

급성 운동과 트레드밀 운동이 쥐 심장근육에서 미토콘드리아 기능과 미토파지에 미치는 영향

Effects of a single bout of exercise and treadmill exercise on mitochondrial function and mitophagy in rat cardiac muscles

강은범*(대전대학교 교수)

Eun-Bum Kang* Daejeon University/Professor

요약

본 연구는 급성 운동과 트레드밀 운동이 쥐 심장근육에서 미토콘드리아 기능과 미토파지에 미치는 영향을 알아보고자 한다. 집단구분은 sedentary control group, acute endurance exercise group, chronic endurance exercise group으로 구분하였으며, AEE 그룹은 직후(AEE_0h), 1시간 후(AEE_1h), 2시간 후(AEE_2h), 3시간 후(AEE_3h)로 구분하였다. Western blot 실험을 이용하여 미토콘드리아 기능과 관련된 단백질, 미토파지 관련 단백질들의 변화를 살펴보았다. 또한 심장 근섬유 내의 형태학적 변화를 확인하기 위하여 좌심실 부위를 연속관상 절편 하여 H&E 염색, 심장근의 TUNEL-양성 세포수를 확인하기 위해서 실시한 면역조직화학 실험을 실시하였다. 미토콘드리아 기능과 관련된 단백질은 각 시간대의 발현 양상은 다소 차이가 있었지만, 시간이 지날수록 관련 단백질들의 발현이 증가되는 현상을 확인할 수 있었다. 단 한 차례의 운동을 통해 미토파지의 변화는 AEE_0h, AEE_1h, AEE_2h와 8주간의 운동을 실시한 CEE 그룹을 비교했을 때 Parkin, BNIP3 변인은 AEE_1h에서 증가되었지만, AEE_2h에서 감소되어 CEE 그룹과는 통계적으로 유의하게 감소되는 경향이 있었다. 하지만 SQSTM1/p62, Optineurin, PINK1 변인에서 AEE_2h와 CEE 그룹에는 통계적인 차이가 나타나지 않았다. 미토콘드리아 기능관련 변인에서도 AEE_0h, AEE_1h 와 비교했을 때 AEE_2h와 CEE 그룹 모두 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 나타났으며, AEE_2h와 CEE 그룹에서 통계적인 차이는 나타나지 않았다. 또한 H&E 염색결과를 통해 각각의 집단에서 큰 변화는 나타나지 않았으며, 1회성 운동은 심장근의 구조적인 변화를 일으키지 않는다는 확인하였다. 심장근의 TUNEL-양성 세포수를 확인하기 위해서 실시한 면역조직화학법의 결과도 통계적으로 유의한 차이는 없었으며, 이러한 결과로 단 한 차례의 고강도 운동으로 심장근육에서의 세포사멸은 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 본 연구의 결과를 통해 단 한 차례의 운동으로 심장근육의 구조적 변화 혹은 세포사멸은 과도하게 유발되지 않는 것을 확인할 수 있었으며, 운동으로 유발된 미토파지 현상이 미토콘드리아 기능개선에 긍정적인 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effects of a single bout of exercise and treadmill exercise on mitochondrial function and mitophagy in rat cardiac muscles. Groups were divided into a sedentary control group, an acute endurance exercise group, and a chronic endurance exercise group, and the AEE group was divided into immediately after (AEE_0h), 1 hour after (AEE_1h), 2 hours after (AEE_2h), and 3 hours after (AEE_3h). The aspect of the manifestation of mitochondrial function-related proteins at each hour differed; however, the phenomenon could be found in which the manifestation of related proteins increased as time passed. As for changes in mitophagy, at AEE_0h, AEE_1h, and AEE_2h through a one-time exercise, the variables of Parkin and BNIP3 increased at AEE_1h, compared to the CEE group that conducted the exercise for eight weeks; however, they decreased at AEE_2h, so there was a tendency of a statistically significant decrease compared to the CEE group. However, in the variables of SQSTM1/p62, Optineurin, and PINK1, there were no statistical differences at AEE_2h and in the CEE group. Also, in the mitochondrial function-related variables, compared to AEE_0h and AEE_1h, there were significant increases at AEE_2h and in the CEE group while there were no statistical differences at AEE_2h and in the CEE group. Furthermore, H&E staining was conducted by the continuous coronal section of the left ventricle region to check morphological changes in the fibers of the myocardium. There were no big changes in each group, and it was found that a single bout of exercise would not cause any structural change in the myocardium. Also, as a result of the immunohistochemical experiment conducted to check the TUNEL-positive cells of the myocardium, there were no statistically significant differences, and consequently, it turned out that there were big changes in the myocardium with a single bout of exercise. Through the results of this study, it could be found that a single bout of exercise would not cause excessive structural change or apoptosis of the myocardium, and the phenomenon of mitophagy induced by the exercise had a positive impact on the improvement of mitochondrial function.

Key words : a single bout of exercise, treadmill exercise, mitophagy, mitochondrial function, cardiac muscles

I. 서론

통계청의 2021년 사망원인통계 자료에 따르면 우리나라의 주요 사망원인은 1위가 암, 2위가 심장질환, 3위가 폐렴으로 나타났다. 특히 심장 질환의 경우, 인구 10만 명당 사망률이 2011년 49.8%에서 2020년 63.0%로 증가했으며, 2021년에는 61.5%로 다소 낮아졌지만, 지속적으로 증가되고 있다는 점을 주목해야 한다(통계청, 2021). 전문가들은 우리나라도 미국과 마찬가지로 심장질환이 사망원인의 1위가 될 것이라는 점에는 이견이 없다.

다양한 심장질환의 병태생리학적 요인들은 미토콘드리아의 기능장애와 관련이 깊다고 알려져 있다(Delbridge et al., 2017). 심장을 구성하는 심근세포는 최종분화세포이기 때문에 세포 내 재생 혹은 재활용은 심장의 기능을 유지하고 심근세포의 수명을 결정하는 주요한 부분이다(Nakai et al., 2007; Senyo et al., 2014). 심장질환을 연구하는 연구자들은 미토콘드리아를 치료의 표적으로 삼고 연구를 진행하고 있다. 특히 심장근육세포와 같이 유사분열이 일어나지 않는 세포들의 세포 내 재생 혹은 재활용은 심근세포 기능 및 수명을 결정하는 중요한 역할을 한다. 이처럼 미토콘드리아의 기능을 보호하고 유지하기 위해 작동하고 있는 미토콘드리아의 융합(fusion) 및 분열(fission) 과정, 자가포식에 의한 손상된 미토콘드리아의 제거(mitophagy), 생합성(biogenesis)을 미토콘드리아 품질관리(Mitochondrial quality control systems)라고 부른다.

미토콘드리아 품질관리 중에서 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(He et al., 2009; Mizushima et al., 2008). 자가포식작용은 비선택적인 기작이라 알려져 있지만, 미토콘드리아에 선택적으로 일어나는 자가포식작용을 미토파지(mitophagy)라고 한다. 이러한 미토파지는 autophagos 형성의 분자 기계의 대부분을 자가포식의 비 선택적 형태와 공유하지만, PTEN에 의해 유도된 단백질 키나아제 1 (PINK1)-파킨 경로와 일부 LC3 수용체 단백질을 포함하여 고유한 분자 메커니즘이 존재하는 것으로 알려져 있다(Youle et al., 2011). 특히 이 과정에서 미토콘드리아 분열에 관련된 단백질인 DRP1이 손상된 미토콘드리아를 선택적으로 표지하여 미토파지가 유도되고, 이는 미토파지가 미토콘드리아의 분열, 융합, 및 ubiquitination과 관련된 단백질 간의 상호 작용에 의해 유도된다는 것이다(Youle et al., 2011). 자가포식 과정은 주로 세포 내 노화된 단백질과 손상 또는 수명이 다한 기관을 제거하기 위하여 일련의 단계를 거쳐 autophagosome이 형성되면 라이소좀과의 융합(fusion)으로 최종 분해하여 체내 독성의 축적을 억제하게 된다(Glick et al., 2010). 하지만 자가포식 과정에 결함이 발생하면 mis-folded proteins의 비정상적인 축적이 증가하게 되고, 비정상적인 자가포식과정의 활성화는 세포질, 단백질, 세포소기관의 제거를 촉진하여 근육의 감소를 악화시키게 된다(Dobrowolny et al., 2008; Masiero et al., 2010). 특히 노화된 심장은 세포 내 산화적 스트레스를 과도하게 유도하고 이는 자가포식 과정을 억제하여,

다양한 심장질환을 유발하는 것으로 알려져 있다(De Meyer et al., 2010).

미토파지가 진행되려면 미토콘드리아가 분열되기 전에 네트워크로부터 분리되어야 한다(Ikeda et al., 2015). 즉, DRP1(dynamitin 1 like protein)이 활성화되지 못하면 미토파지 과정이 손상되어 autophagosome의 감소가 일어나게 된다(Carreira et al., 2010). 이렇듯 미토콘드리아에서 일어나는 미토콘드리아 역동성(분열과 융합)은 미토파지와 긴밀하게 연결되어 있으며, 이는 미토콘드리아 품질관리가 개별적인 과정이 아니라 서로 유기적으로 연결되어 있는 시스템이라는 것을 알 수 있다.

운동과 심장근육 미토콘드리아 품질관리 연구에 있어 미토콘드리아의 생합성 관련 연구는 많은 연구가 진행되어 있지만, 심장근육의 미토콘드리아 역동성, 자가포식은 관련 연구가 부족한 실정이다. 특히 자가포식과 관련된 미토파지에 대한 연구는 부족한 실정이다. 자가포식은 인체 내 다양한 생리과정과 질병에서 보호 작용을 한다고 알려져 왔지만, 심혈관계에서 자가포식의 역할은 확실하게 규명되지 못하고 있다(Lavandero et al., 2013). 따라서 본 연구의 목적은 운동으로 유도된 자가포식이 심장 보호적인 명확한 효과를 갖고 있는지, 1회성 운동과 장기적인 운동을 통한 자가포식이 동일한 효과가 있는지 알아보고자 한다.

II. 연구방법

1. 실험동물

본 연구에서 활용한 실험동물은 8주령 Wister rat 수컷 쥐이며(주KOATECH로부터 분양받아 실험을 진행하였다. 실험동물은 H 대학교 동물사육실 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$, 명암주기 12시간)에서 사육하였다. 실험기간 동안 식이량과 수분섭취는 제한 없이 공급하였다. 집단은 sedentary control group (CON, n=10), acute endurance exercise group (AEE, n=40), chronic endurance exercise group (CEE, n=10)으로 구분하였다.

2. 운동방법

트레드밀 운동은 rodent 트레드밀(DJ2-242, Daejong Instrument Industry Co. Seoul, Korea) 장비를 사용하였다. 먼저 AEE 그룹은 총 40마리를 배정하며 급성 운동은 경사도를 0%로 고정시킨 후에 1주간 사전 적응훈련(10 min/day, 5~10 m/min, 5 days/week)을 실시한 후 본 운동은 경사도를 0%로 고정시킨 후에 60분 동안 12m/min 속도로 실시하였다(30분간 2세트, 세트 사이 5분 휴식). 운동이 끝나면 운동 직후, 1시간, 3시간, 24시간에 각각 10마리씩 희생하였다. AEE 그룹에게 적용할 운동방법은 Lee et al. (2016)의 연구에서 제시한 운동 프로그램을 활용하였으며, 시간대별 희생 방법은 Ogura et al. (2011)의 연구를 참고하였다. CEE 그룹은 총 10마리를 배정하였으며, 트레드밀 운동은 경사도를 0%로 고정시킨 후에 1주간 사전 적응훈련(10 min/day, 5~10 m/min, 5 days/week)

을 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 et al. (2003)이 제시한 중강도 운동 프로그램을 수정하여 실시하였다.

3. 조직 적출 및 혈액검사

모든 실험동물은 정해진 희생 시간대에 맞춰 동물용 챔버(chamber)를 이용하여 CO₂(이산화탄소)가스를 주입하여 실험동물이 무의식 상태의 모습이 보이면 농도를 50~70%로 증가시켜 안락사를 유도하였다. 심장에서 혈액을 채혈하는 동물(집단 당 6마리)의 조직은 western blot 실험용으로 활용하고 나머지 4마리는 면역조직화학분석용으로 활용하였다. 심장 조직은 빠르게 적출하여 액체질소에 급랭하여 분석 시까지 -80°C의 초저온 냉동기(Bio-Freezer, Forma Science, USA)에 보관하였다.

4. 미토콘드리아 분리

적출된 심장 조직의 미토콘드리아 분리는 Mitochondria Extraction Kit(IMGENEX Corporation, San Diego, CA, USA)을 구매하여 제조업체의 지침에 따라 진행하였다. 심장조직 100mg 당 1 mL의 homogenizing buffer를 넣어 균질화 후, 4°C에서 10분간 3,000 rpm으로 원심 분리하고 분리된 상층액을 다시 4°C에서 30분간 12,000 rpm으로 원심 분리하였다. 원심분리 후 pellet 을 1 mL의 suspension buffer를 넣어 잘 섞어 준 다음 다시 4°C에서 10분간 12,000 rpm으로 원심 분리하였다. 이후 상층액을 제거 후 다시 suspension buffer 1 mL을 넣고 잘 섞어 준 후 4°C에서 10분간 12,000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 제거하고 남은 pellet은 1 mL의 Complete Mitochondrial lysis buffer를 넣어 4°C에서 30분간 녹인 후 분리된 mitochondrial extract를 4°C에서 5분간 12,000 rpm으로 원심분리하여 상층액(mitochondria fraction)을 얻었다.

5. Western blot

각각의 집단에서 얻어진 미토콘드리아와 세포질의 총 단백질량을 Bradford method에 따라 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°C에서 (12시간 이상) 반응시켰다. 미토파지 관련 항체(SQSTM1/p62, Optineurin, Parkin, PINK1, BNIP3, LC3B), 미토콘드리아 기능 관련 항체 (COX IV, PHB1, Pyruvate Dehydrogenase, SDHA, Citrate synthase), 그리고를 활용하였다. 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.

6. Hematoxyline & Eosin Staining

심장 근섬유 내의 형태학적 변화를 확인하기 위하여 좌심실 부위를 연속관상 절편 하여 Hematoxylin and Eosin(H&E) Staining을 진행하였다. 분석을 위해 적출된 조직을 OCT (O.C.T® Compound, Sakura Finetech, USA)로 두른 후 빠르게 세워 Isopentane (JUNSEI, 2013A2137)에 동결시킨 후 분석 이전 까지 -80° C 에 보관하였다. 냉동미세절단기(Leica, CM1850,)를 사용하여 10μm의 두께로 연속관상 절편을 제작하여 Microscope Slide에 부착하였다. 조직을 부착한 Microscope slide를 H&E 염색을 위해 Mayer's hematoxyline 용액(Dako, CS700)에 10분간 염색하고, 흐르는 물에 10분간 수세하였다. Bluing Buffer (Dako,CS702)에 5분간 침적시켜 가볍게 흔들고 흐르는 물에 5분간 세척 후 Eosin (Dako,CS701)에 2분간 반응하였다. Hematoxylin과 Eosin에 반응시킨 조직 절편을 탈수(Dehydration) 시키기 위해 80%, 90%, 100% ethanol I, II, III에 각 30초, Xylene : Ethanol (1:1) 용액에 30초간 1번, 조직 관찰을 용이하게 하기위한 투명(Clearing)과정으로 100% Xylene I, II, III에 각 30초씩 3번을 거친 후 Cover Glass에 permount를 이용하여 봉입하였다.

7. TUNEL assay

심장 근육 내 세포의 apoptosis를 확인하기 위한 실험방법으로 TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling)법을 이용하였다. TUNEL은 Roche 사의 In Situ Cell Death Detection, POD kit를 이용하고 분석절차는 제조사의 Manual에 따라 분석하였다. 세포사멸의 정도는 현미경(x400)에서 관찰되는 apoptotic body의 개수로 판정하였다.

8. 자료처리 및 평가방법

본 연구에서 얻어진 모든 자료는 윈도우용 18.0 SPSS 통계 프로그램을 이용하여 기술 통계치(mean±SE)를 산출할 것이다. 집단 간에 따른 종속변인들 간의 차이 여부 검증은 일원변량분석(One way ANOVA)을 실시하고, 집단 간 유의한 차이가 있을 경우 Bonferroni 방법을 이용하여 사후 검증을 실시하였다. 이때 통계적 유의수준은 $\alpha = .05$ 로 설정하였다.

III. 연구결과

1. 심장근에서 H&E 염색 결과

심장 근섬유 내의 형태학적 변화를 확인하기 위하여 좌심실 부

위를 연속관상 절편 하여 H&E 염색을 실시하였으며 Fig 1에 제시하였다. CON 집단, AEE0, AEE1, AEE2, AEE3 집단 및 CEE 집단에 큰 변화는 나타나지 않았으며, 따라서 1회성 운동은 심장근의 구조적인 변화를 일으키지 않는다는 확인하였다.

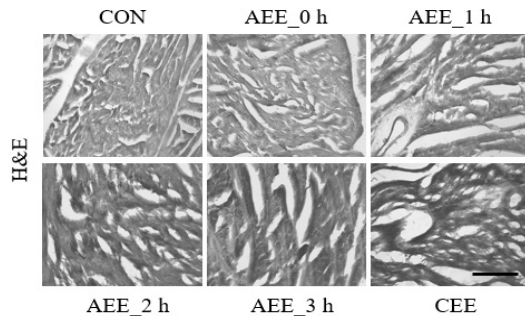


Fig 1. Representative images of the H&E-stained cardiac tissues, scale bar indicates 100 μ m.

2. 심장근에서 TUNEL-양성 세포수 결과

심장근의 TUNEL-양성 세포수(positive cells)를 확인하기 위해서 면역조직화학법으로 분석한 결과, CON 그룹에 비해 AEE_1h, AEE_2h 그룹에서 증가하는 경향은 있었지만, 통계적으로 유의한 차이는 없는 것으로 나타났다. 결과적으로 각 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

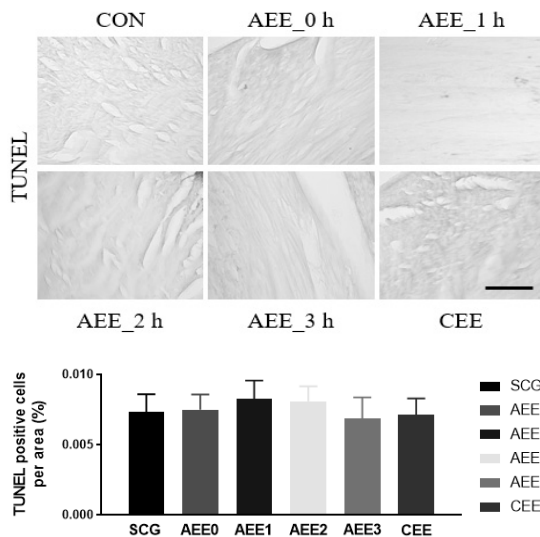


Fig 2. Representative images of the TUNEL positive cells in the cardiac tissues, scale bar indicates 50 μ m.

3. 심장근에서 미토파지 관련 단백질 변화

급성 운동과 8주간의 트레이드밀 운동에 따른 미토콘드리아 미토파지 관련 단백질의 변화를 알아보기 위해 시간대(안정시, 직후, 1시간, 2시간)를 구분하여 분석하여 제시하였다. 미토콘드리아의 활성화와 관련된 주요 지표의 분산분석 결과는 아래와 같다.

SQSTM1/p62 단백질은 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다($F_{(4,29)}=19.587$, $p<.001$). 사후검증을 실시한 결과, SCG와 AEE_0h, AEE_2h는 차이가 없는 것으로 나타났지만, AEE_1h ($p<.001$), CEE ($p<.05$)는 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 나타났다. AEE_0h에 비해 AEE_2h는 차이가 없었지만, AEE_1h ($p<.001$)와 CEE ($p<.05$)는 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 나타났다. Optineurin 단백질은 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다($F_{(4,29)}=10.125$, $p<.001$). 사후검증을 실시한 결과, SCG와 AEE_1h는 차이가 없는 것으로 나타났지만, AEE_0h ($p<.001$), AEE_2h ($p<.001$), CEE ($p<.05$)는 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 나타났다. AEE_1h ($p<.001$)에 비해 AEE_2h ($p<.05$)는 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 나타났다. AEE_2h에 비해 CEE는 통계적으로 차이가 없는 것으로 나타났다. Parkin 단백질은 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다($F_{(4,29)}=30.613$, $p<.001$). 사후검증을 실시한 결과, SCG와 AEE_0h, CEE는 차이가 없는 것으로 나타났지만, SCG에 비해 AEE_1h ($p<.001$)와 AEE_2h ($p<.05$)는 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 나타났다. 하지만 AEE_1h와 AEE_2h에 비해 CEE ($p<.001$)는 통계적으로 유의하게 감소된 것으로 나타났다. PINK1 단백질은 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다($F_{(4,29)}=9.094$, $p<.001$). 사후검증을 실시한 결과, SCG에 비해 모든 그룹에서 통계적으로 유의하게 증가한 것으로 나타났다. 하지만 AEE_0h, AEE_1h, AEE_2h, AEE_0h 그룹 간에는 통계적으로 유의한 차이는 없는 것으로 나타났다. BNP3 단백질은 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다($F_{(4,29)}=16.777$, $p<.001$). 사후검증을 실시한 결과, SCG에 비해 AEE_0h ($p<.001$), AEE_1h ($p<.001$) 그리고 CEE ($p<.001$)는 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 나타났으며, AEE_2h는 차이가 없는 것으로 나타났다. AEE_0h는 AEE_01h, CEE와는 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. AEE_02h는 AEE_0h ($p<.001$), AEE_1h ($p<.001$), CEE ($p<.01$)에 비해 통계적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. LC3 단백질은 LC3-I와 LC3-II의 비율을 분석한 결과, 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다($F_{(4,29)}=16.288$, $p<.001$). 사후검증을 실시한 결과, SCG에 비해 AEE_0h, AEE_1h는 통계적으로 유의하게 감소한 것으로 나타났지만, SCG에 비해 AEE_2h와 CEE는 차이가 없는 것으로 나타났다. AEE_0h에 비해 AEE_2h ($p<.001$)와 CEE ($p<.001$)는 통계적으로 유의하게 증가한 것으로 나타났다.

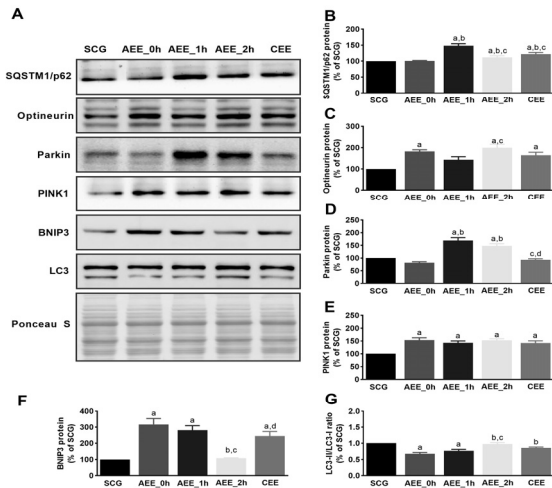


Fig 3. Ponceau S = loading control. ^a Denotes statistical difference from the SCG, ^b Denotes statistical difference from the AEE_0h, ^c Denotes statistical difference from the AEE_1h, ^d Denotes statistical difference from the AEE_2h, ($p < .05$).

4. 심장근에서 미토콘드리아 기능 관련 단백질 변화

급성 운동과 8주간의 트레드밀 운동에 따른 미토콘드리아 기능 관련 단백질의 변화를 알아보기 위해 시간대(안정시, 직후, 1시간, 2시간)를 구분하여 분석하여 제시하였다. 미토콘드리아의 활성화와 관련된 주요 지표를 분산분석 결과는 아래와 같다.

COX IV 단백질은 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다($F_{(4,29)}=66.531$, $p<.001$). 사후검증을 실시한 결과, SCG 그룹에 비해 다른 4집단 모두 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다($p<.001$). 그리고 AEE_0h에 비해 AEE_2h ($p<.001$), CEE ($p<.001$)에서 통계적으로 유의하게 증가한 것으로 나타났다. 결과적으로 직후에 비해 시간이 지날수록 COX IV의 발현량이 증가한 것으로 나타났다. PHB1 단백질은 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다($F_{(4,29)}=19.806$, $p<.001$). 사후검증을 실시한 결과, SCG에 비해 AEE_0h ($p<.001$), AEE_1h ($p<.001$)는 모두 감소되었지만 AEE_0h에 비해 AEE_2h ($p<.001$)와 CEE ($p<.001$)에 비해 증가된 것으로 나타났다. PD 단백질은 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다($F_{(4,29)}=28.186$, $p<.001$). 사후검증을 실시한 결과, SCG에 비해 모든 그룹에서 증가된 것으로 나타났다 ($p<.001$). 하지만 AEE_0h, AEE_1h, AEE_2h, CEE는 통계적으로 유의한 차이는 없는 것으로 나타났다. SDHA 단백질은 그룹간에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다($F_{(4,29)}=17.553$, $p<.001$). 사후검증을 실시한 결과, SCG에 비해 AEE_0h ($p<.01$), AEE_2h ($p<.05$), CEE ($p<.001$)에서 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 나타났다($p<.001$). CS 단백질은 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다($F_{(4,29)}=26.461$, $p<.001$). 사후검증을 실시한 결과, SCG에 비해 모든 그룹에서 증가된 것으로 나타났다($p<.001$). 하지만 AEE_0h, AEE_1h, AEE_2h, CEE는 통계적으로 유의한 차이는 없는 것으로 나타났다.

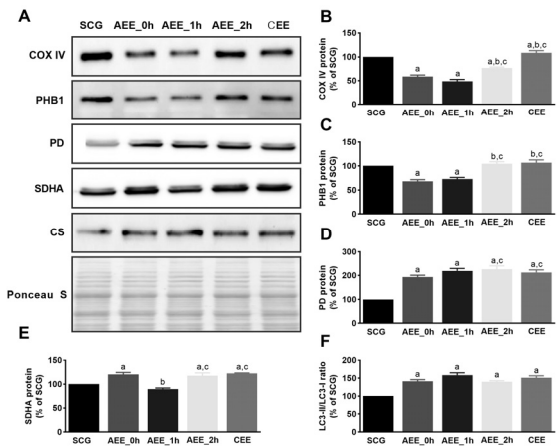


Fig 4. Ponceau S = loading control. ^a Denotes statistical difference from the SCG, ^b Denotes statistical difference from the AEE_0h, ^c Denotes statistical difference from the AEE_1h, ^d Denotes statistical difference from the AEE_2h, ($p < .05$).

IV. 논의

운동이 인체 내 다양한 조직에서 자가포식을 유도하는 것에는 많은 학자들이 동의하고 있다. 하지만 운동으로 유도된 자가포식이 심장 보호적인 효과가 있는지에 대해서는 명확한 결과가 제시되지 못하고 있다. 또한 급성운동으로 유도된 자가포식이 8주간의 트레드밀 운동으로 유도된 자가포식과 동일한 효과가 있는지에 대해서는 연구된 바 없다. 본 연구는 급성운동과 8주간의 트레드밀 운동으로 유도된 미토콘드리아의 품질관리에 알아보는데 목적이 있으며 그에 대한 자세한 논의는 아래와 같다.

먼저, 심장 근섬유 내의 형태학적 변화를 확인하기 위하여 좌심실 부위를 연속관상 절편 하여 H&E 염색을 실시하였다. 각각의 집단에서 큰 변화는 나타나지 않았으며, 급성운동은 심장의 구조적인 변화를 일으키지 않는다는 확인하였다. 또한 심장근의 TUNEL-양성 세포수(positive cells)를 확인하기 위해서 실시한 면역조직화학법의 결과도 통계적으로 유의한 차이는 없었으며, H&E 염색 결과와 TUNEL-양성 세포수에 대한 결과를 바탕으로 급성운동이 심장근육에서의 구조적인 변화 및 세포사멸을 유도하지 않는 것으로 나타났다.

본 연구는 미토콘드리아의 품질관리(자가포식, 역동성)가 급성운동으로 영향을 받을 수 있는지, 그리고 이러한 급성운동으로 인한 시간대별(직후, 1시간, 2시간) 변화양상과 장기간의 운동으로 인한 미토콘드리아 품질관리에 차이점이 있는지 여부를 확인하였다. 일반적으로 선행연구들은 급성운동이 미토파지를 활성화한다고 보고하고 있다(Lo Verso et al., 2014; Vainshtein et al., 2015). 하지만 Yoo et al(2019)의 연구에서는 급성운동이 좌심실 근육에서 Parkin, Pink1, LC3II, Bnip3와 같은 미토파지 관련 단백질들이 급성운동을 통해 증가하는 경향은 있었지만 통계적인 차이는 없었다고 보고하였다. 하지만 가지미근에서는 Parkin과 LC3II를 유의하게 증가시켰

지만 Pink1과 Bnip3는 증가시키지 않았으며 이러한 이유는 아마도 조직 특이적 결과로 운동 유형과 그에 따라 동원되는 근육 유형에 따라 차이가 있다고 보고하였다(Yoo et al., 2019). 이처럼 급성운동에 대한 미토파지의 활성화는 다소 논란의 여지가 있지만, 기능장애 미토콘드리아의 적절한 제거를 통한 최적의 심장 기능에 있어 미토파지는 적절하게 활성화되어야 함은 분명해 보인다(Lee et al., 2017). 또한 PINK1-Parkin 신호전달 경로는 손상된 미토콘드리아의 항상성을 조절하는 주요 경로이며(Vives-Bauza et al., 2010; Matsuda et al., 2010), 본 연구결과에서는 Parkin의 경우 급성운동 1시간 이후, PINK1의 경우 급성운동 직후부터 활성화된 것으로 나타났다. 또한 선택적 자가포식을 유도하는 SQSTM1/p62 단백질(Geisler et al., 2010), 자가포식체를 형성하는 LC3의 경우(Huang et al., 2011), 급성운동 후에 활성화되는 것으로 나타났다. BNIP3 마찬가지로 세포사멸을 통해 미토파지를 매개하는 단백질로(Tang et al., 2019), 본 연구에서는 특이하게도 급성운동 직후와 1시간에는 활성화되었다가 2시간 이후에는 활성이 감소되는 것으로 나타났다. 세포생존을 위한 세포사멸이라는 관점에서 H&E 염색결과와 TUNEL-양성 세포수결과와 관련지어 생각해보면 병적인 상황이 아닌 객체에서의 급성운동은 심장근의 세포사멸을 유도하지 않는다고 생각된다.

본 연구에서 미토콘드리아의 기능과 관련된 단백질(COX IV, PHB1, PD, SDHA, CS)이 급성운동과 8주간의 트레드밀 운동에 어떻게 변화하는지 알아보았다. 일반적으로 COX IV는 미토콘드리아 내에서 전자를 운반하여 물을 형성하는데 관여하고 PD(pyruvate dehydrogenase)는 미토콘드리아에서 피루브산이 아세틸-코엔자임 A로 전환되는 것을 촉매하고 산화를 위해 탄수화물이 구연산회로(Citric Acid Cycle)로 들어가는 것을 조절하는 미토콘드리아 다중 효소 복합체이다(Spriet & Heigenhauser, 2002). CS (citrate synthase)는 유산소 능력과 미토콘드리아 밀도의 지표로 일반적으로 사용되고 있다(Spina et al., 1996). SDHA (succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A)는 구연산회로에서 succinate를 fumarate로 전환하는데 관여하는 효소로 이러한 단백질들은 미토콘드리아의 기본적인 기능인 산화적인산화를 통한 ATP 생산과 관련이 깊다. 본 연구에서 미토콘드리아 기능과 관련된 단백질들은 급성운동 2시간 후, CEE 그룹에서는 상향 조절된 것으로 나타났다. 구체적으로 COX IV와 PHB1의 경우, 급성운동 직후, 1시간에는 SCG 보다 오히려 발현량이 감소되었지만, 2시간 이후 그리고 CEE 그룹에서 발현량이 증가한 것으로 나타났다. PD는 급성운동 직후부터 상향 조절되었으며, 이러한 수준은 CEE 그룹과 큰 차이는 없는 것으로 나타났다. 따라서 급성운동과 8주간의 트레드밀 운동은 심장근육의 미토콘드리아 기능을 활성화시키는 것으로 나타났다. Li et al.(2018)은 실험동물 쥐를 대상으로 고강도 인터벌 훈련과 지속적인 중강도 훈련을 실시한 결과, 고강도 인터벌 훈련을 실시한 그룹에서 COX IV와 SDH의 활성도가 증가되었다고 보고하였다. 또한 고강도 인터벌 훈련은 지방산 산화의 감소와 함께 심장근육에서 글루코스 산화를 증가시켜 심장 효율을

향상시키고 최대 미토콘드리아 호흡 능력과 심근의 시트르산 합성 효소 활성이 증가된 결과라고 알려져 있다(Hafstad et al., 2011). 하지만 몇몇 선행연구들의 결과를 살펴보면, Siu et al.(2003)은 CS는 골격근에서는 유전자 발현 및 단백질 활성이 모두 상향 조절되었지만, 심장근에서는 유전자 발현만 증가되고 단백질 활성은 큰 변화가 없었다고 보고하였다. 이러한 결과는 유전자 번역 전 메커니즘과 CS 회전을 조절이 심장근육과 골격근에서의 단백질 발현 차이를 유발했을 수 있다고 하였으며, 본 연구와는 다른 샘플링 시간(마지막 운동 후 1시간, 48시간 이후)의 차이를 배제할 수는 없을 것으로 생각된다. 또한 Fang et al.(2017)은 급성으로 격렬한 운동을 실시한 결과, PHB1은 골격근에서는 유의하게 감소한 반면, 심장근육에서는 유의한 변화가 없었다고 보고하였다. 하지만 실시한 운동이 매우 고강도의 탈진적 운동으로 실험동물의 뇌와 골격근에서 미토콘드리아의 산화적 인산화 감소, ROS 생성 증가, PHB1 발현 감소, ATP 함량 및 complex V 활성이 감소 되었으며, 미토콘드리아에서 PHB1의 발현을 감소시키고 미토콘드리아 기능을 감소시키며 에너지 대사를 감소시켰다고 보고하였다. 이러한 결과는 아마도 미토콘드리아의 기능이 감소될 정도로 실시한 고강도의 운동이 영향을 미쳤을 것으로 판단되며, 실시한 운동의 강도에 따른 차이로 인해 본 연구결과와 다른 결과가 보고된 것으로 판단된다.

V. 결론 및 제언

본 연구는 급성 운동과 8주간의 트레드밀 운동이 쥐 심장근육에서 미토콘드리아 기능과 미토파지에 미치는 영향을 알아보았다. 심장근의 H&E 염색과 TUNEL-양성 세포수 결과는 통해 각각의 집단에서 큰 변화는 나타나지 않았으며, 심장근육에서 세포사멸 및 구조적인 변화를 일으키지 않는다는 것을 확인하였다. 급성 운동과 8주간의 트레드밀 운동은 미토파지 관련 단백질과 미토콘드리아 기능 관련 단백질에서 긍정적인 개선효과가 있는 것으로 나타났다. 따라서 급성운동은 8주간의 트레드밀 운동과 유사한 효과가 있는 것으로 나타났다. 하지만 이러한 급성 운동의 효과가 지속적으로 유지되는지에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

참고문헌

- 통계청 보도자료 (2021). 2021년 사망원인통계.
- Carreira, R. S., Lee, Y., Ghochani, M., Gustafsson, Å. B., & Gottlieb, R. A. (2010). Cyclophilin D is required for mitochondrial removal by autophagy in cardiac cells. *Autophagy*, 6(4), 462-472.
- Delbridge, L. M. D., Mellor, K. M., Taylor, D. J., Gottlieb, R. A. (2017). Myocardial stress and autophagy: mechanisms and

- potential therapies. *Nat Rev Cardiol*, 14(7): p. 412-425.
- De Meyer, G. R., De Keulenaer, G. W., & Martinet, W. (2010). Role of autophagy in heart failure associated with aging. *Heart failure reviews*, 15(5), 423-430.
- Dobrowolny, G., Aucello, M., Rizzuto, E., Beccafico, S., Mammucari, C., Boncompagni, S., Belia, S., Wannenes, F., Nicoletti, C., Del Prete, Z., Rosenthal, N., Molinaro, M., Protasi, F., Fanò, G., Sandri, M., & Musarò, A. (2008). Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity. *Cell metabolism*, 8(5), 425-436.
- Fang, W., Li, Z., Liu, X. H., Liu, Z. M., Dun, Y., & Feng, H. (2017). Effects of exhaustive exercise on the expression of PHB1 and the function of mitochondria in rats. *Chinese journal of applied physiology*, 33(6), 544-549.
- Geisler, S., Holmström, K. M., Skujat, D., Fiesel, F. C., Rothfuss, O. C., Kahle, P. J., & Springer, W. (2010). PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature cell biology*, 12(2), 119-131.
- Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology*, 221(1), 3-12.
- Hafstad, A. D., Boardman, N. T., Lund, J., Hagve, M., Khalid, A. M., Wisløff, U., Larsen, T. S., & Aasum, E. (2011). High intensity interval training alters substrate utilization and reduces oxygen consumption in the heart. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 111(5), 1235-1241.
- He, C., & Klionsky, D. J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual review of genetics*, 43, 67-93.
- Huang, C., Andres, A. M., Ratliff, E. P., Hernandez, G., Lee, P., & Gottlieb, R. A. (2011). Preconditioning involves selective mitophagy mediated by Parkin and p62/SQSTM1. *PloS one*, 6(6), e20975.
- Ikeda, Y., Shirakabe, A., Maejima, Y., Zhai, P., Sciarretta, S., Toli, J., Nomura, M., Mihara, K., Egashira, K., Ohishi, M., Abdellatif, M., & Sadoshima, J. (2015). Endogenous Drp1 mediates mitochondrial autophagy and protects the heart against energy stress. *Circulation research*, 116(2), 264-278.
- Senyo, S. E., Lee, R. T., Kuhn B. (2014). Cardiac regeneration based on mechanisms of cardiomyocyte proliferation and differentiation. *Stem Cell Res*, 13(3 Pt B): p. 532-41.
- Siu, P. M., Donley, D. A., Bryner, R. W., & Alway, S. E. (2003). Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 94(2), 555-560.
- Spina, R. J., Chi, M. M., Hopkins, M. G., Nemeth, P. M., Lowry, O. H., & Holloszy, J. O. (1996). Mitochondrial enzymes increase in muscle in response to 7-10 days of cycle exercise. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 80(6), 2250-2254.
- Spriet, L. L., & Heigenhauser, G. J. (2002). Regulation of pyruvate dehydrogenase (PDH) activity in human skeletal muscle during exercise. *Exercise and sport sciences reviews*, 30(2), 91-95.
- Tang, C., Han, H., Liu, Z., Liu, Y., Yin, L., Cai, J., He, L., Liu, Y., Chen, G., Zhang, Z., Yin, X. M., & Dong, Z. (2019). Activation of BNIP3-mediated mitophagy protects against renal ischemia-reperfusion injury. *Cell death & disease*, 10(9), 677.
- Lavandro, S., Troncoso, R., Rothermel, B. A., Martinet, W., Sadoshima, J., & Hill, J. A. (2013). Cardiovascular autophagy: concepts, controversies, and perspectives. *Autophagy*, 9(10), 1455-1466.
- Lee, Y., Kang, E. B., Kwon, I., Cosio-Lima, L., Cavnar, P., & Javan, G. T. (2016). Cardiac Kinetophagy Coincides with Activation of Anabolic Signaling. *Medicine and science in sports and exercise*, 48(2), 219-226.
- Lee, Y., Kwon, I., Jang, Y., Song, W., Cosio-Lima, L. M., & Roltsch, M. H. (2017). Potential signaling pathways of acute endurance exercise-induced cardiac autophagy and mitophagy and its possible role in cardioprotection. *The journal of physiological sciences : JPS*, 67(6), 639-654.
- Li, F. H., Li, T., Su, Y. M., Ai, J. Y., Duan, R., & Liu, T. C. (2018). Cardiac basal autophagic activity and increased exercise capacity. *The journal of physiological sciences : JPS*, 68(6), 729-742.
- Lo Verso, F., Carnio, S., Vainshtein, A., & Sandri, M. (2014). Autophagy is not required to sustain exercise and PRKAA1/AMPK activity but is important to prevent mitochondrial damage during physical activity. *Autophagy*, 10(11), 1883-1894.
- Nakai, A., Yamaguchi, O., Takeda, T., Higuchi, Y., Hikoso, S., Taniike, M., Omiya, S., Mizote, I., Matsumura, Y., Asahi, M., Nishida, K., Hori, M., Mizushima, N., Otsu, K. (2007). The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med*, 13(5): p. 619-24.

-
- Masiero, E., & Sandri, M. (2010). Autophagy inhibition induces atrophy and myopathy in adult skeletal muscles. *Autophagy*, 6(2), 307-309.
- Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, C. A., Sou, Y. S., Saiki, S., Kawajiri, S., Sato, F., Kimura, M., Komatsu, M., Hattori, N., & Tanaka, K. (2010). PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *The Journal of cell biology*, 189(2), 211-221.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., & Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182), 1069-1075.
- Ogura, Y., Iemitsu, M., Naito, H., Kakigi, R., Kakehashi, C., Maeda, S., & Akema, T. (2011). Single bout of running exercise changes LC3-II expression in rat cardiac muscle. *Biochemical and biophysical research communications*, 414(4), 756-760.
- Yoo, S. Z., No, M. H., Heo, J. W., Park, D. H., Kang, J. H., Kim, J. H., Seo, D. Y., Han, J., Jung, S. J., & Kwak, H. B. (2019). Effects of Acute Exercise on Mitochondrial Function, Dynamics, and Mitophagy in Rat Cardiac and Skeletal Muscles. *International neurourology journal*, 23(Suppl 1), S22-S31.
- Youle, R. J., & Narendra, D. P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(1), 9-14.
- Vainshtein, A., Tryon, L. D., Pauly, M., & Hood, D. A. (2015). Role of PGC-1 α during acute exercise-induced autophagy and mitophagy in skeletal muscle. *American journal of physiology*, 308(9), C710-C719.
- Vives-Bauza, C., Zhou, C., Huang, Y., Cui, M., de Vries, R. L., Kim, J., May, J., Tocilescu, M. A., Liu, W., Ko, H. S., Magrané, J., Moore, D. J., Dawson, V. L., Grailhe, R., Dawson, T. M., Li, C., Tieu, K., & Przedborski, S. (2010). PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(1), 378-383.