케 하였다. 또한 연구의 전체 과정과 절차는 해당 소속기관의 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 수행되었다(KNSU-IACUC-2017-07).

2.2. 운동방법

운동훈련은 저항성 운동과 저항성+유산소 운동으로 구분하여 총 8주간 주 5일 하루 1시간씩 수행하였다. 저항성 운동은 선행연구를 바탕으로 자체 제작한 실험동물용 사다리를 활용하여 시행하였으며, 본 훈련 시작 전 1주간 체중의 50% 이하에서 사전 적응 훈련을 실시하였으며, 본 훈련 수행 시 1RM의 50% 강도에서 시작하여 점증적으로 증가시켜 마지막 주차에는 최대 130% 1RM의 운동 강도까지 증가시켰다. 매 훈련 시마다 총 3세트를 실시하였으며 4회 반복으로 구성(3set \times 4reps)하였다. 원활한 운동 수행을 위해 초저주파(0.2-0.3mA)로 가벼운 자극을 가했고 3번의 연속적 자극에도 오르지 않을 경우 운동을 종료하였다. 위에 제시한 저항성 운동방법은 관련

선행연구[21]를 바탕으로 설정하였다.

저항성+유산소 운동 훈련의 경우 저항성 훈련만 하는 집단과 동일하게 총 8주간 주 5일 하루 1시간씩 운동을 수행하였다. 그러나 매 세션 당 저항성 운동의 세트와 반복횟수를 2세트, 3회 반복으로 낮추고, 30분간의 추가적인 유산소 운동을 수행하였다. 유산소 운동은 실험동물용 트레드밀(DJ2-242, Dual Treadmill Daejong, Ltd, Korea)에서 속도 13 m/min (60% VO_{2max})로 매회 30분 동안 수행하였다. 유산소 운동 방법은 노화된 개체를 대상으로 연구한 선행연구[22] 방법에 근거하였다.

2.3. 분석방법

훈련이 종료된 운동 집단과 통제 집단의 흰쥐들은 마취(xylazine 8mg / kg + ketamine 40mg/kg)를 실시 후 type I 근육인 가자미근과 type II 근육인 장지신근을 적출하고 희생시켰다. 적출한 근육 조직은 액화 질소에 빠르게 얼린 후 -80°C에서 보관하여 추후 분석 실험에 사용하였다.

골격근 조직 내 혈관신생 관련 단백질들의 발현 수준을 알아보기 위해 western blot 기법을 활용하였으며, 일련의 과정을 순차적으로 설명하였다. 먼저 Methanol에 적신 PVDF membrane (Bio-rad, Hercules, CA, USA)과 transfer buffer (190mM glycine, 50mM Tris-base, 0.05% SDS, 20% methanol)로 적신 3M paper를 순서대로 겹쳐 mini trans-blot cell (Bio-Rad, CA, USA)에 장치한 후 60volt로 2시간 동안 전사하여 membrane으로의 transfer가 끝나면 membrane을 90분 동안 5% w/v BSA 용액 (10mM Tris-base, HCl-pH7.6, 0.5M NaCl, 0.05% Tween20)으로 blocking 하였다. 1차 항체인 anti-HIF-1 α , anti-VEGF, anti-FLK-1, anti-Angiopoietin-1, anti-Angiopoietin-2, anti- α -tubulin을 1:1000 농도의 blocking (5% w/v BSA)용액으로 12시간 동안 배양시켰다. TBS-T 용액으로 10분씩 5차례 세척한 후 2차 항체(horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit 65-6120, ZYMED, CA, USA; horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-goat 81-1620, ZYMED, CA, USA)를 배양용액으로 1:5000 농도로 희석시켜 90분 동안 처리한 후 TBS-T 용액으로 10분씩 5차례 행구고 마지막 단계로 WBLR solution (Western

Blotting Luminol Reagent, SC-2048, Santa cruz Biotechnology, USA)에 membrane을 넣고 1분간 발색하여 얻어진 이미지를 이미지 분석 시스템(Molecular Imager ChemiDoc XRS System, Bio-Rad, USA)으로 스캔한 후 Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 각 표본의 단백질량을 산출하였다. 최종적으로 얻어진 각 지표단백질들의 발현 양은 α -tubulin에 비례한 수치로 환산하여 결과에 적용하였다.

2.4. 자료처리

실험을 통해 얻은 결과는 SPSS (Win 18.0) 통계 프로그램을 이용하여 분석하였다. 운동 훈련 유형(CON, RE, RE+AE)에 따른 각 집단의 차이를 검증하기 위해 일원변량분석(one-way ANOVA)을 적용하였으며 사후검정은 Tukey 방법을 적용하였다. 통계적 유의수준은 $p=.05$ 로 설정하였다.

3. 결과

3.1. 운동훈련 유형에 따른 type I 근육(가자미근)의 혈관신생 관련 단백질의 발현 차이

8주간의 저항성 운동(RE)과 저항성+유산소 운동(RE+AE) 훈련 후 노화쥐의 가자미근에서 혈관신생 관련 단백질의 발현을 분석하였다(Fig. 1). HIF-1 α 단백질 발현은 집단 간 차이($F=10.070$, $p=.002$)를 보였다. 사후검정 결과 RE 집단($p=.004$)과 RE+AE 집단($p=.004$)의 발현이 CON 집단에 비해 유의하게 높았으나 RE 집단과 RE+AE 집단 간 차이는 없었다($p=.997$). 또한 VEGF 단백질 발현도 집단 간 차이($F=10.030$, $p=.002$)를 보였다. 사후검정 결과 RE 집단($p=.002$)과 RE+AE 집단($p=.013$)의 발현이 CON 집단보다 유의하게 높았으나 RE 집단과 RE+AE 집단 간 차이는 없었다($p=.604$). FLK-1 단백질 발현의 경우에는 집단 간 차이($F=4.574$, $p=.028$)를 보였다. 사후검정 결과 CON 집단과 비교할 때 RE 집단($p=.106$)의 발현은 통계적 차이가 없었고 RE+AE 집단($p=.028$)만 유의하게 높았으나 RE 집단과 RE+AE 집단 간 차이는 없었다($p=.759$). 한편 angiopoietin 단백질 발현을 살펴본 결과, Ang-1은 집단 간 차이($F=46.317$, $p=.001$)가 나타났다. 사후검정 결과 RE 집단

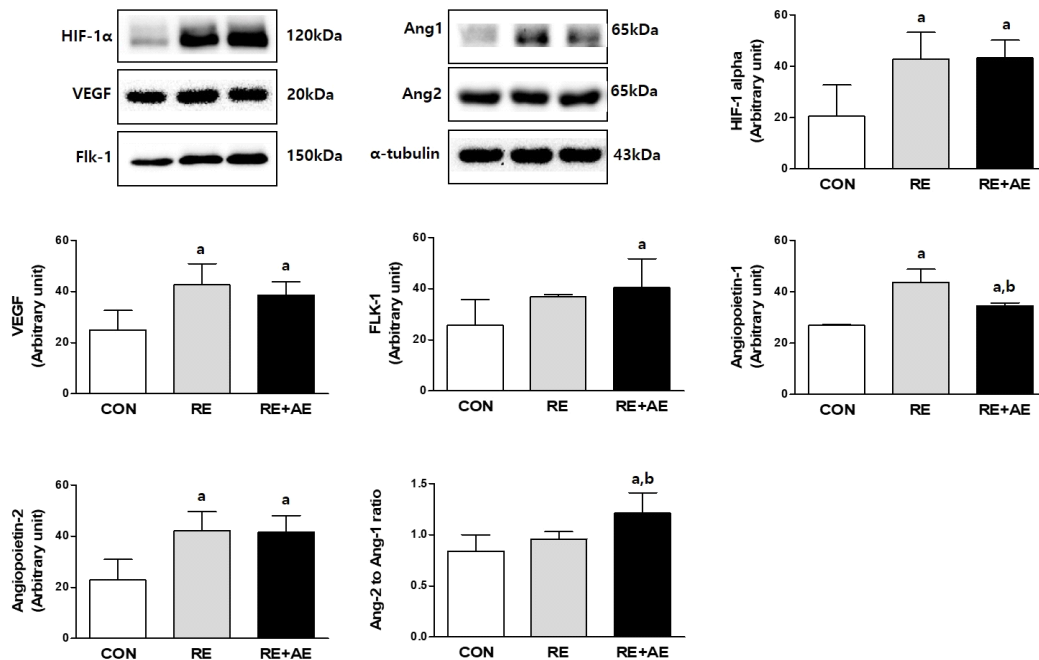


Fig. 1. Differences of protein expression related with angiogenesis in type I muscle in different exercise training mode.
 Mean±SD. a: significance from CON ($p<.05$). b: significance from RE ($p<.05$).

($p=.001$)과 RE+AE 집단($p=.002$)의 Ang-1 모두 CON 집단에 비해 유의하게 높았을 뿐 아니라 RE+AE 집단($p=.001$)의 Ang-1 발현은 RE 집단에 비해 유의하게 낮았다. Ang-2 단백질 발현 또한 집단 간 차이($F=13.470$, $p=.001$)를 보였다. 사후검정 결과 RE 집단($p=.001$)과 RE+AE 집단($p=.001$)의 발현이 CON 집단에 비해 유의하게 높았으나, RE 집단과 RE+AE 집단 간 차이는 없었다($p=.991$) 또한 Ang-2 to Ang-1 ratio의 경우 집단 간 차이($F=9.209$, $p=.002$)를 보였으며, RE 집단($p=.402$)은 CON 집단에 비해 통계적 차이를 보이지 않았다. 반면 RE+AE 집단의 Ang-2 to Ang-1 ratio는 CON 집단($p=.002$)과 RE 집단($p=.030$) 모두에 비해 높게 나타났다.

3.2. 운동훈련 유형에 따른 type II 근육(장지신근)의 혈관신생 관련 단백질의 발현 차이

8주간의 저항성 운동(RE)과 저항성+유산소 운동(RE+AE) 훈련 후 노화쥐의 장지신근에서 혈관신생 관련 단백질의 발현을 분석하였다(Fig. 2).

분석결과, HIF-1 α 단백질 발현은 집단 간 차이($F=10.679$, $p=.001$)를 보였다. 사후검정 결과 CON 집단에 비해 RE 집단($p=.001$)의 HIF-1 α 발현이 높았으나 RE+AE 집단($p=.068$)은 CON 집단과 차이가 없었으며, RE 집단과 RE+AE 집단 간 차이는 없었다($p=.105$). VEGF 단백질 발현의 경우 집단 간 차이($F=39.185$, $p=.001$)를 보였다. 사후검정 결과 RE 집단($p=.001$)과 RE+AE 집단($p=.001$)의 발현이 CON 집단보다 유의하게 높았으며, RE 집단과 RE+AE 집단 간 차이는 없었다($p=.148$). 또한 FLK-1 단백질의 발현도 집단 간 차이($F=15.717$, $p=.001$)를 보였고, 사후검정 결과 RE 집단($p=.001$)과 RE+AE 집단($p=.001$)의 발현이 CON 집단보다 유의하게 높았으며, RE 집단과 RE+AE 집단 간 차이는 없었다($p=.927$). 한편 집단 간 angiopoietin 단백질 발현을 비교했을 때, Ang-1, Ang-2 그리고 Ang-2 to Ang-1 ratio 모두에서 집단 간 어떠한 차이도 관찰되지 않았다($p>.05$).

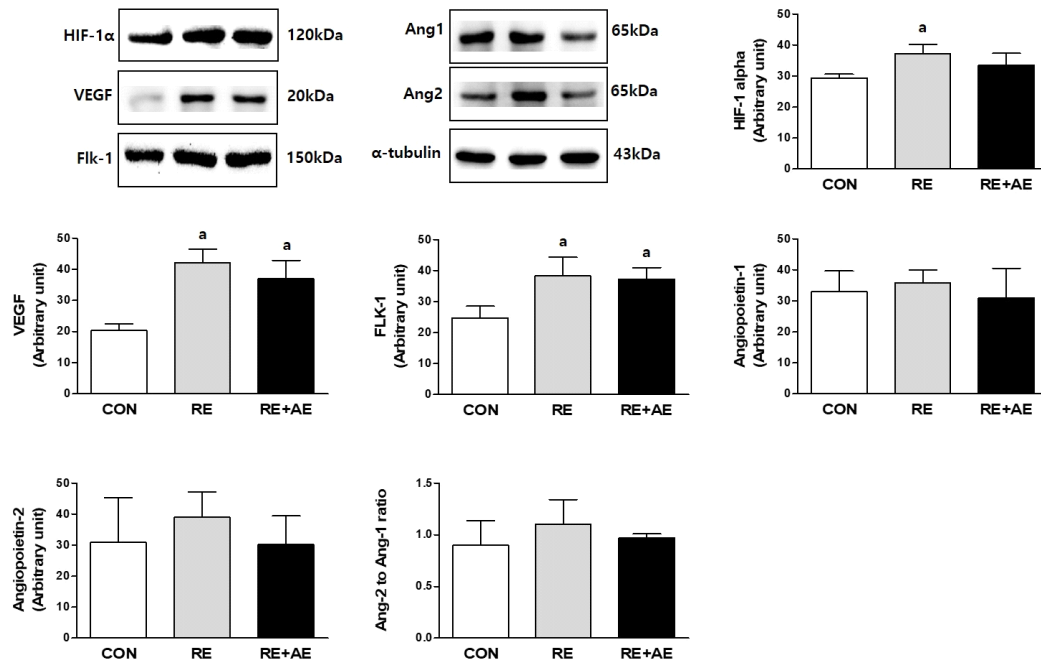


Fig. 2. Differences of protein expression related with angiogenesis in type II muscle in different exercise training mode.

Mean±SD. a: significance from CON ($p < .05$). b: significance from RE ($p < .05$).

4. 고찰

이 연구는 노화된 개체를 대상으로 총 8주간 규칙적인 저항성 운동 훈련만을 수행하거나 또는 저항성 운동과 유산소 운동을 병행하여 훈련함으로써 운동훈련 유형에 따른 골격근 세포 내 혈관신생 관련 단백질 발현의 차이를 검증하고자 수행되었다. 연구의 주요결과를 요약하면, 먼저 type I 근육으로 분류되는 가자미근의 경우 HIF-1 α , VEGF, FLK-1 단백질 발현이 저항성+유산소 훈련 수행에 의해 증가되었으며 저항성 운동만 수행할 경우 HIF-1 α 과 VEGF 단백질 발현이 증가되어 훈련의 효과를 보였으나 두 운동 훈련 유형 간 차이는 관찰되지 않았다. 그러나 Ang-2 to Ang-1 ratio의 경우 저항성+유산소 운동훈련 집단이 통제 집단 뿐 아니라 저항성 운동 집단에 비해 높게 나타나 운동훈련 유형별 차이를 보였다. 한편, type II 근육인 장지신근의 결과를 살펴보면, HIF-1 α 는 저항성 운동 훈련

에 의해서만 증가된 반면 VEGF와 FLK-1 단백질 발현은 두 훈련 유형 모두에서 증가되었고 가자미근과 유사하게 운동 훈련 유형별 차이는 관찰되지 않았다. 그러나 장지신근의 angiopoietin 단백질들의 발현은 훈련 유형 간 차이가 없어 가자미근과 상반되는 결과를 보였다. 따라서 노화에서 운동유형에 관계없이 저항성 운동과 저항성 운동에 유산소 운동을 병행한 훈련 모두 골격근 혈관신생에 긍정적인 효과를 나타내며, 뿐만 아니라 type I 근육의 angiopoietin 단백질 발현 변화는 저항성 운동과 유산소 운동의 추가적인 복합 효과에 대한 가능성을 제안한다.

노화는 골격근의 기능 저하를 유도하여 다양한 만성적 질환을 초래할 수 있다. 노화에 의한 근육 내 모세혈관 밀도의 감소는 산소나 영양소와 같은 물질들이 근섬유로 원활히 전달되지 못하도록 하는 원인이 될 잠재적 가능성이 제시되어 왔다[6]. 반면에 규칙적인 운동은 전반적인 건강과 독립적인 생활을 위한 근력 및 근지구력과 같은 골격근의 기본적인 역할을 가능하게 한다. 일반적

으로 유산소 운동은 혈관기능의 개선을 기대할 수 있는 유익한 효과로 인해 가장 많이 연구되고 권장되고 있으며[23, 24], 일정 시간동안 지속적으로 리드미컬하게 근육을 움직이는 방식으로 구성된다. 저항성 운동은 특정 부위를 목표로 관절의 전체 가동 범위를 통한 단일 관절 또는 복합적인 움직임들을 포함하며 골격근 기능을 유지하기 위한 가장 효과적인 방법으로 인정되고 있다[25]. 또한 저항성 운동은 유산소 운동에 비해 상대적으로 낮은 심혈관 체력을 요구하기 때문에 대사성 질환을 가진 환자들에게 유익한 효과를 가질 수 있다[26]. 따라서 심폐능력이 저하되어 있는 노인에게 적합한 운동 유형이 될 수 있지만 현재까지 혈관기능 개선과 관련한 저항성 운동에 대한 정보는 미흡한 상황이며, 특히 저항성 운동에 유산소 운동을 병행할 때 골격근에서 나타나는 혈관신생에 관한 정보도 명확하지 않은 상황이다.

저산소 유발 인자로 잘 알려져 있는 HIF-1 α 는 저산소 환경 뿐만 아니라 운동에도 반응하며 VEGF의 발현을 조절함으로써 궁극적으로 골격근 세포의 혈관신생에 관여한다[8]. 활동적인 성인 남성을 대상으로 저산소 환경과 운동의 효과를 검증하기 위해 수행된 연구에서는 최대 파워의 60% 수준에서 1시간 동안 수행한 자전거 운동 후 저산소 환경의 유무와 관계없이 외측광근 조직의 HIF-1 α mRNA 수준이 유의하게 높아졌으며[27], 또한 노화된 mice를 대상으로 총 2주간 수영 운동 훈련을 수행시킨 연구에서는 하지 골격근의 HIF-1 α 단백질이 훈련에 의해 증가함으로써[14] HIF-1 α 에 대한 유산소 운동 수행의 긍정적인 효과가 관찰되었다. 한편, 건강한 성인을 대상으로 혈류제한을 적용하여 1RM의 20%의 낮은 강도로 저항성 운동을 수행한 결과, 혈류제한의 효과는 관찰되지 않았으나 저항성 운동이 골격근 조직의 HIF-1 α mRNA 발현을 증가시키는 것으로 관찰된 바 있으며[28], 총 8주간 주5일 규칙적인 신장성 운동을 수행한 후 외측광근의 HIF-1 α 뿐만 아니라 VEGF 단백질 발현이 일회 운동 수행과 훈련 모두에 의해 높게 증가된 바 있다[29]. 현재 이 연구에서도 8주간의 규칙적인 저항성 운동 훈련 후 가자미근(type I)과 장지신근(type II) 모두에서 HIF-1 α 단백질 발현이 통제 집단에 비해 유의하게 높게 나타났으며, 이러한 결과는 젊은 성인 남성을 대상으로 총 12주간 저항성 운동 훈련 후 type I과 type II

근섬유의 근횡단면적 증가와 함께 HIF-1 α 수준이 유의하게 증가한 연구[15]와 젊은 흰쥐를 대상으로 고강도 인터벌 훈련을 수행한 후 가자미근과 장지신근 모두에서 HIF-1 α mRNA 발현이 유의하게 높게 나타난 연구[30]와 유사한 양상을 보였다. 그러므로 노화된 골격근에서도 젊은 개체에서 관찰되는 바와 같이 저항성 운동 훈련에 반응하여 HIF-1 α 단백질이 증가될 가능성이 제안된다. 그러나 현재 이 연구에서 저항성 운동과 유산소 운동 훈련을 병행하여 수행했을 때 장지신근에는 HIF-1 α 단백질 발현이 통제 집단과 유의미한 차이를 보이지 않아 근조직 유형에 따른 차이를 나타냈다. 장기간의 유산소 운동 수행은 골격근에서 일부 negative regulator에 의해 HIF-1 α 를 저하시킬 수 있다고 보고된 바 있으며[31], 따라서 저항성 운동과 유산소 운동 훈련을 병행할 때 type II 근육인 장지신근에서 특정 negative regulator가 가자미근에 비해 더욱 활성화 되었을 잠재적 가능성이 고려된다.

또한 VEGF는 혈관신생을 통해 모세혈관을 발달시키는 가장 대표적인 인자로 인정받고 있으며[32], 운동은 인간과 동물의 혈액 또는 조직에서 VEGF의 증가를 통해 허혈성 혈관신생을 촉진시킨다[33, 9]. 골격근에서 VEGF를 knockout시킨 경우 유산소 능력이 현저히 저하되기 때문에 올바른 운동능력 구현을 위해 필수적인 지표로 인정되고 있다[34]. VEGF의 경우 유산소 운동 중재를 적용한 연구들이 주를 이루고 있다. 8주간 유산소 운동 훈련을 실시한 연구에서는 노인의 경우에도 VEGF 단백질 농도가 젊은 사람과 유사하게 운동에 반응하여 증가할 수 있다고 제안한 바 있으며[35], 고지방 식이를 한 노화쥐를 대상으로 유산소 운동 훈련을 수행한 후 고지방 식이에 의해 감소된 골격근의 VEGF 단백질 수준이 개선되는 효과가 보고된 바 있다[16]. 현재 이 연구에서는 저항성 운동 훈련 후 가자미근과 장지신근 모두에서 VEGF 단백질 발현이 높게 나타났으며, 근 조직은 아니지만 비만한 노인 여성을 대상으로 총 12주간 저항성 운동을 수행한 연구에서 혈액의 VEGF 농도가 훈련에 의해 유의하게 증가하였다는 연구[17]와 유사한 결과를 나타냄으로써 유산소 운동 뿐만 아니라 규칙적인 저항성 운동 수행을 통해 노화된 골격근의 VEGF 발현이 증가할 수 있음을 확인하였다. 그러나 이 앞서 언급한 HIF-1 α 와 유사하게 이 연구에서 VEGF 발현은 운동 훈련 유형별 차이를

보이지 않았다. 비만한 여성을 대상으로 3개월간 유산소 운동과 유산소 운동+저항성 운동을 병행하였을 때 혈액의 VEGF 농도가 두 집단 간 차이를 보이지 않아[36] 이 연구의 결과와 유사한 양상을 보였다. 반면 성인 남성을 대상으로 저항성 운동과 유산소 운동을 병행하였을 때 저항성 운동만 수행한 경우보다 훈련 전·후 일회 운동 반응에 대한 근육 조직의 VEGF mRNA 수준이 더 높게 나타남으로써[37] 현재 연구 결과와 상이한 결과를 보였다. 그러나 인간의 외측광근을 사용한 위 연구는 근육 유형별 차이를 제시하지 않았기 때문에 현재 이 연구 결과와 직접적인 비교는 어렵다고 판단된다.

한편 VEGF의 수용체인 FLK-1 단백질의 경우 유산소 운동 훈련을 통해 젊은 성인 골격근 조직에서 VEGF receptor-2 mRNA 수준이 증가할 뿐만 아니라[38], 규칙적인 저항성 운동 훈련 또한 골격근 조직의 VEGF receptor-2 mRNA 수준을 개선 시키는 것으로 보고된 바 있다[15]. 이 연구에서 FLK-1 단백질 발현은 저항성 운동과 유산소 운동을 병행할 경우에는 가자미근과 장지신근 모두에서 높았지만 저항성 운동만 수행할 경우 장지신근에서만 FLK-1 발현이 높았다. 또한 가자미근의 경우 저항성+유산소 운동 시 저항성 운동만 수행했을 경우보다 더 높게 나타남으로써 근육 유형에 따른 서로 다른 결과가 관찰되었다. 이러한 차이는 저항성 운동과 유산소 운동을 병행할 때 장지신근에 비해 산화적 능력이 상대적으로 높은 가자미근이 운동에 의해 발생하는 반복적인 산소 스트레스[39]에 더 효율적으로 반응하였기 때문인 것으로 사료된다. 또한 VEGF receptor와 일부 혈관신생 관련 지표들의 발현이 운동강도 및 시간을 포함한 방법에 따라 서로 다를 가능성[40]도 배제할 수 없다.

혈관신생에 관여하는 또 다른 대표적인 지표로서 angiopoietins은 운동과 관련하여 혈관 신생 조절에 기여하는 인자로 알려져 있다[12]. Ang-1은 angiogenesis 과정을 통해 내피세포의 생존을 지원하는 단백질이며[41] Ang-2는 혈관의 투과성을 조절한다[42]. Ang-1와 Ang-2 조절에 대한 반복적인 유산소 또는 저항성 운동 훈련의 효과를 조사한 자료는 미흡한 실정이지만, 일회 유산소 운동은 Ang-1 mRNA의 변화없이 Ang2 mRNA와 Ang-2 to Ang-1 ratio를 증가시키는 것으로 보고된 바 있다[18]. 또한 젊은 남성을 대상으로 일회 저항성 운동을 수행한 경우 외측광

근 조직의 Ang-1, Ang-2 mRNA 및 Ang-2 to Ang-1 ratio는 모두 변화가 없었다[43]. 이 연구에서는 type I 근육인 가자미근에서만 Ang-1과 Ang-2 단백질 발현이 저항성 운동과 저항성+유산소 운동 훈련에 의해 증가하였으며, 특히 Ang-2 to Ang-1 ratio의 경우 저항성 운동과 유산소 운동을 병행할 경우에 높게 나타남으로써 복합 운동을 통한 추가적인 효과를 나타냈다. 근 조직 유형 간의 이러한 반응 차이는 FLK-1에서 나타난 반응과 같이 산화적 근육인 가자미근이 유산소 훈련에 특징적으로 반응함으로써 발생되는 결과로 여겨진다.

종합하면, 노화는 혈관의 구조와 기능에 부정적인 영향을 미침으로써 골격근 기능을 저하시키는 반면에 규칙적인 운동 훈련은 혈관 장애를 예방하거나 완화시킬 수 있다. 이 연구는 노화된 골격근 조직에서 각 운동유형별(저항성 vs. 저항성+유산소)로 혈관신생 관련 단백질의 발현을 비교분석한 초기 연구로서 의미가 있다. 연구의 결과를 통해 두 운동 유형 모두 골격근의 혈관신생에 긍정적인 기여를 할 것으로 사료되며, 특히 type I 유형의 경우 유산소 운동 병행의 추가적인 효과를 가지는 것으로 제안된다. 이러한 결과는 훈련 프로그램 고안 시 훈련 목표에 보다 적합한 운동 유형을 선정하는데 있어 하나의 기준으로 적용될 수 있을 것이다. 한편, 이 연구에서는 한정적인 개체수로 인해 유산소 운동 훈련 집단을 확보하지 못하여 운동 유형에 따른 효과에 대해 다소 제한적인 결과를 제시하였고, 또한 골격근 조직의 혈관신생 단백질 발현에 근거한 모세혈관의 형태 변화를 직접적으로 관찰하지 못하였다. 추후 연구를 통해 이러한 제한점들을 보완하여 보다 심도있는 연구가 수행되어야 할 것이다.

5. 결론

이 연구는 자연적으로 노화를 유도한 흰쥐의 골격근에서 운동훈련 유형별(저항성 vs. 저항성+유산소) 혈관신생 관련 단백질 발현의 차이를 살펴봄으로써 효과적인 운동방법을 제시하고자 수행되었다. 총 8주간 운동훈련을 수행한 결과 저항성 운동 집단과 저항성+유산소 운동훈련을 수행한 집단 모두에서 혈관신생 관련 단백질 발현에 대한 운동훈련의 긍정적인 효과가 관찰되었다. 뿐만 아니라 저항성 운동에 유산소 운동을 병행

함으로써 얻는 추가적인 긍정적 효과가 type I 유형의 근조직에서 제안되었다. 추후 연구에서는 운동 훈련 유형에 유산소 유형의 훈련을 함께 적용하고 또한 혈관신생을 통한 모세혈관의 형태적 변화에 대한 정보를 제시한다면 보다 체계적이고 종합적인 연구 결과를 도출할 수 있을 것으로 사료된다. 이 연구의 결과는 노인을 대상으로 운동 프로그램을 계획하고 지도하는 재활 분야와 스포츠 과학 분야에서 기초적인 자료로 활용될 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문 또는 저서는 2017년 대한민국 교육부와 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (NRF-2017S1A5B5A01024774)

References

1. L. Hosseini, M. S. Vafaei, R. Badalzadeh, "Melatonin and nicotinamide mononucleotide attenuate myocardial ischemia/reperfusion injury via modulation of mitochondrial function and hemodynamic parameters in aged rats", *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*, Vol.25, No.3, pp. 240-250, (2020).
2. R. Roubenoff, V. A. Hughes, "Sarcopenia: current concepts", *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, Vol.55, No.12, pp. M716-M724, (2000).
3. M. J. Rennie, "Anabolic resistance: the effects of aging, sexual dimorphism, and immobilization on human muscle protein turnover", *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, Vol.34, No.3, pp. 377-381, (2009).
4. C. P. Lambert, W. J. Evans, "Effects of aging and resistance exercise on determinants of muscle strength", *Journal of the American Aging Association*, Vol.25, No.2, pp. 73-78, (2002).
5. S. Joannisse, J. P. Nederveen, T. Snijders, B. R. McKay, G. Parise, "Skeletal muscle regeneration, repair and remodelling in aging: the importance of muscle stem cells and vascularization", *Gerontology*, Vol.63, No.1, pp. 91-100, (2017).
6. B. J. Behnke, M. W. Ramsey, J. N. Staley, J. M. Dominguez 2nd, R. T. Davis 3rd, D. J. McCullough, J. M. Muller Delp, M. D. Delp, "Effects of aging and exercise training on skeletal muscle blood flow and resistance artery morphology", *Journal of applied physiology*, Vol.113, No.11, pp. 1699-1708, (2012).
7. S. Egginton, I. Badr, J. Williams, D. Hauton, G. C. Baan, R. T. Jaspers, "Physiological angiogenesis is a graded, not threshold, response", *The Journal of physiology*, Vol.589, No.1, pp. 195-206, (2011).
8. K. Tang, E. C. Breen, H. P. Gerber, N. M. Ferrara, P. D. Wagner, "Capillary regression in vascular endothelial growth factor-deficient skeletal muscle", *Physiological genomics*, Vol.18, No.1, pp. 63-69, (2004).
9. N. A. Ryan, K. A. Zwetsloot, L. M. Westerkamp, R. C. Hickner, W. E. Pofahl, T. P. Gavin, "Lower skeletal muscle capillarization and VEGF expression in aged vs. young men", *Journal of applied physiology*, Vol.100, No.1, pp. 178-185, (2006).
10. A. N. Croley, K. A. Zwetsloot, L. M. Westerkamp, N. A. Ryan, A. M. Pendergast, R. C. Hickner, W. E. Pofahl, T. P. Gavin, T. P. Gavin, "Lower capillarization, VEGF protein, and VEGF mRNA response to acute exercise in the vastus lateralis muscle of aged vs. young women", *Journal of applied physiology*, Vol.99, No.5, pp. 1872-1879, (2005).
11. H. S. Yeo, J. Y. Lim, N. Y. Ahn, "Effects of Aging on Angiogenic and Muscle

- Growth-Related Factors in Naturally Aged Rat Skeletal Muscles", *Annals of geriatric medicine and research*, Vol.24, No.4, pp. 305, (2020).
12. M. Ardakanizade, "The effects of mid-and long-term endurance exercise on heart angiogenesis and oxidative stress", *Iranian journal of basic medical sciences*, Vol.21, No.8, pp. 800, (2018).
 13. N. Charifi, F. Kadi, L. Feasson, F. Costes, A. Geysant, C. Denis, "Enhancement of microvessel tortuosity in the vastus lateralis muscle of old men in response to endurance training", *The Journal of physiology*, Vol.554, No.2, pp. 559-569, (2004).
 14. X. W. Cheng, M. Kuzuya, W. Kim, H. Song, L. Hu, A. Inoue, K. Nakamura, Q. Di, T. Sasaki, M. Tsuzuki, G. Shi, K. Okumura, T. Murohara, "Exercise training stimulates ischemia-induced neovascularization via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent hypoxia-induced factor-1 α reactivation in mice of advanced age", *Circulation*, Vol.122, No.7, pp. 707, (2010).
 15. T. M. Holloway, T. Snijders, V. L. LJC, L. B. Verdijk, "Temporal response of angiogenesis and hypertrophy to resistance training in young men", *Medicine and science in sports and exercise*, Vol.50, No.1, pp. 36-45, (2018).
 16. N. Ahn, K. Kim, "Effects of Aerobic and Resistance Exercise on Myokines in High Fat Diet-Induced Middle-Aged Obese Rats", *International journal of environmental research and public health*, Vol.17, No.8, pp. 2685, (2020).
 17. H. T. Roh, S. Y. Cho, W. Y. So, "A Cross-Sectional Study Evaluating the Effects of Resistance Exercise on Inflammation and Neurotrophic Factors in Elderly Women with Obesity", *Journal of clinical medicine*, Vol.9, No.3, pp. 842, (2020).
 18. P. G. Lloyd, B. M. Prior, H. T. Yang, R. L. Terjung, "Angiogenic growth factor expression in rat skeletal muscle in response to exercise training", *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, Vol.284, No.5, pp. H1668-H1678, (2003).
 19. J. L. Williams, A. Weichert, A. Zakrzewicz, L. Da Silva-Azevedo, A. R. Pries, O. Baum, S. Egginton, "Differential gene and protein expression in abluminal sprouting and intraluminal splitting forms of angiogenesis", *Clinical science*, Vol.110, No.5, pp. 587-595, (2006).
 20. T. R. Lundberg, R. Fernandez-Gonzalo, T. Gustafsson, P. A. Tesch, "Aerobic exercise does not compromise muscle hypertrophy response to short-term resistance training", *Journal of applied physiology*, Vol.114, No.1, pp. 81-89, (2013).
 21. A. G. Philippe, G. Py, F. B. Favier, A. M. Sanchez, A. Bonniou, T. Busso, R. Candau, "Modeling the responses to resistance training in an animal experiment study", *BioMed research international*, Vol. 2015. (2015).
 22. E. Koltai, Z. Zhao, Z. Lacza, A. Cselenyak, G. Vacz, C. Nyakas, I. Boldogh, N. Ichinoseki-Sekine, Z. Radak, "Combined exercise and insulin-like growth factor-1 supplementation induces neurogenesis in old rats, but do not attenuate age-associated DNA damage", *Rejuvenation research*, Vol.14, No.6, pp. 585-596, (2011).
 23. D. C. Lee, R. R. Pate, C. J. Lavie, X. Sui, T. S. Church, S. N. Blair, "Leisure-time running reduces all-cause and cardiovascular mortality risk", *Journal of the American College of Cardiology*, Vol.64, No.5, pp. 472-481, (2014).
 24. S. C. Moore, A. V. Patel, C. E. Matthews, A. B. de Gonzalez, Y. Park, H. A. Katki, M. S. Linet, E. Weiderpass, K. Visvanathan, K. J. Helzlsouer, M. Thun, S. M. Gapstur, P. Hartge, I. M. Lee, "Leisure time physical activity of moderate to

- vigorous intensity and mortality: a large pooled cohort analysis", *PLoS Med*, Vol.9, No.11, pp. e1001335. (2012).
25. K. A. Larkin, R. G. MacNeil, M. Dirain, B. Sandesara, T. M. Manini, T. W. Buford, "Blood flow restriction enhances post-resistance exercise angiogenic gene expression", *Medicine and science in sports and exercise*, Vol.44, No.11, pp. 2077, (2012).
 26. L. N. Forti, E. Van Roie, R. Njemini, W. Coudyzer, I. Beyer, C. Delecluse, I. Bautmans, "Dose-and gender-specific effects of resistance training on circulating levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF) in community-dwelling older adults", *Experimental gerontology*, Vol.70, pp. 144-149, (2015).
 27. D. R. Slivka, M. W. Heesch, C. L. Dumke, J. S. Cuddy, W. S. Hailes, B. C. Ruby, "Human skeletal muscle mRNA response to a single hypoxic exercise bout", *Wilderness & environmental medicine*, Vol.25, No.4, pp. 462-465, (2014).
 28. M. J. Drummond, S. Fujita, A. Takashi, H. C. Dreyer, E. Volpi, B. B. Rasmussen, "Human muscle gene expression following resistance exercise and blood flow restriction", *Medicine and science in sports and exercise*, Vol.40, No.4, pp. 691, (2008).
 29. P. Rodriguez-Miguel, E. Lima-Cabello, S. Martínez-Flórez, M. Almar, M. J. Cuevas, J. González-Gallego, "Hypoxia-inducible factor-1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase induced by eccentric exercise", *Journal of applied physiology*, Vol.118, No.8, pp. 1075-1083, (2015).
 30. A. Ahmadi, D. Sheikholeslami-Vatani, S. Ghaeni, M. Baazm, "The effects of different training modalities on monocarboxylate transporters MCT1 and MCT4, hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), and PGC-1 α gene expression in rat skeletal muscles", *Molecular Biology Reports*, Vol.48, No.3, pp. 2153-2161, (2021).
 31. M. E. Lindholm, H. Rundqvist, "Skeletal muscle hypoxia-inducible factor-1 and exercise", *Experimental physiology*, Vol.101, No.1, pp. 28-32, (2016).
 32. O. Hudlicka, M. D. Brown, "Adaptation of skeletal muscle microvasculature to increased or decreased blood flow: role of shear stress, nitric oxide and vascular endothelial growth factor", *Journal of vascular research*, Vol.46, No.5, pp. 504-512, (2009).
 33. L. Jensen, J. Bangsbo, Y. Hellsten, "Effect of high intensity training on capillarization and presence of angiogenic factors in human skeletal muscle", *The Journal of physiology*, Vol. 557, No.2, pp. 571-582, (2004).
 34. I. M. Olfert, R. A. Howlett, K. Tang, N. D. Dalton, Y. Gu, K. L. Peterson, P. P. Wagner, E. C. Breen, "Muscle-specific VEGF deficiency greatly reduces exercise endurance in mice", *The Journal of physiology*, Vol.15, No.587(Pt 8), pp. 1755-1767, (2009).
 35. T. P. Gavin, R. M. Kraus, J. A. Carrithers, J. P. Garry, R. C. Hickner, "Aging and the skeletal muscle angiogenic response to exercise in women", *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, Vol.70, No.10, pp. 1189-1197, (2015).
 36. M. Ratajczak, D. Skrypnik, P. Bogdański, E. Mądry, J. Walkowiak, M. Szulińska, J. Meciaszek, M. Kręgielska-Narożna, J. Karolkiewicz, Effects of Endurance and "Endurance-Strength Training on Endothelial Function in Women with Obesity: A Randomized Trial", *International journal of environmental research and public health*, Vol.16, No.21, pp. 4291, (2019).

37. R. Fernandez-Gonzalo, T. R. Lundberg, P. A. Tesch, "Acute molecular responses in untrained and trained muscle subjected to aerobic and resistance exercise training versus resistance training alone", *Acta Physiologica*, Vol.209, No.4, pp. 283-294, (2013).
38. B. Hoier, K. Olsen, D. J. Hanskov, M. Jorgensen, L. R. Norup, Y. Hellsten, "Early time course of change in angiogenic proteins in human skeletal muscle and vascular cells with endurance training", *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, Vol.30, No.7, pp. 1117-1131, (2020).
39. S. D. Mason, H. Rundqvist, I. Papandreou, R. Duh, W. J. McNulty, R. A. Howlett, I. M. Olfert, C. J. Sundberg, N. C. Denko, L. Poellinger, R. S. Johnson, "HIF-1 α in endurance training: suppression of oxidative metabolism", *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, Vol.293, No.5, pp. R2059-R2069, (2007).
40. M. Bellafiore, G. Battaglia, A. Bianco, A. Palma, "Expression pattern of angiogenic factors in healthy heart in response to physical exercise intensity", *Frontiers in physiology*, Vol.10, pp. 238, (2019).
41. C. Suri, J. McClain, G. Thurston, D. M. McDonald, H. Zhou, E. H. Oldmixon, T. N. Sato, G. D. Yancopoulos, "Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1", *Science*, Vol.282, No.5388, pp. 468-471, (1998).
42. A. I. Nykänen, K. Pajusola, R. Krebs, M. A. Keränen, O. Raisky, P. K. Koskinen, K. Alitalo, K. B. Lemström, "Common protective and diverse smooth muscle cell effects of AAV-mediated angiopoietin-1 and-2 expression in rat cardiac allograft vasculopathy", *Circulation research*, Vol.98, No.11, pp. 1373-1380, (2006).
43. T. P. Gavin, J. L. Drew, C. J. Kubik, W. E. Pofahl, R. C. Hickner, "Acute resistance exercise increases skeletal muscle angiogenic growth factor expression", *Acta physiologica*, Vol.191, No.2, pp. 139-146, (2007).