

정상 기압 환경에서 운동과 대기
산소 농도가 활성산소 생성과
항산화능에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의 학 과

김 태 진

정상 기압 환경에서 운동과 대기
산소 농도가 활성산소 생성과
항산화능에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의 학 과

김 태 진

정상 기압 환경에서 운동과 대기
산소 농도가 활성산소 생성과
항산화능에 미치는 영향

지도 박 주 영 교수

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2010년 1월 15일

연세대학교 대학원

의 학 과

김 태 진

김 태 진의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2010년 1월 15일

감사의 글

외과 임상의로의 길을 걸으며, 많은 도전, 감동, 좌절 등의 소용돌이 같은 순간들과 끝없이 부딪혀 보았음에도, 뒤늦게 학위를 준비하는 것은 제가 넘어서야 할 너무나도 큰 산이었습니다. 어찌할 바를 모르고 있는 저에게 박 주영 교수님은 큰 영감을 주셨고, 교수님과 박 현숙 선생님, 서 희석 선생님 아니었으면 감히 업무를 못 낼 힘든 여정이었을 것입니다. 진정으로 감사드립니다.

본 논문의 완성을 위하여 지도와 조언을 아끼시지 않으신 등 영건 교수님, 강 성준 교수님, 공 인덕 교수님과 바쁜 시간에도 마지막까지 격려해주신 배 금석 교수님께 감사를 드립니다.

무엇보다도 저를 찾아주시는 환자분들을 제일 큰 가르침의 스승이라 생각하기에 이분들의 건강을 목표로 겸허한 마음을 다해 의업에 충실할 것을 이 기회를 빌어 다시 한번 다짐합니다.

한 분야의 전문의사로서 끝없는 후원과 모델이 되어주신 박 정수 교수님, 바로 옆에서 늘 격려와 충고를 아끼지 않으시는 이 병우 선생님, 충주의료원의 원장님을 비롯한 여러 선배 및 후배 스텝들과, 저에게 항상 사랑을 베풀어 주시는 부모님과, 옆에서 끝없이 신뢰해 주고 따라주는 소중한 아내와 바르게 커나가고 있는 우리 아이들 하렵, 하경과 이 작은 완성의 기쁨을 함께 나누고 싶습니다.

2010년 1월 저자 올림

차 례

그림 차례	iii
표 차례	iv
국문요약	v
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 재료	5
1) 실험 동물	5
2. 연구 방법	5
1) 저산소 환경	5
2) 운동 방법	6
3. 분석 방법	7
1) 활성 산소 분석	7
2) 항산화능 분석	7
3) mRNA 분리 및 cDNA 합성	7
4) DNA 분리	8
5) reverse transcription-polymerase chain reaction 및 real-time PCR	8
6) 광학현미경 시료	10
7) 전자현미경 시료	10
4. 자료 처리	11
III. 결과	12
1. 저산소 환경 확인	12

1) HIF-1 α 발현에 미치는 영향	12
2. 항산화 효소 및 항산화능 변화에 따른 활성 산소의 조절	14
1) 운동과 저산소가 활성 산소 발생에 미치는 효과	14
2) 운동과 저산소가 근육내 항산화 효소에 미치는 영향	16
3) 운동과 저산소가 혈청내 항산화능에 미치는 영향	18
3. 운동과 저산소가 당 대사에 미치는 영향	20
1) 해당과정에 관여하는 유전자의 발현	20
2) 젖산 대사에 미치는 영향	22
4. 운동과 저산소가 미토콘드리아에 미치는 영향	24
1) 근육의 형태학적 관찰	24
2) 운동과 저산소가 미토콘드리아 생성에 미치는 영향	27
3) 근육내 미토콘드리아 copy 수 측정	29
4) 운동과 저산소가 미토콘드리아 활성화에 미치는 영향	31
IV. 고찰	33
V. 결론	39
참고문헌	41
영문요약	46

그림 차례

Fig. 1. Effects of hypoxia and exercise on HIF-1 α mRNA expression in skeletal muscle	13
Fig. 2. Comparison of free radical generation	15
Fig. 3. Effects of hypoxia and exercise on CuZnSOD mRNA(A) and MnSOD mRNA(B) expression in skeletal muscle	17
Fig. 4. Comparison of antioxidant potential	19
Fig. 5. Effects of hypoxia and exercise on GLUT4 mRNA(A) and PFKm mRNA(B) expression in skeletal muscle.	21
Fig. 6. Effects of hypoxia and exercise on CA3 mRNA(A) and MCT-1 mRNA(B) expression in skeletal muscle.	23
Fig. 7. Light micrograph of skeletal muscle section	25
Fig. 8. Electron micrograph of skeletal muscle section	26
Fig. 9. Effects of hypoxia and exercise on PGC1 α mRNA(A) and TFAM mRNA(B) expression in skeletal muscle.	28
Fig.10. Effects of hypoxia and exercise on mitochondrial copy number in skeletal muscle.	30
Fig.11. Effects of hypoxia and exercise on COX4 mRNA(A) and CS mRNA(B) expression in skeletal muscle.	32

표 차 례

Table 1. Experimental design for exercise induced changes	6
Table 2. Sequence of PCR primers	9
Table 3. PCR condition	10

정상 기압 환경에서 운동과 대기 산소 농도가 활성산소 생성과 항산화능에 미치는 영향

산소는 살아가는 데 꼭 필요하지만 산소를 이용한 대사 활동의 결과로 인해 유해 산소인 활성산소도 만들어지며, 이로 인한 산화적 조직 손상으로부터 동물세포는 스스로를 보호하기 위해 활성산소 및 반응성 산소화합물의 생성을 방지, 제거, 불활성화 시켜 조직 손상을 최소한으로 억제하는 항산화 능력을 가지고 있다. 운동은 일시적으로 조직에 저산소 상태를 유발시키고 활성산소 생성량을 증가시키지만 신체는 이에 대해 여러 가지 항상성 유지 반응을 보인다. 본 연구에서는 지속적 운동 또는 장기간에 걸친 간헐적 저산소 상태에의 노출이 마우스의 활성산소 생성과 항산화능에 미치는 영향과 에너지대사에 미치는 영향을 알아보기 위해, Balb/C mouse를 교배하여 얻은 신생 생쥐를 대상으로 생후 12시간 이내에 산소 농도 13%의 저산소 환경에 두 시간마다 30분 동안 간헐적, 만성적으로 노출한 군과 대조군에서 출생 10주 후부터 정상 산소상태에서 1주일 3일간 20 m/min의 속도로 40분간 트레드밀 운동을 10주간 시켰다. 13 %의 산소 조건 (해발 3,800 m 상당 고도)에서 생활하며 21 %의 산소 조건 (해수면 상당 고도)에서 운동하는 저산소 운동군 (hypoxia exercise, HE), 21 % 산소 조건에서 생활과 운동을 수행하는 정상산소 운동군 (normoxia exercise, NE), 13 % 산소 조건에서 생활하며 운동은 수행하지 않는 저산소 비운동군 (hypoxia control, HC) 및 21 % 산소 조건에서 생활하며 운동은 수행하지 않는 정상산소 비운동군 (normoxia control, NC)으로 구분하여, 각각 그룹별 20마리씩 혈액내 활성산소량과 항산화능을 조사하였고, 에너지대사에 미치는 영향을 알아보기 위해 근육내 당대사 관련 유전자와 미토콘드리아 생성 및 활성에 관련된 유전자들의 발현 정도를 확인하였으며, 산소 농도와 운동 여부에 따른 발현 정도를 비교하여 저산소 환경과 운동에 대한 생체의 적응반응을 분석하였다. 그 결과 활성산소생성이 운동 후 증가되지 않았고, 항

산화 효소에 영향을 주는 CuZnSOD와 MNSOD mRNA 발현은 정상산소 운동군과 저산소군에서 증가하는 경향을 보였으며 혈청내 항산화능은 두 운동군에서 유의적으로 증가하였다. 골격근에서 해당과정과 관련된 GLUT4는 정상산소 운동군과 저산소 비운동군에서 유의적으로 발현이 증가되었고 PFKm은 정상산소 운동군과 저산소군들에서 증가되는 경향을 보였으며, 젖산 대사와 관련된 CA3는 운동과 저산소 환경에의 노출에 의해 모두 발현이 유의적으로 증가되었고 MCT-1 역시 저산소 비운동군에서 mRNA의 발현이 통계학적으로 유의하게 증가되었다. PGA1 α 와 TFAM의 mRNA 발현이 모두 저산소 비운동군에서 유의적으로 증가하였고, 실질적으로 근육내 미토콘드리아의 수는 정상산소 운동과 저산소 비운동군에서 유의적으로 증가하였다. 또한 미토콘드리아 활성을 보여주는 COX4와 CS mRNA 발현이 정상산소 운동군과 저산소군들에서 증가하는 경향을 보였다. 결론적으로 반복된 운동과 간헐적 저산소 상태에 장기간 노출시에 항산화능이 증가되고, 해당과정 또한 촉진되며 미토콘드리아의 수적인 증가와 활성의 증가로 저산소에 의한 조직의 손상을 감소시킬 수 있으리라고 생각된다.

핵심되는 말 : 간헐적 저산소, 활성 산소, 항산화 효소, 항산화능,
미토콘드리아, 해당과정

정상 기압 환경에서 운동과 대기 산소 농도가 활성산소 생성과 항산화능에 미치는 영향

<지도 박주영 교수>

연세대학교 대학원 의학과

김 태 진

I. 서 론

운동은 세포에 대한 간헐적이고 반복적인 저산소 상태를 만들어내는 산소관련 스트레스로서 운동을 통한 스트레스 자극을 반복적으로 시행하면 병적인 스트레스 상황에 노출될 때 이에 저항할 수 있는 능력이 증가하게 된다^{1,2)}. 저산소 환경에서의 운동은 해수면 수준보다 산소 농도가 낮은 환경에서 신체적 운동을 함으로써 고지대에 대한 신체의 적응반응을 적극적으로 자극시키는 방법으로 산소운반을 증가 시키는데 관여하는 단백질이 활발히 만들어지거나 저산소 상태에 적응할 수 있는 대사 기능의 조절이 이루어지게 된다³⁾. 저산소 환경인 고지대에서의 운동에 관심을 보이기 시작한 것은 1960년 로마올림픽에서 에티오피아 출신의 아베베 선수가 맨발로 마라톤을 우승하여 고지에 거주하는 민족의 심폐지구성 능력이 우수하다는 것을 입증하면서 부터이며 1968년 멕시코 올림픽이 해발 2,340 m의 멕시코시티에서 개최 되면서부터 더욱 관심을 많이 갖게 되었다. 저산소 환경에 대한 생리적 적응기전은 저산소에 2~3일간 노출되면 골수의 조혈작용을 촉진

하는 적혈구조혈인자(erythropoietin: EPO)의 분비가 증가되고¹⁾, 약 1~3주가 지나면 망상적혈구가 증가되며²⁾, 이러한 증가에 따라 3주 이후에는 적혈구(RBC), 헤모글로빈(Hb), 헤마토크릿(Hct)이 증가 된다⁴⁾. 이러한 혈액성분의 변화로 산소의 운반과 이용을 용이하게 하는 몇 가지 변화가 세포 수준 및 말초 순환계에서 일어난다. 산소는 살아가는 데 꼭 필요하지만 산소를 이용한 대사 활동의 결과로 인해 유해 산소, 즉 활성산소도 만들어진다. 활성산소는 이른바 불완전하게 연소된 산소로 전자를 잃어버려 항상 불안한 상태로 세포를 공격하여 손상을 입히게 되며 몸속의 활성산소가 너무 많아지면 다양한 질병으로 고통을 받게 되고 노화를 촉진시킨다고 알려져 있다. 신체 활동 중 조직으로 산소공급이 증가됨으로써 산소대사를 통해 필요한 에너지를 충분히 생산하여 신체 활동을 계속 수행할 수 있지만 운동으로 인한 과량의 산소유입은 이를 이용하는 조직에 산화적 손상을 야기하게 된다⁵⁾. 활성산소의 생성과 그에 따른 지질 과산화는 운동 강도에 의존하여 산소 섭취량의 상승에 비례하여 증가하고 골격근 손상에 정적 상관관계를 갖는 것으로 알려져 있다. 즉 운동은 최대 유산소성 능력을 향상시키지만 활성산소 생성량을 증가시키기 때문에 세포 손상의 원인이 될 수 있다. 동물세포는 항상 산화 스트레스에 노출되어 있는 반면, 산화에 의한 조직손상으로부터 스스로를 보호하기 위한 항산화 방어기전을 가지고 있어 활성산소를 제거하거나 활성을 억제시킨다. 항산화 효소로는 superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), glutathione peroxidase(GPX) 등이 있는데, 체내 활성산소 제거제로서 작용한다. 운동 중에 발생한 산화적 스트레스는 인체 내 산화제와 항산화제의 불균형을 초래하여 민감한 반응을 일으키지만^{6,7,8)}, 생체에는 활성 산소를 불활성화 시켜 손상을 최소한으로 억제하는 항산화 능력이 갖춰져 있다. 항산화제는 활성산소 및 반응성 산소화합물의 생성을 방지하거나, 그 활성도를 경감시키거나 손상된 조직을 복원하거나, 혹은 다른 항산화제의 기능을 높인다. 일반적으로 항산화제는 노화에 의하여 감소되고⁹⁾, 운동 강도와 비례하여 증가하는 양상을 보인다¹⁰⁾. 많은 연구자들은 골격근 내의 SOD 활성이 운동 후에 상당히 증가한다고 보고해 왔다. 조직에서 항산화 방어체계는 운동 상태에 따라 조절되는 것으로 보인다. 하지만 항산화 효소에 대한 운동

효과에 관한 일치된 결론을 얻지 못하였다. Higuchi 등은 근육 SOD와 CAT의 활성도가 운동으로 증가하였다고 보고하였지만¹¹⁾ Laughlin은 장기간 운동에 의해 아무런 변화를 발견하지 못하였다¹²⁾. Jackson 등은 과도한 근수축 운동에 따른 근육내 활성 산소에 관한 연구에서 과도한 근수축 운동으로 인한 활동근육의 활성 산소가 휴식시에 비해 70 % 정도 증가되었음을 보고하였으나¹³⁾, Ji 등은 흰쥐를 대상으로 1시간 동안의 트레드밀 운동을 시킨 뒤, 항산화 효소의 활성을 분석하였지만 유의한 변화가 없었다고 보고하였으며¹⁴⁾ 후속 연구에서도 흰쥐를 대상으로 탈진적 운동을 실시하고, 항산화 효소의 활성을 관찰하였지만 유의한 결과가 없었다고 보고하였다. 이와 같이 운동으로 인한 산화적 스트레스의 영향에 대한 연구는 다양하게 이루어져 왔으나, 항산화 효소의 활성에 관한 명확한 기전은 분명하지 않으며, 그 결과 또한 일치하지 않았다. Quintanilha와 Higuchi 등은 근육내 항산화 효소의 활성도가 트레이닝으로 증가하였다고 보고하였지만^{15,11)}, Alessio 등과 Laughlin 등은 장기간 트레이닝에 의해 아무런 변화를 발견하지 못하였다고 보고하는^{16,12)} 등 운동으로 인한 산화적 스트레스에 대한 연구는 그 결과가 명확하지 않았다. 또한 항산화 효소가 산화성 스트레스로 인해 형성된 각종 유해물을 처리하는 작용을 하나 그 능력에는 한계가 있어 지나치게 많은 활성 산소가 형성될 경우 그 유해성에 효과적으로 대응하지 못하기 때문에 그동안의 연구에서는 외부에서 추가적인 항산화제를 보충하여 항산화력을 높이고자 시도한 것이 많았다. 그러나 최근 Konig이 항산화제를 섭취함으로써 인한 유의한 효과가 나타날 것이라는 것은 근거가 없다고 보고함에¹⁷⁾ 따라 활성산소와 항산화능을 외부 항산화제의 보충 없이 자체 기전으로 방어할 수 있는 운동과 산소농도의 관계를 알아보는 것도 의미 있는 일이라 생각된다. 또한 운동의 종류, 강도, 회수 및 기간에 따라 미토콘드리아 호흡 전달계(mitochondrial respiratory chain)와 산화적 손상에 미치는 효과가 조절되며¹⁸⁾, 강도 높은 운동이 항산화와 미토콘드리아의 호흡관련 효소들을 조절한다는 보고가 있다^{19,20)}. 운동은 근육의 에너지와 미토콘드리아 생합성을 강화시키는 강력한 유도체로 알려져 있듯이, 유산소성 운동 및 트레이닝은 골격근에서의 지방산 이용을 촉진하여 미토콘드리아 수와 밀도를 증가 시킨다²¹⁾. 운동으로 유도

되는 근육내 미토콘드리아의 증가는 결국 산화적 인산화 반응을 통한 ATP 생성 역량을 증가시킴으로써 에너지 생성을 위한 최대 역량을 향상시키고 과격한 운동 시 발생할 수 있는 세포 내 항상성의 파괴 위험을 줄일 수 있게 된다는 것이다^{22,23,24)}.

본 연구에서는 지속적 운동 또는 장기간에 걸친 간헐적 저산소 상태에의 노출이 마우스의 활성산소 생성과 항산화능에 미치는 영향과 에너지대사에 미치는 영향을 알아보기 위해, 13 %의 산소 조건(해발 3,800 m 상당 고도)에서 장기간 생활하여 적응된 후 21 %의 산소 조건(해수면 상당 고도)에서 운동하는 저산소 운동군(hypoxia exercise, HE), 21 % 산소 조건에서 생활과 운동을 수행하는 정상산소 운동군(normoxia exercise, NE), 13 % 산소 조건에서 생활하며 운동은 수행하지 않는 저산소 비운동군(hypoxia control, HC) 및 21 % 산소 조건에서 생활하며 운동은 수행하지 않는 정상산소 비운동군(normoxia control, NC)으로 구분하여, 각 그룹별로 혈액내 활성산소량과 항산화능을 조사하였고, 에너지대사에 미치는 영향을 알아보기 위해 근육내 당대사 관련 유전자와 미토콘드리아 생성 및 활성화에 관련된 유전자들의 발현 정도를 확인하였으며, 산소 농도와 운동 여부에 따른 발현 정도를 비교하여 저산소 환경과 운동에 대한 생체의 적응반응을 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 실험 동물

마우스는 Balb/c 수컷(10 weeks, n=3)과 암컷(10 weeks, n=30) (Orient Bio, Korea)을 직접 교배하여 새끼를 얻었으며, 출생 일자가 동일한 마우스를 대상으로 출생 12시간 내에 무작위로 선정하여 비교 그룹(대조군, NC)과 실험 그룹(정상산소 운동군(NE), 저산소 비운동군(HC), 저산소 운동군(HE))으로 구분하였으며 저산소 그룹들은 출생 12시간 이내에 hypoxia chamber 내로 이동시켰다. 사육 21일 후 수컷만을 분리 사육 하면서 실험에 사용하였다. 온도 $22\pm 4^{\circ}\text{C}$ 및 습도 $60\pm 10\%$ 를 유지하면서 사육하였으며, 조명의 소등과 점등은 각 12시간씩으로 제한하였으며, 실험 중 사료와 물의 공급은 제한하지 않았다.

2. 연구 방법

1) 저산소 환경

저산소 환경은 외부 공기와 차단된 hypoxia chamber를 사용하여 조성하였으며, hypoxia pump(Biomedtech, Australia)를 이용하여 chamber 내로 산소가 13 % (3,800 m 상당 고도)로 조작된 공기를 2시간 간격으로 30분씩 주입하여 저산소 상태를 유지하였다(Table 1).

2) 운동 방법

운동은 출생 10주 후부터 정상대기(21 % 해수면 상당 고도) 환경에서 실시하였으며, Gavin 등의²⁵⁾ 방법에 따라 중강도 운동으로 실시하였다. 출생 3개월 이내의 젊은 마우스를 대상으로 한 treadmill 최고 속도는 정상 대기 환경에서 1시간 동안 31 ± 0.5 m/min인데²⁵⁾ 이 실험에서는 최고 속도의 65 %인 20 m/min으로 결정하였다. 운동은 treadmill(Panlab, Korea)을 사용하여 처음 5분간은 5 m/min로 실시하고, 점차로 속도를 20 m/min으로 증가시킨 다음, 20 m/min의 속도에서 40분간 주 3회씩(월, 수, 금) 10주 동안 실시하였다(Table 1). 저산소군은 운동직 후 곧바로 hypoxia chamber 내로 이동하였다. 대조군, 정상대기 운동군, 간헐적 저산소군, 간헐적 저산소 운동군의 총 네 군으로 나누어 네군 모두 20주째 각각 수컷 20마리씩 혈액 및 조직을 채취하였다.

Table 1. Experimental design for exercise induced changes

Treatment	Group			
	Normoxia - Control	Normoxia - Exercise	Hypoxia - Control	Hypoxia - Exercise
O₂ level	Sea level (21%)	Sea level (21%)	Low level (13%)	Low level (13%)
		16~20 m/min		16~20 m/min
Exercise	No exercise	30~40 min/day 3 days/week	No exercise	30~40 min/day 3 days/week
	n=20 ♂	n=20 ♂	n=20 ♂	n=20 ♂

Blood and muscle tissue samples were collected after 20 weeks of age

3. 분석방법

1) 활성 산소 분석

활성 산소는 d-ROMs test(Health & Diagnostics Ltd, Italy)를 이용하여 분석하였다. Capillary를 이용 후안와 정맥총에서 채혈된 혈액 20 ul를 준비된 R2 reagent에 넣고 섞은 후 cuvette으로 옮겨 원심 분리한 후 condensed chromogen mixture 와 반응시켜 505 nm에서 발색도를 측정 분석하였다.

2) 항산화능 분석

항산화능은 Biological Antioxidant Potential(BAP) test(Health & Diagnostics Ltd, Italy)를 이용하여 분석하였다. 채혈 후 원심분리를 통해 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청에 chromogenic mixture와 ferric chloride solution을 섞고 cuvette로 옮겨 505 nm에서 발색도를 측정 분석하였다.

3) mRNA 분리 및 cDNA 합성

총 RNA를 분리하기 위해 골격근(비복근, 넙치근)을 적출한 후 조직 50~100 mg 당 1 mL TRI reagent(Invitrogen Life Technology Inc, USA)를 가하여 homogenizer를 이용하여 분쇄하였다. 분쇄액에 chloroform을 첨가하여 vortex한 후, 다시 isopropanol을 첨가하고 원심분리 하였다. 침전된 RNA를 RNase free water에 용해한 후, UV spectrophotometer를 이용하여 260 nm 흡광도에서 정량 하였다. RNA 2 μ g 으로부터 oligo dT primer와reverse transcriptase를 사용하여 cDNA를 합성하였다.

4) DNA 분리

골격근으로부터 DNA를 추출하기 위해 적출한 조직 20 mg 당 600 ul lysis buffer를 가하여 homogenizer를 이용하여 분쇄한 후 65°C 에서 15분간 반응시켰다. RNase A를 첨가하고 37°C 에서 30분간 반응시켜 RNA를 제거한 후 protein precipitation buffer를 첨가하여 0°C 에서 5분간 반응시킨 후, 원심분리 하였다. 상등액을 분리한 후 isopropanol를 첨가하고 원심분리 하였다. 침전된 DNA를 DNA rehydration solution에 용해한 후, UV spectrophotometer를 이용하여 260 nm 흡광도에서 정량하였다.

5) reverse transcription - polymerase chain reaction 및 real-time PCR

합성된 cDNA를 주형으로 RT-PCR과 real-time PCR를 실시하여 gene transcript들을 분석하였다(Table 2 & 3). mRNA의 양은 GAPDH mRNA 비율로 정량 분석 하였다. 미토콘드리아의 DNA copy 수는 분리된 DNA를 주형으로 real-time PCR을 실시하여 COX I DNA/TFAM DNA 비율로 정량 분석하였다. 모든 real-time PCR은 Rotor-Gene Q(QIAGEN, Germany)을 이용하여 3배수로 진행되었다. RT - PCR를 통해 얻은 증폭산물을 1.5 % agarose gel 상에서 50 mV, 40분간 전기 영동하여 확인하고, 그 결과를 image analyzer(Bio-Rad, USA)와 Quantity One Software(Bio-Rad)를 사용하여 분석하였다. Real time - PCR은 fluorescent emission data 를 이용하여 분석하였다. Critical threshold(CT)값을 이용하여 각각의 유전자에 대한 mRNA를 정량화하였고 ΔT 는 측정하고자 하는 유전자의 C_T 에서 GAPDH C_T 를 빼줌으로써 계산되었다. 측정하고자 하는 유전자의 상대적 발현율은 $2^{-\Delta T}$ 를 이용하여 계산되었으며, 임의 단위(arbitrary unit)로 나타내었다. GAPDH에 대한 C_T 값은 서로 다른 유전 형태와 트레이닝에 의해 변하지 않았음을 확인하였다.

Table 2. Sequence of PCR primers

Gene		Sequence (5'→3')	Product (bp)
HIF-1 α	Sense	CAT GGT AGC CAC AAT TGC AC	139
	Antisense	ACA GCT TCA TGA TCC AGC CT	
Glut-4	Sense	ACT CTT GCC ACA CAG GCT CT	148
	Antisense	CCT TGC CCT GTC AGG TAT GT	
PFK μ	Sense	CAG ATC AGT GCC AAC ATA ACC AA	155
	Antisense	CGG GAT GCA GAG CTC ATC A	
PGC1 α	Sense	CAA TGA ATG CAG CGG TCT TA	198
	Antisense	GTG TGA GGA GGG TCA TCG TT	
TFAM	Sense	GTC CAT AGG CAC CGT ATT GC	204
	Antisense	CCC ATG CTG GAA AAA CAC TT	
COX1	Sense	ATT CCT TCA TGT CGG ACG AG	228
	Antisense	ACT GAG AAG CCC CCT CAA AT	
COX4	Sense	AGC TGA GCC AAG CAG AGA AG	140
	Antisense	AAT CAC CAG AGC CGT GAA TC	
CS	Sense	GTT AGC TGG AGA CGC TTT GG	158
	Antisense	AGA GGC CTG GAA GGA AAC AT	
CA3	Sense	CAC ACT TTG ACC CAT CAT GC	129
	Antisense	AGC TCA CAG TCA TGG GCT CT	
MCT-1	Sense	GGT GTC ATT GGA GGT CTT GGG	90
	Antisense	GGC CAA TGG TCG CTT CTT G	
CuZnSOD	Sense	GAC AAA CCT GAG CCC TAA G	168
	Antisense	CGA CCT TGC TCC TTA TTG	
MnSOD	Sense	ATG TCT GTG GGA GTC CAA	164
	Antisense	TGA AGG TGA TAA GCG TGC TC	
GAPDH	Sense	CGT GCC GCC TGG AGA AAC C	144
	Antisense	TGG AAG AGT GGG AGT TGC TGT TG	

Table 3. PCR condition

temperature	Time	Cycle
50 ℃	2 min	1 cycle
95 ℃	10 min	1 cycle
95 ℃	15 sec	
59-61 ℃	20 sec	40 cycles
72 ℃	30 sec	
72 ℃	10 min	1 cycle

6) 광학현미경 시료

골격근을 적출하여 0.1 M phosphate buffer(PBS, pH 7.4)으로 조정된 10 % formalin으로 4℃에서 24시간 고정한 후 흐르는 물로 12시간 세척하였다. Ethanol 농도 상승 순으로 탈수하고 xylene으로 치환시킨 후 paraffin으로 포매하여 2~3 μ m 두께로 절편을 만들어 hematoxylin과 eosin으로 이중 염색하여 광학현미경으로 조직을 관찰하였다.

7) 전자현미경 시료

투과전자 현미경 시료는 광학 현미경 시료와 동일한 방법으로 골격근을 적출한 후 0.1 M phosphate buffer(PBS, pH 7.4)으로 조정된 2.5 % glutaraldehyde로 4 ℃에서 2시간 전고정한 후 PBS로 20분간 2번 세척하였다. 후고정은 1 % osmium tetroxide로 90분간 실시하였고 PBS로 20분간 2번 세척한 후 ethanol 농도 상승 순으로 탈수시켜 propylene oxide로 치환하였다. 포매는 Epon 혼합액을 사용하였고, 열중합 후 초박절편기(Reichert Ultracut E, Germany)를 이용하여 60~70 nm

두께로 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색한 후 JEM-1200EX II형(JEOL, Japan) 투과전자현미경으로 조직을 관찰하였다.

4. 자료 처리

SPSS for windows(version 14.0) 통계 프로그램을 이용하여 측정 항목별로 평균(M)과 표준편차(SD)를 산출하였다. 집단 간 차이를 알아보기 위해 유의수준은 $p < 0.05$ 로 일원 변량분석(one way - ANOVA)을 적용하였으며, 분석 결과 통계적으로 유의한 차이가 있을 경우 Student Newman-Keul 방식에 의해 사후검증을 실시하였다.

III. 결 과

출생 직후부터 간헐적 저산소 환경(13 %, 3,800 m 상당 고도)에서 성장하면서, 출생 10주 후부터 주 3회 10주 동안 20 m/min 속도에서 40분간 treadmill 운동을 실시한 마우스를 대상으로 간헐적 저산소 환경의 노출과 운동에 따른 생체 반응을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 저산소 환경 확인

1) HIF-1 α 발현에 미치는 영향

장기간에 걸친 간헐적 저산소 환경의 노출과 운동이 HIF-1 α 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 골격근에서의 HIF-1 α mRNA 발현을 비교하였다. 저산소 운동군(HE)에서는 HIF-1 α 의 발현이 저산소 비운동군(HC)보다 유의하게($p < 0.01$) 증가하였고, 정상산소 운동군(NE)보다 유의하게($p < 0.05$) 증가하였다. 정상산소 운동군(NE)에서의 발현은 대조군(NC)과 저산소 비운동군(HC)보다 유의하게($p < 0.01$) 증가하였고, 저산소 비운동군(HC)에서는 정상산소 비운동군(NC)보다 증가($p < 0.05$)하였다(Figure 1).

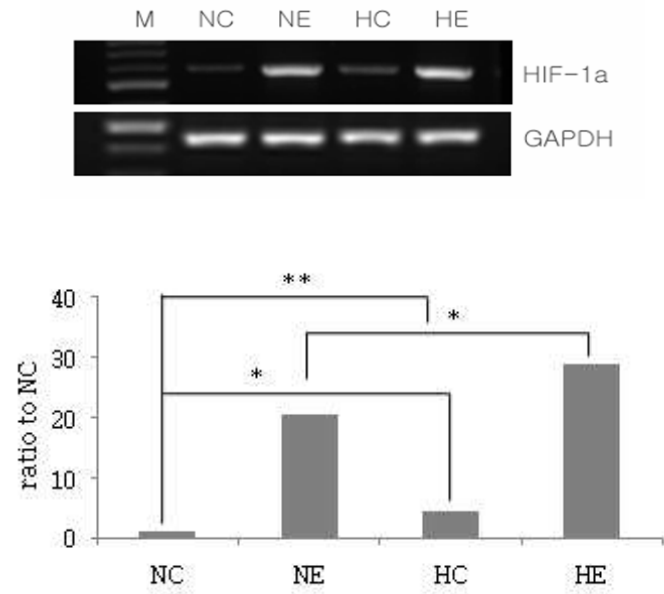


Figure 1. Effects of hypoxia and exercise on HIF-1 α mRNA expression in skeletal muscle. Levels of mRNA were analyzed by PCR after reverse transcription and using densitometer in gastrocnemius muscle from Normoxia Control(NC), Normoxia Exercise(NE), Hypoxia Control(HC), and Hypoxia Exercise(HE) mice groups. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, M, size marker.

2. 항산화 효소 및 항산화능 변화에 따른 활성 산소의 조절

1) 운동과 저산소가 활성 산소 발생에 미치는 효과

장기간에 걸친 간헐적 저산소 환경의 노출과 운동이 활성산소 생성에 미치는 영향을 확인하기 위해 혈중 자유 라디칼을 d-DOM 방법에 의해 측정하였다. 혈중 자유 라디칼 측정값은 대조군이 115 ± 30 Ucarr, 정상산소 운동군 102 ± 18 Ucarr, 저산소 비운동군 111 ± 19 Ucarr, 저산소 운동군 126 ± 67 Ucarr으로 측정되었다. 정상산소 운동군에 비하여 저산소 운동군이 높게 나타났지만, 통계적으로 유의한 차이는 없었으며, 정상산소 운동군과 저산소 비운동군은 오히려 감소하는 경향을 보였다(Fig. 2).

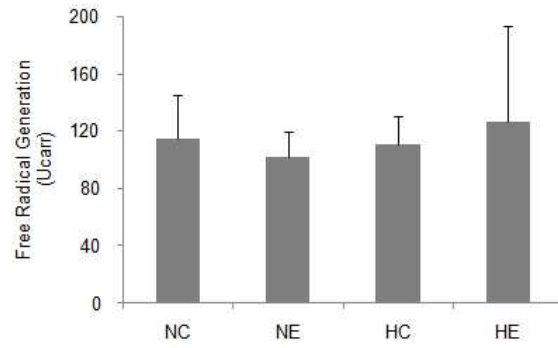


Figure 2. Comparison of free radical generation. Free radical generation was determined using d-DOM method in blood from Normoxia Control(NC), Normoxia Exercise(NE), Hypoxia Control(HC), and Hypoxia Exercise(HE) mice groups.

2) 운동과 저산소가 근육내 항산화 효소에 미치는 영향

장기간에 걸친 간헐적 저산소 환경의 노출과 운동이 근육내 항산화 효소에 미치는 효과를 확인하기 위해 CuZnSOD와 MnSOD의 mRNA 발현을 확인하였다. CuZnSOD mRNA 발현은 NC를 100 %로 하여 다른 군들과 비교했을 때, NE는 209 %, HC 220 %, HE 163 %로서 정상산소 운동군과 저산소 비운동군은 대조군보다 높은 발현량을 보였으며 저산소 운동군은 대조군보다 높은 발현량을 보였으나 저산소 비운동군과 정상산소 운동군 보다는 낮은 발현량을 보였다, 이는 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig. 3-A). MnSOD mRNA 발현은 NC를 100 %로 하여 다른 군들과 비교했을 때, NE는 209 %, HC 187 %, HE 111 %로서 정상산소 운동군과 저산소 비운동군은 대조군보다 높은 발현량을 보였으며 저산소군 운동군은 대조군보다 높은 발현량을 보였으나 저산소 비운동군과 정상산소 운동군 보다는 낮은 발현량을 보였다, 이는 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig. 3-B).

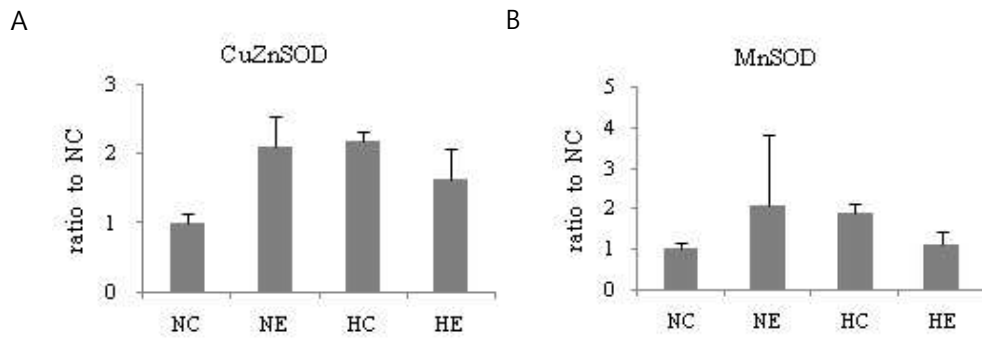


Figure 3. Effects of hypoxia and exercise on CuZnSOD mRNA(A) and MnSOD mRNA(B) expression in skeletal muscle. Levels of mRNA were analyzed by PCR after reverse transcription and using densitometer in gastrocnemius muscle from Normoxia Control(NC), Normoxia Exercise(NE), Hypoxia Control(HC), and Hypoxia Exercise(HE) mice groups.

3) 운동과 저산소가 혈청내 항산화능에 미치는 영향

장기간에 걸친 간헐적 저산소 환경의 노출과 운동이 항산화능에 미치는 영향을 확인하기 위해 혈청내 항산화능을 BAP test에 의해 측정하였다. 혈청내 항산화능 측정값은 대조군은 2038 ± 162 uM, 정상산소 운동군은 2469 ± 378 uM, 저산소 비운동군은 2076 ± 316 uM, 저산소 운동군은 2320 ± 312 uM으로 측정되었다. 운동한 그룹이 비운동 그룹보다 유의하게($p < 0.05$) 높았으며 저산소 환경에의 노출에 따른 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 4).

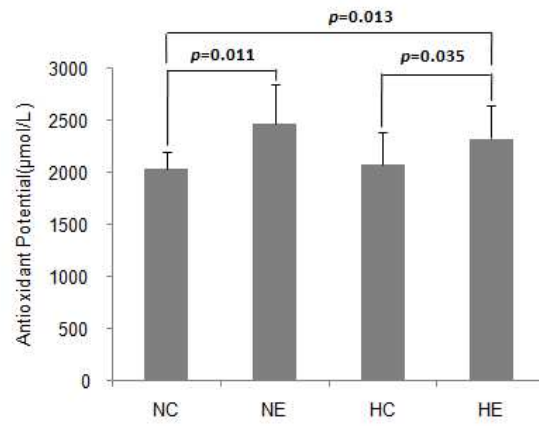


Figure 4. Comparison of antioxidant potential. Antioxidant potential was determined using BAP test in blood from Normoxia Control(NC), Normoxia Exercise(NE), Hypoxia Control(HC), and Hypoxia Exercise(HE) mice groups.

3. 운동과 저산소가 당 대사에 미치는 영향

1) 해당과정에 관여하는 유전자의 발현

장기간에 걸친 간헐적 저산소 환경의 노출과 운동이 근육내 당 대사에 미치는 영향을 확인하기 위해 골격근에서의 GLUT4와 PFKm의 mRNA 발현을 비교하였다. GLUT4 mRNA 발현은 NC를 100 %로 하여 다른 군들과 비교했을 때, NE는 287 %, HC 424 %, HE 224 %로서 정상산소 운동군과 저산소 비운동군은 대조군보다 높은 발현량을 보였으며($p < 0.05$), 저산소 운동군은 대조군보다 높은 발현량을 보였지만 저산소 비운동군과 정상산소 운동군 보다는 낮은 발현량을 보였으며, 통계적 의의는 없었다(Fig. 5-A). PFKm mRNA 발현은 NC를 100%로 하여 다른 군들과 비교했을 때, NE는 146 %, HC 133 %, HE 111 %로서 정상산소 운동군과 저산소 비운동군은 대조군보다 높은 발현량을 보였으며 저산소 운동군은 대조군보다 높은 발현량을 보였지만 저산소군과 정상산소 운동군 보다는 낮은 발현량을 보였으며 통계적 의의는 없었다(Fig. 5-B).

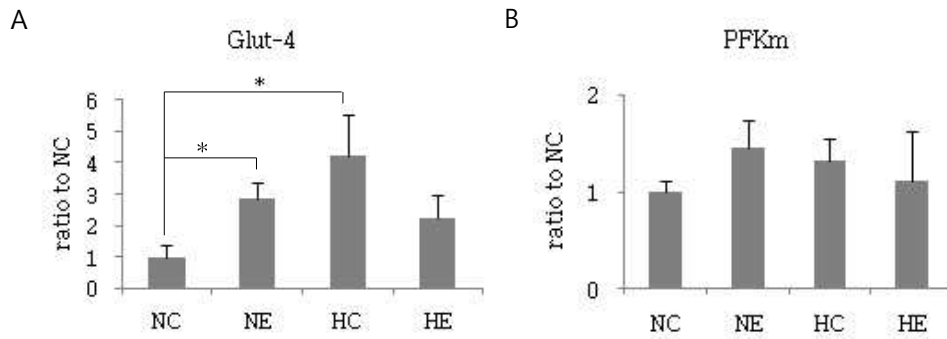


Figure 5. Effects of hypoxia and exercise on GLUT4 mRNA(A) and PFKm mRNA(B) expression in skeletal muscle. Levels of mRNA were analyzed by PCR after reverse transcription and using densitometer in gastrocnemius muscle from Normoxia Control(NC), Normoxia Exercise(NE), Hypoxia Control(HC), and Hypoxia Exercise(HE) mice groups. * $p < 0.05$.

2) 젖산 대사에 미치는 영향

장기간에 걸친 간헐적 저산소 환경의 노출과 운동이 근육내 젖산 대사에 미치는 영향을 확인하기 위해 골격근에서의 CA3와 MCT-1의 mRNA 발현을 비교하였다. CA3 mRNA 발현은 NC를 100 %로 하여 다른 군들과 비교했을 때, NE는 153 %, HC 144 %, HE 171 %로서 정상산소 운동군, 저산소 비운동군과 저산소 운동군은 대조군 보다 발현량이 유의하게($p < 0.05$) 높았다(Fig. 6-A). MCT-1 mRNA 발현은 NC를 100 %로 하여 다른 군들과 비교했을 때, NE는 363 %, HC 694 %, HE 409 %로서 정상산소 운동군, 저산소 비운동군과 저산소 운동군은 대조군보다 높은 발현량을 보였으며 저산소 비운동군은 대조군 보다 유의하게($p < 0.05$) 높았다(Fig. 6-B).

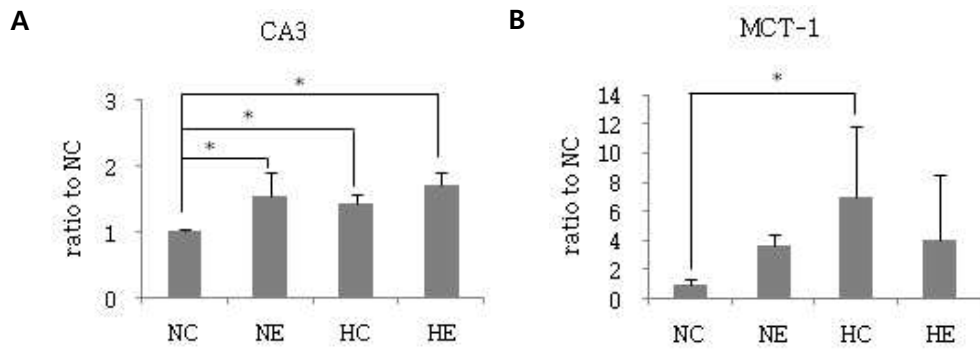


Figure 6. Effects of hypoxia and exercise on CA3 mRNA(A) and MCT-1 mRNA(B) expression in skeletal muscle. Levels of mRNA were analyzed by PCR after reverse transcription and using densitometer in gastrocnemius muscle from Normoxia Control(NC), Normoxia Exercise(NE), Hypoxia Control (HC), and Hypoxia Exercise(HE) mice groups. * $p < 0.05$.

4. 운동과 저산소가 미토콘드리아에 미치는 영향

1) 근육의 형태학적 관찰

장기간에 걸친 간헐적 저산소 환경의 노출과 운동에 의한 근육의 조직학적 변화를 확인하기 위해 골격근을 분리하여 광학현미경과 전자현미경을 통하여 미세구조를 관찰하였다. 광학현미경을 이용한 H&E 표본 관찰에서는 각 군간의 차이를 관찰할 수 없었다(Fig. 7). 전자현미경적 관찰에서는 경우 대조군은 미토콘드리아의 구조가 정상이고 크리스테(cristae)가 잘 발달되어있었다. 정상산소 운동군은 대조군에 비하여 미토콘드리아의 크기가 작아진 반면 개수가 많아졌으며, 크리스테가 더 발달하였다. 저산소군은 정상산소 운동군과 비슷한 양상을 보여주지만 미토콘드리아의 수와 크기가 모두 증가하는 경향을 나타내었다. 저산소 운동군은 대조군과 유사한 양상을 보여주고 있지만 미토콘드리아의 크기가 약간 증가하는 경향을 보였다. 그러나 각 그룹간의 명확한 차이를 확인할 수 없었다(Fig. 8).

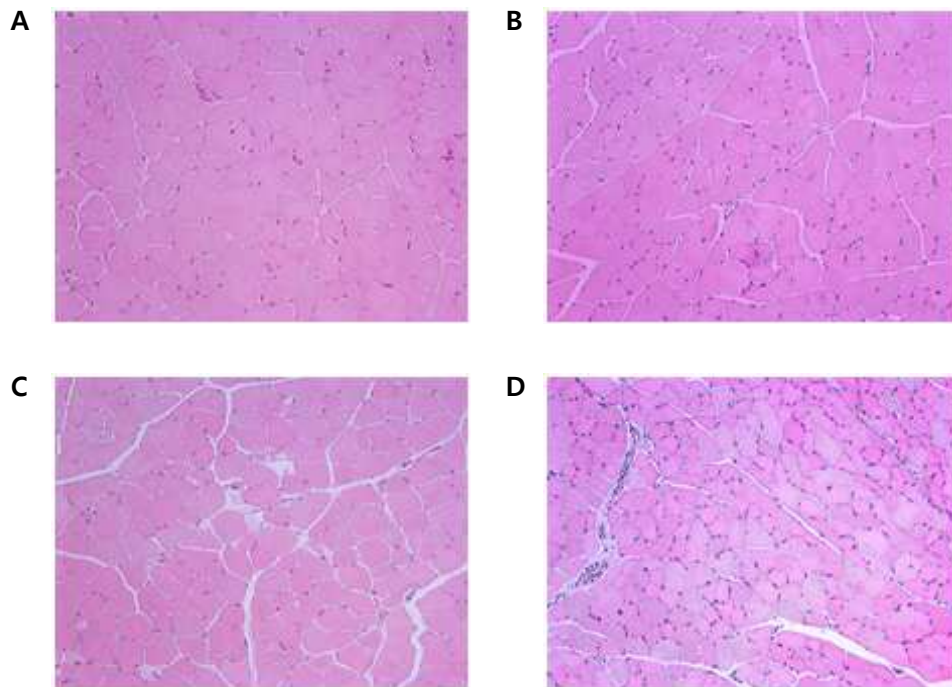


Figure 7. Light micrograph of skeletal muscle section in Normoxia Control(A), Normoxia Exercise(B), Hypoxia Control(C), and Hypoxia Exercise(D) mice groups(X 200).

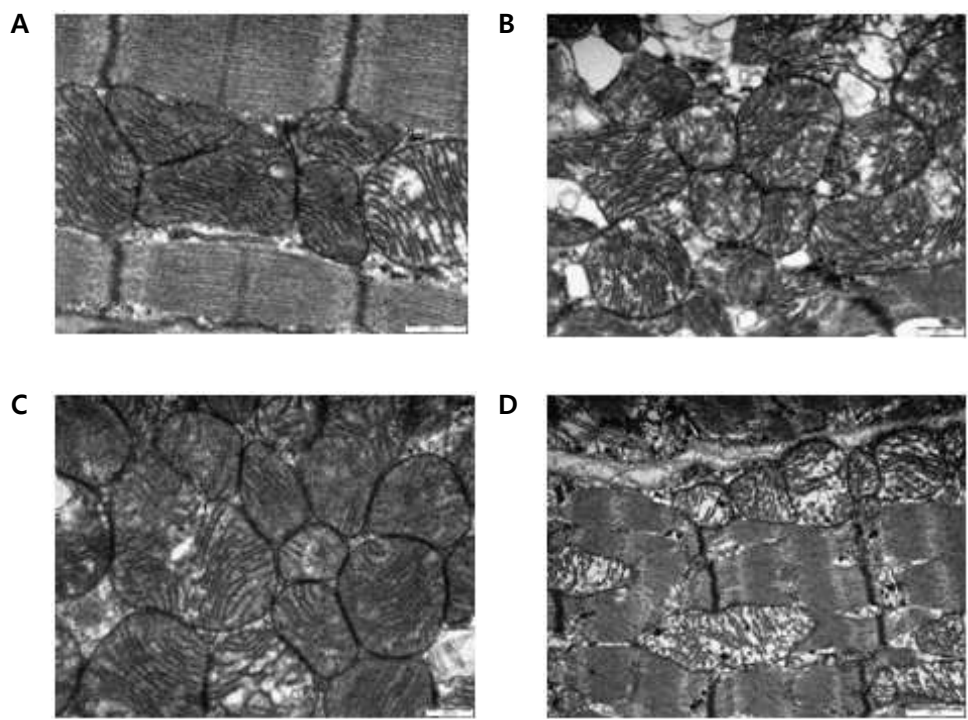


Figure 8. Electron micrograph of skeletal muscle section in Normoxia Control(A), Normoxia Exercise(B), Hypoxia Control(C), and Hypoxia Exercise (D) mice groups(Scale bar : A, B, C = 500 nm, D = 200 nm).

2) 운동과 저산소가 미토콘드리아 생성에 미치는 영향

장기간에 걸친 간헐적 저산소 환경의 노출과 운동이 미토콘드리아 생성에 미치는 효과를 확인하기 위해 PGC1 α 와 TFAM의 mRNA 발현을 확인하였다. PGC1 α mRNA 발현은 NC를 100 %로 하여 다른 군들과 비교했을 때, NE는 237 %, HC 332 %, HE 181 %로서 정상산소 운동군과 저산소 비운동군은 대조군 보다 높은 발현량을 보였으며 저산소 운동군은 대조군 보다 높은 발현량을 보였으나 저산소 비운동군과 정상산소 운동군 보다는 낮은 발현량을 보였다. 또한 저산소 비운동군은 대조군 보다 유의하게($p < 0.05$) 높았다(Fig. 9-A). TFAM mRNA 발현은 NC를 100 %로 하여 다른 군들과 비교했을 때, NE는 1031 %, HC 1244 %, HE 830 %로서 정상산소 운동군과 저산소 비운동군은 대조군 보다 높은 발현량을 보였으며 저산소 운동군은 대조군 보다 높은 발현량을 보였으나 저산소 비운동군과 정상산소 운동군 보다는 낮은 발현량을 보였다. 또한 저산소 비운동군은 대조군 보다 유의하게($p < 0.05$) 높았다(Fig. 9-B).

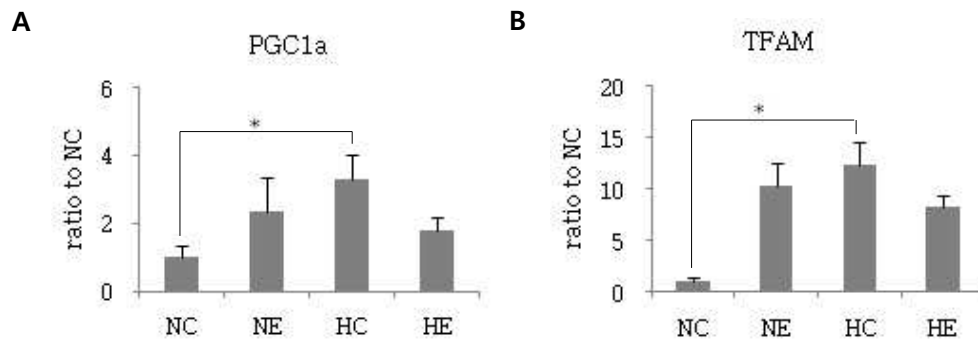


Figure 9. Effects of hypoxia and exercise on PGC1a mRNA(A) and TFAM mRNA(B) expression in skeletal muscle. Levels of mRNA were analyzed by PCR after reverse transcription and using densitometer in gastrocnemius muscle from Normoxia Control(NC), Normoxia Exercise(NE), Hypoxia Control(HC), and Hypoxia Exercise(HE) mice groups. * $p < 0.05$.

3) 근육내 미토콘드리아 copy 수 측정

장기간에 걸친 간헐적 저산소 환경의 노출과 운동이 근육내 미토콘드리아의 copy 수에 미치는 영향을 확인하기 위해 근육내 미토콘드리아 copy 수를 총 DNA 대비 미토콘드리아 DNA의 비율을 비교하여 real time PCR 로 측정하였다. 정상산소 운동군과 저산소 비운동군은 대조군보다 유의적($p < 0.05$)으로 높은 copy 수를 보였으나 저산소 운동군은 저산소 비운동군보다 유의적($p < 0.05$)으로 낮은 copy 수를 나타냈다. 대조군과 저산소 운동군 간의 유의한 차이는 없었다(Fig. 10).

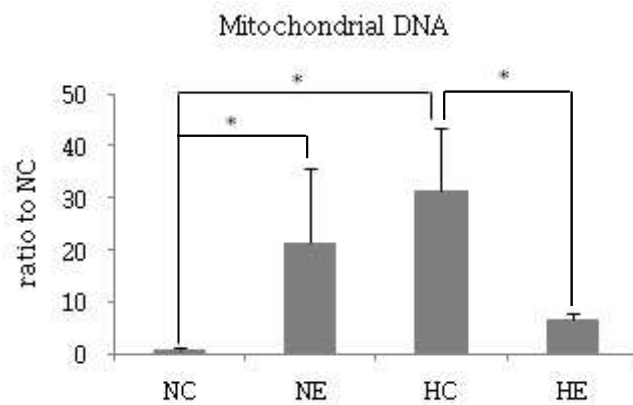


Figure 10. Effects of hypoxia and exercise on mitochondrial copy number in skeletal muscle. Levels of mitochondrial copy number were analyzed by real time PCR by comparing mitochondrial DNA concentration in total DNA in gastrocnemius muscle from Normoxia Control(NC), Normoxia Exercise(NE), Hypoxia Control (HC), and Hypoxia Exercise(HE) mice groups. * $p < 0.05$.

4) 운동과 저산소가 미토콘드리아 활성화에 미치는 영향

장기간에 걸친 간헐적 저산소 환경의 노출과 운동이 미토콘드리아 활성화에 미치는 효과를 확인하기 위해 COX4와 CS의 mRNA 발현을 확인하였다. COX4 mRNA 발현은 NC를 100 %로 하여 다른 군들과 비교했을 때, NE는 123 %, HC 101 %, HE 102 %로서 정상산소 운동군은 대조군 보다 높은 발현량을 보였으나 저산소 비운동군과 저산소 운동군은 차이가 없었다(Fig. 11-A). CS mRNA 발현은 NC를 100 %로 하여 다른 군들과 비교했을 때, NE는 511 %, HC 304 %, HE 147 %로서 정상산소 운동군과 저산소 비운동군은 대조군 보다 높은 발현량을 보였으며 저산소군 운동군은 대조군 보다 높은 발현량을 보였으나 저산소 비운동군과 정상산소 운동군 보다는 낮은 발현량을 보였다(Fig. 11-B)

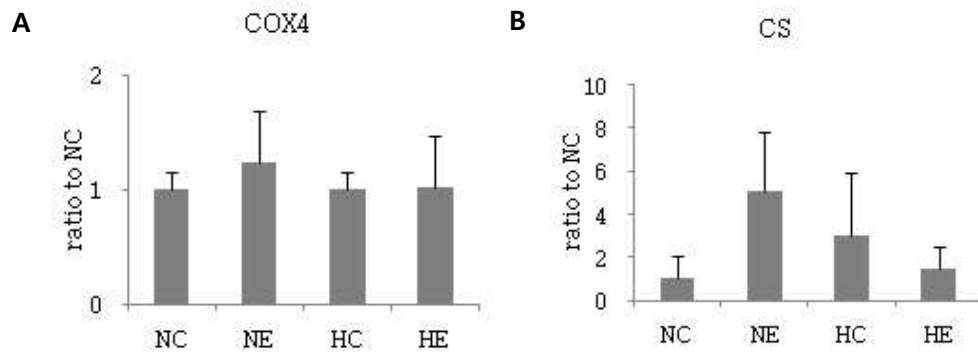


Figure 11. Effects of hypoxia and exercise on COX4 mRNA(A) and CS mRNA(B) expression in skeletal muscle. Levels of mRNA were analyzed by PCR after reverse transcription and using densitometer in gastrocnemius muscle from Normoxia Control(NC), Normoxia Exercise(NE), Hypoxia Control (HC), and Hypoxia Exercise(HE) mice groups.

IV. 고 찰

유기체는 항상 산화 스트레스에 노출되어 있는 반면, 산화에 의한 조직손상으로 부터 스스로를 보호하기 위한 항산화 방어기전을 가지고 있어 활성산소를 제거하거나 활성을 억제 시킨다²⁾. 골격근 내의 SOD 활성이 운동 후에 상당히 증가한다고 보고해 왔으며 조직에서 항산화 방어체계는 운동 상태에 따라 조절되는 것으로 보인다. 하지만 항산화 효소에 대한 운동 효과에 관한 일치된 결론을 얻지 못하였다^{11,12,13,14,15,16)}.

이에 본 연구는 저산소 상태와 운동이 활성 산소 생성과 항산화능에 미치는 영향을 알아보기 위해 13 %의 산소(해발 3,800m 상당고도) 조건에서 장기간 생활하면서 적응된 후 21 %의 산소(해수면 상당고도) 조건에서 운동하는 hypoxia exercise 그룹과 21 % 산소 조건에서 생활 및 운동하는 normoxia exercise 그룹, 13 % 산소 조건에서 생활하며 운동은 하지 않는 hypoxia control 그룹과 21 % 산소 조건에서 생활하며 운동은 하지 않는 normoxia control 그룹으로 나누어 실험을 수행, 산소 농도와 운동 여부에 따른 활성산소의 생성과 해당작용, 미토콘드리아의 생성 및 활성을 비교 분석하여 저산소 환경과 운동에 대한 생체의 적응 반응을 알아보려고 하였다.

산소농도는 고도에 관련된 산소량을 기준으로 하였는데 Baird & McAninch는 해발 고도 4,000 m 이상에서는 세포에 부정적 효과를 나타남을 보고하였고²⁶⁾, Schmidt 등은 일반인과 운동선수를 대상으로 한 연구에서 2,600 m 상당 고도에서의 훈련 후에 Hb와 Hct에서 유의한 변화가 나타나지 않아, 2,600 m의 고도는 조혈(erythropoietic) 시스템에 충분한 자극을 주지 못하는 것으로 판단하였다²⁷⁾. 따라서 충분한 자극이 되면서 저산소의 단점을 최대한 보호하기 위해 해발 3,800 m 수준인 산소농도 13 %(PiO_2 : 90 mmHg)²⁸⁾의 상태로 저산소 자극을 시행하였다.

간헐적 저산소 환경이란 수분에서 수일간 저산소 상태에 일회 이상 반복해서 노출하는 것으로 반복 노출 사이에는 저산소 상태보다 높거나 정상적인 산소농도

(해수면 산소농도) 상태로 회복되는 것을 말한다. 반복적인 저산소 상태는 자극이 제거된 상태에서도 신체반응이 정상으로 회복되지 않고 재자극이 주어지면 더 쉽고 빠르게 자극에 반응하는 이력현상(hysteresis)이나 기억효과를 유발하여, 시냅스 등의 구조나 세포신호 전달 체계처럼 기초적인 과정에도 영향을 미치게 된다²⁹⁾. 운동과 관련된 신체의 반응이 일련의 저산소에 대한 신체의 보상반응(항상성 유지 반응)이라는 관점에서 저산소 노출에 대한 반응의 기전 연구는 항상성 유지 기전 및 병적 상태 조절기전을 밝히기 위한 기초 연구로 활발히 진행되고 있다. 하지만 지속적으로 저산소 환경에 노출되는 것은 면역체계의 강화와 혈액학적으로 산소섭취 및 전달률을 높이는 점에서는 긍정적이나 저산소 자체에 의한 부정적인 영향 즉, 만성 염증으로 인한 신체의 기능 저하, 지속적인 고혈압과 폐동맥의 비대, 및 감소된 혈장량이 신장의 호흡성 알칼리증 보상 과정에 미치는 영향 등을 배제할 수 없고³⁰⁾ 출생 직후부터의 저산소 노출은 신경학적 발달과 장기의 발육과정에 역효과를 일으킬 수 있다는 점을³¹⁾ 간과할 수 없다. 이에 본 연구에서는 출생 직후부터 간헐적인 저산소에 장기간에 걸쳐 노출시키는 방식으로 지속적인 저산소 자극보다 완화된 환경이지만 반복적인 저산소 환경을 만들어 지속적 자극원으로 이용해 보았다.

운동시 지방대사가 탄수화물대사를 초과하여 운동 에너지 생성의 주원료로 사용되는 시점이 20분 이후이므로³²⁾ 지방대사와 관련된 운동의 긍정적인 효율성은 30분 이상의 운동을 할 때로 평가할 수 있다. 본 연구에서는 간헐적인 저산소 자극을 운동효과와 견주기 위해 30분씩 저산소 자극을 주는 것으로 시행하였다. 간헐적 저산소 자극의 최적 효과 기준은 규정된 바 없다. 본 실험에서는 저산소 농도에서 다시 해수면 상태로(21 %) 자연 복구되는 시간인 2시간의 간격으로 재 자극을 시도 하였으며, 고도 4,000 m 이상에서는 세포에 부정적 효과가 강하게 나타내고, 2,600 m 이하에서는 조혈 시스템에 충분한 자극이 못 된다는 연구들에^{26,27)} 따라 충분한 자극이 되면서 저산소의 부정적 효과가 나타나지 않는 해발 3,800 m 수준인 산소농도 13 %의 상태로 저산소 자극을 시행하였다. 또한 본 연구의 적절한 저산소 환경을 확인하기 위하여, 저산소 환경에서 발현하는 가장 대표적인 전

사인자인 Hypoxia inducible factor의 발현을 보았다. Hypoxia inducible factor 중 HIF-1 α 는 저산소 상태에서 외부의 산소농도 변화에 반응하여 해당과정과 혈관 신생과정 등을 유도하는 것으로 알려져 있다. 정상산소 상태 노출시 HIF-1 α 는 수분내 ubiquitin proteasome pathway에 의하여 분해되는 것으로 알려져 있다³³⁾. 본 연구에서는 반복 운동이나 간헐적 저산소 환경의 장기 노출시 골격근에서 HIF-1 α mRNA의 발현이 유도 되는 것으로 나타났고 이는 본 연구가 저산소 환경에서 실험이 적절히 시행 되었다는 증거가 되겠다. 이러한 HIF-1 α mRNA의 증가는 HIF-1 α 의 번역(translation)과 HIF-1 α dependent pathway의 활성화 가능성을 시사할 수 있으며 이로 인하여 저산소와 관련된 운동시의 근육의 순응에 관여할 수도 있을 것이다.

신체 활동시에는 자유 라디칼이 안정시 이상으로 증가한다는 사실이 확인되어 있으며^{7,8)} 신체 활동에 의해 증가한 자유 라디칼이 생체에 악영향을 줄 가능성도 있지만 생체는 자유 라디칼을 소거 및 불활성화 시켜 생체 성분에 손상을 최소화하여 억제하는 항산화 능력을 갖추고 있다. 또한 지속적인 신체 활동은 항산화 능력의 향상을 촉진시킨다는 보고도 있다³⁴⁾. 하지만 항산화 효소의 활성화에 관한 명확한 기전은 분명하지 않으며 또한 이에 대한 운동 효과에 관한 일치된 결론을 얻지 못하였다.

본 연구에서는 장기간에 걸친 간헐적 저산소 환경의 노출과 운동이 활성산소 생성에 미치는 영향을 확인하기 위해 우선 혈중 자유 라디칼을 d-DOM 방법에 의해 측정하였다. 정상대기 운동그룹에 비하여 저산소 운동그룹이 미세하게 높게 나타났고, 운동군과 저산소군은 오히려 감소하였으나, 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. 즉 반복운동이나 간헐적 저산소 환경의 장기 노출시 자유 라디칼 발생이 줄어들 것이라고 생각할 수 있지만 실험 결과 산소 농도에 따른 자유 라디칼 발생량의 차이는 확인할 수 없었다. 이 결과는 일련의 순응과정을 통하여 자유 라디칼 생성이 조절되었지 않았을까 하여 장기간에 걸친 간헐적 저산소 환경의 노출과 운동이 근육내 항산화 효소에 미치는 효과를 확인하기 위해 내인성 항산화 효소인 Superoxide Dismutase 중 세포질내 존재하며 활성산소 발생을 억제하는

CuZnSOD mRNA³⁵⁾와 미토콘드리아내 존재하며 superoxide radical 의 축적을 억제하는 MnSOD mRNA³⁶⁾ 발현을 확인하였다.

CuZnSOD 와 MnSOD mRNA 발현은 정상산소 운동군과 저산소군은 대조군보다 다소 높은 발현량을 보였다. 또한 혈청내 항산화능을 BAP test에 의해 측정하였는데 운동한 그룹이 비운동 그룹보다 통계학적으로 유의하게 높았으며 산소 농도에 의해서는 통계적으로 유의한 차이는 없었으나 저산소군이 대조군보다는 높은 수치를 보였다. 즉 반복적인 운동과 간헐적 저산소 환경의 장기간 노출시 일련의 순응과정이라고 할 수 있는 항산화능 증가와 항산화 효소의 증가로 자유 라디칼 증가를 조절할 수 있으리라고 생각된다.

정상에서는 93 %의 에너지가 산소대사에 의해 생성되는데 저산소 상태에서는 84 %의 에너지만 유산소성 에너지대사를 통해 생성 된다³⁷⁾. 즉 저산소성 상태에서는 무산소성 에너지 생성이 증가하여 상대적으로 젖산의 생성율이 증가하게 된다. 운동 시 증가하는 젖산은 무산소성 에너지를 생성하기 위해 미토콘드리아에서 ATP-PC 시스템과 해당과정이 진행될 때 형성되는 부산물이다. 이 과정에서 발생하는 젖산은 세포내에서 젖산염으로 신속하게 전환되어 운동 직후에 혈액검사를 통해 젖산염을 채취하여 분석하면 그 증가 정도로 운동 수행 능력을 예측할 수 있다³⁸⁾.

장기간에 걸친 간헐적 저산소 환경의 노출과 운동이 근육내 해당과정에 미치는 영향을 확인하기 위해 골격근에서 당 수송체(glucose transporter) 역할을 하는 막 단백질(membrane protein)인 GLUT4와 해당과정을 촉진하는 PFKm의 mRNA 발현을 보았는데, 정상산소 운동군과 저산소군은 대조군보다 높은 발현량을 보였으며 저산소군 운동군 또한 대조군보다 높은 발현량을 보여 해당과정이 증가됨을 보여주고 있으며, 이로 인한 젖산의 생성율이 증가됨을 예상할 수 있겠으나 이전의 연구에서 운동 직후 젖산염 증가량의 비교에서는 운동군과 간헐적 저산소 노출 운동 병행군이 일회 운동한 비교군과 간헐적 저산소군에 비해 유의하게 낮았다 ($p < 0.05$)³⁹⁾ 고 보고하여, 반복적인 장기간의 운동과 간헐적 저산소 환경의 노출시 젖산 대사에 미치는 영향을 살피기 위하여, 젖산 분해 효소인 CA3 mRNA

와 젖산 transporter 인 MCT-1의 근육내 발현을 측정하였는데, CA3는 운동과 저산소 환경에의 노출에 의해 모두 발현이 유의적으로 증가되었고 MCT-1역시 저산소 비운동군에서 mRNA의 발현이 통계학적으로 유의하게 증가되었다. 즉 반복적인 운동과 간헐적 저산소에 장기간 노출시 해당과정 증가로 인해 형성된 젖산 또한 분해효소와 수송체(transporter) 등에 의하여 조절되는 순응 과정을 보여준다.

미토콘드리아는 세포호흡 반응으로 적당한 기질을 사용하여 그 산화에 따라 에너지원인 ATP를 생산하며, 보통 세포에는 1개 에서 수천 개의 미토콘드리아가 있는데, 에너지를 다량으로 필요로 하는 세포일수록 많이 가지고 있다. 평상시 훈련이 되지 않은 상태의 개체에서 운동 훈련에 의해 citrate synthase의 활성과 근육의 혈관비율 증가, 근육의 fiber의 증가, 미토콘드리아의 수적 증가를 일으킨다^{40,41,42}). 따라서 운동과 더불어 간헐적 저산소 상태의 노출에 의해서도 미토콘드리아의 형태학적 기능적, 수적 변화가 예상되어 이들의 변화를 분석하였다. 우선 근육의 형태학적 관찰을 하였는데 200배에서 관찰한 광학 현미경상의 근육의 크기나 모세 혈관의 증가 등의 형태학적 변화는 뚜렷이 없었으며, 전자 현미경에서는 다소의 미토콘드리아의 수 및 Crista의 증가가 관찰되었으나 명확하지는 않았다. 골격근에서 미토콘드리아의 생성을 촉진시키는 PGC1 α mRNA와 DNA 에 의해 합성되어 미토콘드리아 생성과 활성을 조절하는 TFAM mRNA의 발현을 측정 하였는데 비교군과 대비하여 정상 운동군과 저산소군들에서의 발현 증가가 관찰되어 미토콘드리아의 생성에 관련된 유전자의 활성화를 증명하였다. 또한 real-time PCR 을 사용하여 total DNA 수 대비 미토콘드리아 DNA concentration을 비교하여 근육내 미토콘드리아 copy 수를 측정 하였더니 대조군 대비 모든 군에서 현격히 증가되었으며 정상산소 운동군과 저산소 비운동군에는 대조군과 비교하여 유의적으로 증가되었음을 확인 가능하였다. 미토콘드리아의 생성 증가는 틀림없이 근육의 기능 강화에는 필수적이거나 그것만으로는 얼마나 극대화된 유산소 운동 능력에 기여하는지는 의문점으로 남는다. 정기적인 운동이 COX4 증가 등의 미토콘드리아 기능을 증가시켜 산화 손상을 저하시키며⁴³), 미토콘드리아의 기능의 증가

가 산화관련 질병을 감소시킨다고 보고되었¹⁸⁾, 쥐에서 COX4의 억제가 산소 흡수를 저하시킨다는 보고와⁴⁴⁾, 운동은 미토콘드리아의 기능과 최대산소 흡수량을 최대화 시킨다는 보고와⁴⁵⁾ 같이 미토콘드리아의 기능 또한 중요한 인자이다. 이를 촉진하는 COX4 와 CS mRNA의 발현을 관찰하였는데, 둘 다 발현이 정상산소 운동군과 저산소군들에서 비교군에 비해 증가하는 경향을 확인할 수 있어 비록 형태학적 관찰에서는 미토콘드리아의 변화를 관찰할 수 없었지만 미토콘드리아의 기능적 활성을 확인할 수 있었다.

V. 결 론

본 연구는 장기간에 걸친 간헐적 저산소 환경에의 노출과 운동이 유발하는 생체적 변화에 대해 연구한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 간헐적 저산소 환경의 노출과 운동이 골격근에서 HIF-1 α mRNA의 발현을 유도하였다.
2. 활성산소 생성에 미치는 영향을 확인해 본 결과 운동 후 증가되지 않았다.
3. 골격근 내의 항산화 효소에 미치는 영향을 확인하기 위해 CuZnSOD와 MNSOD mRNA 발현을 확인해 본 결과 정상산소 운동군과 저산소군에서 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다.
4. 항산화능에 미치는 영향을 확인하기 위해 혈청내 항산화능을 측정해본 결과 두 운동군에서 유의적으로 증가하였다.
5. 근육내 포도당 대사에 미치는 영향을 확인하기 위해 골격근에서 GLUT4와 PFKm mRNA 발현을 확인해 본 결과 GLUT4는 정상산소 운동군과 저산소 비운동군에서 유의적으로 발현이 증가되었고 PFKm은 정상산소 운동군과 저산소군들에서 증가되는 경향을 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다.
6. 근육내 젖산 대사에 미치는 영향을 확인하기 위해 골격근에서의 CA3와 MCT-1 mRNA 발현을 확인해 본 결과 CA3는 운동과 저산소 환경에의 노출에 의해 모두 발현이 유의적으로 증가되었고 MCT-1 역시 저산소 비운동군에서 mRNA의 발현이 통계학적으로 유의하게 증가되었다.
7. 근육을 전자현미경으로 관찰한 결과 미토콘드리아의 수와 크기가 모두 증가하는 경향을 보였으나 확실한 차이를 관찰할 수는 없었다.
8. 미토콘드리아 생성에 미치는 영향을 확인하기 위해 PGC1 α 와 TFAM의 mRNA 발현을 확인해 본 결과 모두 저산소 비운동군에서 유의적으로 증가하였다.

9. 근육내 미토콘드리아의 copy 수는 정상산소 운동군과 저산소 비운동군에서 두 유의적으로 증가하였다.
10. 미토콘드리아 활성화에 미치는 효과를 확인하기 위해 COX4와 CS mRNA 발현을 확인해 본 결과 정상산소 운동군과 저산소군들에서 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다.

이상의 결과를 종합해 보면 반복된 운동과 간헐적 저산소 상태에 장기간 노출 시에 항산화능이 증가되고, 해당과정 또한 촉진 되며 미토콘드리아의 수적인 증가와 활성화의 증가로 저산소에 의한 조직의 손상을 감소시킬 수 있으리라고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Berglund B. High-altitude training. *Sports Med* 14:289-303, 1992.
2. Friedman B, Rating T, Weller E, Werle E, Eckardt KU, Bartsch P, Mairbaur H. Effects of iron supplementation on total body hemoglobin during endurance training at moderate altitude. *Int J Sport Med* 20:78-85, 1999.
3. Robert SM. Altitude, exercise and immune function. *Exerc Immunol Rev* 11:6-16, 2005.
4. Chapman RF, Stray-Gundersen J, Levine BD. Individual variation in response to altitude training. *J Appl Physiol* 85:1448-1456, 1998.
5. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford, UK: Clarendon Press, 2007.
6. Diem K, Lentner C. *Scientific tables*. Documenta geigy. Basel, Switzerland geigy, 1970.
7. Davied KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer GA. Free radical and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 107:1198-1205, 1982.
8. Vasankari T, Kujala U, Heinonen O, Kapanen J, Ahotupa M. Measurement of serum lipid peroxidation during exercise using three different methods: dinene conjugation, thiobarbituric acid reactive material and fluorescent chromolipids. *Clin Chim Acta* 234:63-69, 1995.
9. Kilbourn JF. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* 105:13029, 1990.
10. Sen CK, Atalay M, Hanninen O. Exercise induced oxidative stress: glutathione supplementation and deficiency. *J Appl Physiol* 77(5):2177-2187, 1994.

11. Higuchi M, Cartier LJ, Chen M, Holloszy JO. Superoxide dismutase and catalase in skeletal muscle: adaptive response to exercise. *J Gerontol* 40:281-286, 1985.
12. Laughlin MH, Simpson T, Sexton WL, Brown OR, Smith JK, Korthuis RJ. Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes and exercise training. *J Appl Physiol* 68(6):2337-2343, 1990.
13. Jackson MJ, Edwards RHT, Symons MCR. Electron spin resonance studies of intact mammalian skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 847:185-190, 1985.
14. Ji LL, Fu RG, Mitchell E. Glutathione and antioxidant enzyme in skeletal muscle; Effect of fiber type and exercise intensity. *J Appl Physiol* 73:1854-1859, 1992.
15. Quintanilha AT. The effect of physical exercise and/or vitamin E on tissue oxidative metabolism. *Biochemical Society Transactions* 12(3):403-404, 1984.
16. Alession HM, Goldfard AH, Cutler RG. MDA content increase in fast- and slow-twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat. *Am J Physiol* 24:C874-C877, 1988.
17. Konig D, Wagner KH, Elmadfa I, Berg A. Exercise and oxidative stress: significance of antioxidants with reference to inflammatory, muscular, and systemic stress. *Exerc Immunol Rev* 7:108-133, 2001.
18. Phino RA, Andrades ME, Oliveira MR, Pirola AC, Zago MS, Silveira PC, Dal-Pizzol Moreira FJC. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol Int* 30: 848-853, 2006.
19. Radak Z, Taylor AW, Ohno H, Goto S. Adaptation to exercise induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc Immunol Rev* 7:90-107, 2001.
20. Senturk UK, Gunduz F, Kuru O, Aktekin MR, Kipmen D, Yalcin O,

- Bor-Kucukatay M, Yesilkaya A, Baskurt OK. Exercise induced oxidative stress affects erythrocyte in sedentary rats but not exercised trained rats. *J Appl Physiol* 91: 1999-2004, 2001.
21. Norrbom J, Sundberg CJ, Amein H, Kraus WE, Jansson E, Gustafsson T. PGC-1alpha mRNA expression is influenced by metabolic perturbation in exercising human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 96:189-194, 2003.
 22. Constable SH, Favier Rj, McLane JA, Fell RD, Chen M, Holloszy JO. Energy metabolism in contracting rat skeletal muscle: adaptation to exercise training. *Am J Physiol* 253:C316-C322, 1987.
 23. Dudley GA, Tullson PC, Terjung RL. Influence of mitochondrial content on the sensitivity of respiratory control. *J Biol Chem* 262:9109-9114, 1987.
 24. Holloszy Jo, Coyle EF. Adaptation of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J Appl Physiol* 56:831-838, 1984.
 25. Gavin TP, Weaterkamp LM, Awetaloot KA: Soleus, plantaris and gastrocnemius VEGF mRNA responses to hypoxia and exercise are preserved in aged compared with young female C57BL/6 mice. *ACTA Physiol*, 188:113-121, 2006.
 26. Baird RE, McAninch GW. High altitude illness. *Am Fam Physician* 39:30-31, 1989.
 27. Schmidt W, Dahners HW, Correa R, Ramirez R, Rojas J, Boning D. Blood gas transport properties in endurance trained athletes living at different altitudes. *Int J Sports Med* 11:15-21, 1990.
 28. Zieliski J. Effects of intermittent hypoxia on pulmonary haemodynamics: animal models versus studies in humans. *Eur Respir J* 25:173-180, 2005.
 29. Powell FL, Garcia N. Physiological effects of intermittent hypoxia. *High Alt Med Biol* 1(2):125-136, 2000.
 30. Frank LP, Nathalie G. Mini review. Physiological effects of intermittent

- hypoxia. *High Alt Medicine Biol* 1:125-36, 2000.
31. Singer D. Neonatal tolerance to hypoxia. A comparative-physiological approach. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 123:221-34, 1999.
 32. Ball-Burnett M, Green H, Houston M. Energy metabolism in human slow and fast twitch fibers during prolonged cycle exercise. *J Physiol* 437:257-67, 1991.
 33. Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 274:6519-6525, 1999.
 34. Miyazaki H, Oh-ishi S, Ookawara T, Kizaki T, Toshinai K, Ha S, Haga S, Ji LL, Ohno H. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol* 84(1-2):1-6, 2001.
 35. Noshita N, Sugawara T, Lewen A, Hayashi T, Chan PH. Copper-zinc superoxide dismutase affects Akt activation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 34:1513-1518, 2003.
 36. Chen Z, Siu B, Ho YS, Vincent R, Chua CC, Hamdy RC, Chua BH. Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 30(11):2281-2289, 1998.
 37. Ling Q, Sailan W, Ran J, Zhi S, Cen L, Yang X et al. The effect of intermittent hypoxia on body weight, serum glucose and cholesterol in obesity mice. *Pak J Biol Sci*, 15:869-75, 2008.
 38. Casas H, Murtra B, Casas M, Ibanez J, Ventura JL, Ricart A, Rodriguez F, Viscor G, Palacios L, Pages T, Rama R: Increased blood ammonia in hypoxia during exercise in humans. *J Physiol Biochem*, 57:303-312, 2001.
 39. Seo HS, Chun KW, Park HS, Choi SJ, Park JY, Jeong SE. The effects of intermittent hypoxic exposure and treadmill exercise on hematological parameters and antioxidant potential in mice. *J Korean Sport Med*

27(2):206-214, 2009.

40. Depalanches D, Hoppeler H, Linossier MT, Denis C, Claassen H, Dormois D, Lacour JR, Geysant A. Effects of training in normoxia and normobaric hypoxia on human muscle ultrastructure. *Pflugers Arch* 425: 263-267, 1993.
41. Geiser J, Vogt M, Billeter R, Zuleger C, Belforti F, Hoppeler H. Training high-living low: changes of aerobic performance and muscle structure with training at simulated altitude. *Int j Sports Med* 22:579-585, 2001.
42. Terrados N, Jansson E, Sylven C, Kaijser L: Is hypoxia a stimulus for synthesis of oxidative enzymes and myoglobin. *J Appl Physiol*, 68(6):2369-2372, 1990.
43. Silva LA, Pinho CA, Scarabelot KS, Fraga DB, Volpato AM, Boeck CR, De Souza CT, Streck EL, Pinho RA. Physical exercise increases mitochondrial function and reduces oxidative damage in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*. 105(6):861-867, 2009
44. McAllister RM, Terjung RL. Acute inhibition of respiratory capacity of muscle reduces peak oxygen consumption. *Am J Physiol Cell Physiol* 259:C889-C896, 1990.
45. Robinson DM, Ogilvie RW, Tullson PC, Terjung RL. Increase peak oxygen consumption of trained muscle requires increased electron flux capacity. *J Appl Physiol* 77:1941-1952, 1994.

Abstract

Effects of exercise and atmospheric oxygen concentration in normobaric environment on the free oxygen radical generation and antioxidant potential

Tae Jin Kim M.D.

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Joo Young Park)

Oxygen environment is essential but oxygen free radicals form as a natural byproduct of the normal metabolism of oxygen and result in tissue oxidative damage. Thus in aerobic organisms there are antioxidant mechanisms that protect and minimize tissue damage by removing, avoiding generation and inactivating the oxygen free radicals and the ROS(reactive oxygen species). Exercise induces transient hypoxia and increases oxygen free radical formation but various compensatory mechanisms to maintain homeostasis can be seen. To evaluate the effects of exercise and atmospheric oxygen concentration in normobaric environment on the oxygen free radical generation and antioxidant potential, new born Balb/C mouse were used. The hypoxic group was isolated before they were 12 hours old and was exposed to 13% oxygen concentration for 30 minutes every 2 hours. The exercise group was trained by treadmill exercise for 40 minutes under the speed of 20m/min in

normoxia environment 3 days a week after 10 weeks of life for 10 weeks. Normoxia control(NC) group was exposed to 21% oxygen and did not exercise. Hypoxia control(HC) group was exposed to intermittent 13% oxygen concentration and did not exercise. Normoxia exercise(NE) group was exposed to 21% oxygen and exercise was done. Hypoxia exercise(HE) group was exposed to intermittent 13% oxygen concentration and exercise was done. Blood and muscle samples were obtained from 20 mice for each of the four groups. Blood concentration were evaluated for free oxygen radical and antioxidant potentials. The effects on energy metabolism were compared by evaluating the augmentation of specific mRNA concentration of glucose metabolism and mitochondrial synthesis.

No statistically significant difference was found in free oxygen radical generation of the four groups. CuZnSOD and MNSOD was increased in NE and HC groups. Antioxidant potential was statistical wise significantly increased in exercise groups. GLUT4 was significantly increased in NE and HC groups and PFKm was increased in NE and both hypoxic groups. CA3 was significantly increased in all of the exercise and hypoxic groups and MCT-1 was significantly increased in HC group. PGA1a and TFAM mRNA levels were significantly increased in HC groups and the number of muscular mitochondrial copy was increased significantly in NE and HC groups. COX4 and CS mRNA levels were increased in NE and hypoxic groups. In conclusion repeated exercise and chronic intermittent hypoxia environment increases antioxidant potentials and facilitates glycolysis and minimizes tissue damage by mitochondrial copy and activation increase.

Key words : Intermittent hypoxia, free oxygen radical, antioxidant potential, antioxidant enzymes, mitochondria, glycolysis