

## 노화 생쥐의 복부지방에서 수영운동에 의한 AMPK와 GLUT4 단백질 변화

이진(한양대학교), 심창섭(국제대학), 심윤택·유진영·김종룡·김원규(한양대학교)

본 연구의 목적은 노화된 생쥐에 있어서 수영운동에 따른 AMPK와 GLUT4의 발현을 알아보는 것이다. 이에 본 실험에서는 노화된 생쥐에게 수영운동을 시행하였으며, 몸무게 및 복부지방의 무게를 측정하였고, 지방세포의 크기변화를 Oil-Red 염색법으로, 지방조직에서 AMPK와 Glut-4의 단백질을 분석하였다.

연구대상은 2개월 SWW계 숫컷 생쥐 10마리를 청년대조군(n=10), 12개월 노화된 SWW계 숫컷 생쥐 20마리를 노화대조군과 노화운동군(n=10)의 3군으로 분류하였고, 유산소운동은 주당 5회 40분씩 시행하였으며, 주 1회 체중을 측정하였다.

체중의 변화는 노화대조군이 다른 군에 비해 실험 종결 때까지 높은 체중을 유지하였으나, 노화운동군에서는 수영운동 2주후부터 7주까지 지속적으로 체중이 줄어(p<.05, .001)들었다. 혈당변화는 노화운동군이 다른 두 군에 비해 2주부터 뚜렷한 감소(p<.05)를 보였으며 실험종결 때까지 낮은 혈당을 유지하였다. 8주간 유산소운동 후 복부지방량의 변화는 노화운동군이 다른 두 군에 비해 확실하게 줄어들었고(p<0.001), 노화대조군의 지방세포크기는 비대해져 있었으나, 노화운동군에서는 작은 지방세포의 크기를 보여 주었다. 특히 AMPK와 GLUT-4의 발현은 노화운동군에서 다른 두 군에 비해 뚜렷하게 증가되었다.

이상의 결과를 종합하면 8주간의 수영운동은 노화된 생쥐의 체중 및 복부지방을 감소시켜 지방비대의 억제효과를 나타내었고, AMPK의 단백질발현증가는 지방생성 증가를 억제함을 알 수 있었으며, GLUT-4의 단백질발현증가는 혈당의 수치를 조절하는 효과가 있었다. 따라서 장기간의 수영운동은 노화로 인한 대사의 기능을 향상시켜 대사성질환으로부터 보호할 수 있을 것으로 생각된다.

**주요어:** 노화, AMPK, Glut-4, 유산소운동

### 서론

노화에 따른 질병은 삶의 질을 낮출 뿐 만 아니라 경제적 부담을 주며 환자과 그의 가족에게도 고통을 준다. 현대는 노인인구증가로 고령화 사회가 되면서 노인건강 및 질병예방에 대한 대책에 많은 관심을 보이고 있는 추세이다.

흔히 노화란 연령증가와 함께 생체능력이 점차 떨어지고, 환경스트레스에 대한 반응이 약해지면서 질병(Troen, 2003)과 죽음에 대한 위험률이 증가하는 현상을 말한다(Harman, 2003). 또한 에너지 저장고인 지방은 노화와 더불어 기능장애(dysfunction)를 일으켜 지방량을 늘리고(Florini, 1981), 대사증후군(metabolic syndrome)을 일으키며, 조직 내 세포독성(cytotoxic lipid)에 의해

조직손상 및 지방산조정(fatty acid handling)을 변조시킨다(Guo et al., 2007).

즉 자유유리기(free radical)를 통해 지질, 단백질, 그리고 DNA를 손상시키고(Tahara et al., 2001), 결국엔 동맥경화(Kreisberg & Kasim, 1987) 및 심혈관질환과 같은 만성질환을 유도(Chiu et al., 1994)하여 생명연장에 치명적인 원인을 제공할 수 있다.

한편 지방세포에서 발현되는 단백질 가운데 AMPK(adenosine monophosphate-activated protein kinase)와 GLUT-4(glucose transporter-4)가 있다. 일반적으로 AMPK는 세포 속 에너지상태에서 반응하고 주로 대사 전환(mater switch)을 조절하는 감지기(sensor)로 활동 하는 인산화 효소(Hardie & Pan, 2002)이다. 이것은 운동, 저산소, 허혈 등과 같은 스트레스반응에서 에너지가 고갈되면 AMP/ATP 비율에 의해 활동을 한다. 즉 지방산 합성, 콜레스테롤 합성과 같은 ATP소비과정을 감소시키

\* 논문 투고일 : 2007. 8. 9.

\* 게재 확정일 : 2007. 10. 4.

# 저자 연락처 : 김원규(Kimwg@hanyang.ac.kr)

고 AMP를 올려 지방산 산화와 같은 ATP생성과정을 활성화 시키는 것이다(Hardie & Carling, 1997, Winder & Hardie, 1999). 이러한 이유로 AMPK는 지방을 분해하거나 혹은 지방생성을 억제(Sullivan et al., 1994)하도록 유도하는 물질로 알려져 있다.

한편 GLUT-4는 인슐린 자극에 의해 세포내에서 혈장막(plasma membrane)까지 글루코스를 수송(James et al., 1989)하고, 심장, 근육, 지방조직에서 발현을 하며, 글루코스 항상성을 유지한다(Kahn, 1996). 또한 이것은 세포 내 AMPK활성신호에 의해 자극 받아 GLUT-4를 세포막 쪽으로 이동시켜 글루코스 흡수를 촉진시킨다(Yamaguchi et al., 2005). GLUT-4유전자는 호르몬과 대사 작용으로 조절 받으며(Tsunoda, 1997), 단식, 고지방음식섭취, 비만 등과 같은 상태에서 GLUT-4 mRNA는 줄어들게 하여(Charron & Kahn, 1990; Kahn, 1994; Garvey et al., 1991) 인슐린저항성이 나타나지만, 운동과 같은 생리학적 자극에서 GLUT-4 mRNA는 증가(Wake et al., 1991)하여 인슐린저항과 관련된 질환을 개선시키는 것으로 보고되고 있다.

이와 같이 대사질환과 관련된 AMPK와 GLUT-4에 관한 연구는 여러 분야에서 활발히 이루어지고 있으며, 그중 운동은 지방과 간에서 지방산 산화를 증가시키는 반면 glycerolipid 합성은 억제시키고(Park et al., 2002) 복부지방에서는 지방을 분해시켜 대사질환을 개선시키는(Takekoshi et al., 2006) 효과를 가지고 있다. 최근 McGee & Hargreaves(2006)의 연구결과를 보면, 운동이 골격근에서 AMPK와 GLUT-4의 발현을 증가시켜 제2형 당뇨병치료에 도움을 준다고 하였다. 또한 Linda et al.(2004)도 운동으로 catecholamines, 체중, 지방, 인슐린 감수성을 개선시킨다고 보고하였으며, Fehrenbach & Northoff(2001)은 운동으로 항산화효소의 발현을 증가시켜 DNA손상으로부터 세포를 보호한다고 주장하였다. 그러므로 운동은 항노화 뿐만 아니라 노화에 따른 질병 예방에 대하여 그 가능성을 살펴볼 필요가 있다고 본다.

다만 지금까지의 연구결과들은 골격근에서 AMPK와 GLUT-4의 활성수준에 중점을 두고 이루어져 왔지만, 노화에 따른 지방세포의 변화가 운동으로 어떻게 변화되었는지 혹은 AMPK와 GLUT-4의 발현 양상이 어떻게 다른지

비교 분석한 기초자료들은 매우 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 노화된 12개월 SWV 슛컷 생쥐의 지방조직에서 8주간 유산소운동을 통해 나타나는 변화를 규명하고자 체중변화와 혈당을 측정하였다. 더욱이 노화된 생쥐의 지방세포에서 나타나는 형태학적 변화를 자세히 알아보기 위해 Oli-Red염색법을 이용하여 광학현미경을 통해 알아보았고, AMPK와 GLUT-4의 단백질 발현양상을 비교하여 노화와 관련된 운동의 효과를 제시하고자 한다.

## 연구 방법

### 1. 실험동물

본 연구에서는 2개월과 12개월의 건강한 SWV계 슛컷 생쥐(mouse)를 사용하였다. 실험환경에 대한 적응기를 거친 후 각 군당 10마리씩 배정하여 2개월은 청년대조군(young control, Y-Con)으로 하였고, 12개월은 노화대조군(old control, O-Con)과 노화운동군(old+exercise, O-EX)으로 나눠 모두 3군으로 분류하였다. 운동기간은 1주간의 운동 적응기를 거친 후 총 8주간 시행하였다. 실험동물은 실험기간 동안 표준사료와 물을 공급하였고, 온도(22±1℃)와 습도(60±3%), 그리고 조명(12시간 light/dark cycle)은 자동 조절에 의해 사육 되었다.

### 2. 몸무게 및 혈당측정

정확한 몸무게를 알아보기 위해 미세저울(microscale: OHAUS Corp, AR2140, USA)을 이용하였으며, 실험동물이 도착한 날 부터 측정하였고, 1주간의 환경적응기를 거친 후 실험종료 때까지 주 1회 측정하였다. 혈당측정은 운동수행이 없는 날로 정하였고, 먹이는 공급한 상태에서 매주 동 시간대(AM10:00)에 생쥐꼬리에서 혈액을 채취하여 혈당분석기 Glucotrend(Roche, Germany)로 주 1회 측정하였다.

### 3. 운동방법

유산소 운동-방법은 Ascensao 등(2005)의 수영방법을 인용하였다. 운동군은 수심 30 cm, 수온 31-33℃의

실험동물용 수조에서 첫 1주 동안 5-30분까지의 잠진적 시간 증가로 수영 적응기를 거쳤다. 이후 무부하 상태에서 주당 5일간 매회 40분씩 생쥐 스스로 자유롭게 수영을 시행하였으며 총 8주간 오전 10시에 실시하였다.

수영운동직후 노화생쥐의 생리학적 스트레스인 체온감을 예방하기 위해서 원격외선조명을 이용하여 체온을 유지시킨 후 사육실로 옮겨졌다.

#### 4. 조직 처리

수영운동은 희생 하루 전에 중단하였고, 먹이를 제외한 물만 공급하였다. 희생방법은 경추탈골법을 이용하여 복강을 개방한 후 복부지방층(retroperitoneal fat-fed)을 적출하여 무게를 측정후 염색용과 western blot용으로 나누어 보관하였다. 즉 염색용은 0.1% glutaraldehyde-4% paraformaldehyde 혼합용액(pH 7.4)에 고정시킨 후 30% sucrose에 옮긴 후 O.C.T(optimal cutting temperature)와 함께 -20℃에서 12 $\mu$ m로 냉동절편한 후 냉동고(-70℃)에 보관 하였으며, western blot용 지방은 분석할 때까지 냉동고에서 보관하였다.

#### 5. Western Blot

-70℃에서 초저온 냉동고에 보관된 지방은 lysis 완충액과 함께 homogenizer를 이용하여 조직을 균질화 하였다. 균질액은 4℃에서 13000x g으로 15분간 원심분리한 후 상층액을 Bradford(1976)법에 따라 총 단백질량을 정량하였다.

단백질은 10 $\mu$ g으로 10% SDS- polyacrylamide gel 에서 전기영동후 membrane으로 전이시켰다. 5% skim milk가 첨가된 용액으로 1시간 실온에서 blocking 시켰다. AMPK의 1차항체는 1:3000(Cell signaling社, USA)와 GLUT-4의 1차항체는 1:3000(Santa Cruz社, USA)으로 희석하여 4℃냉장고에서 over night시켰다. 다음날 TBST 완충액으로 10분간 3회 세척한 후 2차 항체를 1:5000으로 희석하여 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 다시 TBST 완충액으로 10분간 3회 세척한 후 ECL Plus(Amersham, USA)로 1분간 반응시킨 뒤

X-ray film (Kodak, NY)을 이용하여 현상하였다. 단백질 농도측정은 Gel doc 2000(Bio red, ITALY)을 이용하여 농도를 정량하였으며, 정량된 단백질의 농도를 수치화하여 O-Con을 기준으로 다른 그룹과의 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

#### 6. Oil-Red 염색법

복부지방에서 지방세포를 관찰하기 위하여 냉동된 슬라이드를 꺼내 30분간 실온에 두었다. 이후 70%알콜에 옮겨 2분간 담긴 후 Oil-Red 에 담가 3분간 염색하였다. 다시 70%알콜에 옮긴 후 흐르는 수돗물에서 3분간 세척한 후 Hematoxylin에서 2분간 대조 염색하였다. 이후 수돗물에 담가 세척한 후 HCL에 1분간 담근 후 다시 수돗물에서 세척하였고, 이어서 암모니아수로 옮겨 30초간 담갔다가 수돗물로 옮겨 세척하였고, 녹인 젤라틴으로 봉입한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

#### 7. 통계 처리

자료처리실험결과에 대한 통계처리 방법은 SPSS 12.0을 이용하여 각 그룹별 체중 및 혈당측정 그리고 AMPK와 GLUT-4 단백질변화에 대한 평균과 표준오차를 산출하였으며, 측정변인별 평균 차이 검증을 위하여 일원변량측정(One way repeated measure ANOVA)을 하여 분석하였다. 모든 통계치의 유의수준은 P(0.05)이하로 설정하였다.

## 연구 결과

#### 1. 체중, 혈당 및 복부지방량 변화

미세저울을 이용하여 측정된 모든 군의 체중은 <표 1>에서 나타난 것처럼, 노화운동군은 노화대조군에 비해 처음 1주를 제외한 2주부터 7주 까지 점차 유의한 체중감소(p<.05, p<.001)를 보였다. 반면 청년대조군은 노화대조군에 비해 유의하게 적은 몸무게(p<.05)로 시작하였으나

표 1. 체중변화

(unit : gram)

Week	O-Con	Y-Con	O-Ex
1	37.1±13.51	27.1±14.07**	35.1±13.51
2	37.4± 1.03	28.2± 1.07**	31.1± 1.03**
3	37.2± 5.04	28.4± 5.25**	31.7± 5.25**
4	35.9± 1.01	31.3± 1.09*	32.0± 1.05*
5	36.0± 0.18	31.9± 1.09	32.1± 1.01*
6	34.5± 0.98	32.1± 0.79*	29.9± 0.75**
7	35.7± 0.75	31.8± 0.79*	29.9± 0.75**
8	35.0± 0.59	31.9± 0.62*	30.0± 0.62*

Value are mean ±SEM, Between of group(O-Con vs Y-Con, O-Con vs O-Ex) : \*p&lt;.05, \*\*p&lt;.001.

① Y-con: 청년대조군 ② O-Con: 노화대조군 ③ O-Ex: 노화운동군

표 2. 혈당변화

(unit : mg/dl)

Week	O-Con	Y-Con	O-Ex
1	147.1± 4.4	146.7± 4.58	146.7± 4.5
2	142.9± 5.58	152.3± 5.8*	115.3± 5.58**
3	145.0± 7.21	151.1± 7.21*	112.9± 7.3*
4	145.1± 3.69	151.7± 4.01*	114.5± 3.84**
5	144.1± 3.66	148.8± 3.82	121.3± 3.82**
6	140.2± 5.05	149.9± 5.49	111.7± 5.26**
7	141.2± 4.43	143.8± 4.62	106.2± 4.43**
8	147.3± 5.81	137.3± 5.81	100.3± 5.81**

Values are mean ±SEM, Between of group(O-Con vs Y-Con, O-Con vs O-Ex) : \*p&lt;.05, \*\*p&lt;.001.

① O-Con: 노화대조군 ② Y-con: 청년대조군 ③ O-Ex: 노화운동군

표 3. Retroperitoneal fat fed 무게 변화

(unit : gram)

	O-Con	Y-Con	O-Ex
Retroperitoneal fat pad	1.044±0.61	0.842±0.61	0.400±0.61**

Values are mean ±SEM, Between of group(O-Con vs. Y-Con, O-Con vs. O-Ex) : \*p&lt;.05, \*\*p&lt;.001.

① O-Con: 노화대조군 ② Y-con: 청년대조군 ③ O-Ex: 노화운동군

주령증가에 따라 점진적인 체중증가현상이 나타났다.

평소의 혈당변화를 보다 자세히 알아보기 위해 3군 모두 운동 없이 먹이를 공급받은 동시간대에 측정된 결과, 그 변화는 <표 2>와 같이 처음 1주에 3그룹 모두 비슷한 혈당을 보여주었지만, 2주부터 노화운동군이 다른 두 그룹에 비해 유의하게 낮은(p<.05, p<.001) 혈당수치를 보여주었고 실험종결 때까지 비슷한 혈당수치를 유지하였다.

본 연구에서 8주간의 유산소운동 후 나타난 생쥐의 복부 지방량의 변화는 <표 3>에서 나타난 것처럼 노화운동군이 다른 두 군에 비해 뚜렷하게 적게(p<.001)나타났다.

## 2. AMPK 및 GLUT-4의 변화

8주간의 유산소 운동을 통한 노화된 복부지방에서의

AMPK와 GLUT-4의 단백질발현양상을 관찰한 결과, 노화대조군이 다른 두군에 가장 적게 나타났다.

반면, 노화운동군의 AMPK와 GLUT-4의 단백질 발현양상이 노화대조군에 비해 유의하게 높게( $p < .001$ ) 나타났다(그림 1-A, B).

### 3. 지방세포의 조직학적 소견

8주간의 유산소운동에 따른 각 군별 지방세포를 관찰한 결과, 노화대조군의 지방세포는 다른 두 군에 비해 크게 비대한 것으로 나타났다.

반면 노화운동군 지방세포는 노화대조군에 비해 세포크기가 두드러지게 작았으며, 청년대조군과 비슷한 크기를

보여주었고, 지방세포와 세포사이의 간격이 떨어져 있었다(그림 2).

## 고 찰

본 연구에서 정상적으로 진행하고 있는 노화 과정 중 지방대사에 영향을 주는 단백질의 변화를 살펴보기 위하여 8주간 체중과 혈당을 측정하였고, 복부지방의 크기 변화와 AMPK와 GLUT-4 단백질발현 양상을 분석하였다. 그 결과 노화대조군과 청년대조군의 체중은 주령에 따라 지속적으로 증가하였으며(표 1), 혈당 역시 노화 운동군에 비해 높게 나타났고(표 2), 노화 대조군의 복부지방세포크기는 다른 두 군에 비해 뚜렷하게 비대해져 있는 것으로

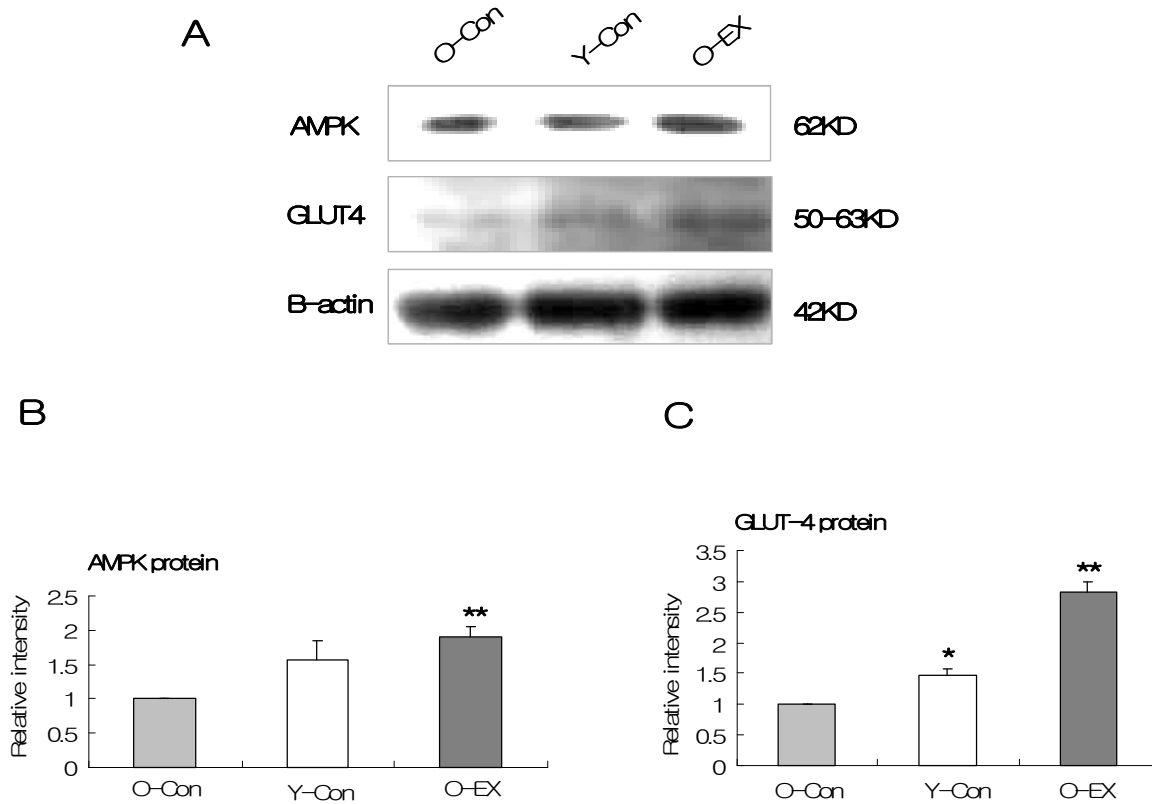


그림 1. Note western blot bend and graph of AMPK, GLUT-4 protein. AMPK and GLUT-4 protein expression of O-EX group is significantly increased as compared with other groups. Values are mean  $\pm$  SEM (O-Con vs. Y-Con, O-Con vs. O-EX ; \* $p < .05$ , \*\* $p < .001$ ).  
O-Con: 노화대조군, Y-Con: 청년대조군, O-EX: 노화운동군.

## 복부지방 Oil-Red 염색

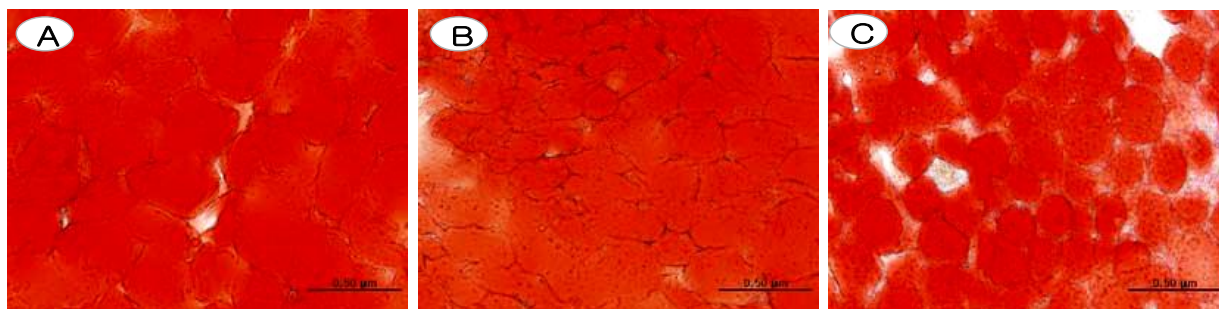


그림 2. Photomicrographs of Oil-Red stain in retroperitoneal fat-fed. The adipocyte of Old control group (A) is bigger than other groups, whereas adipocyte of Old with Exercise group (C) is smaller than Young control group (B). Magnification x 400. Bar size= 0.50 $\mu$ m.

A: 노화대조군, B: 청년대조군, C: 노화운동군

관찰되었다(그림 2). 뿐만 아니라 노화대조군은 다른 두 군에 비해 AMPK와 GLUT-4 단백질 발현이 억제된 것으로 나타났다.

이는 노화가 시작되면서 생리학적인 현상(예: 사구체 여과율, 최대심박수, 폐활량) 등이 변화하고 항상성을 유지하는 능력이 쇠퇴해졌기 때문에(Shock, 1985, Adelman et al., 1987) 지방대사에 영향을 미친 것으로 본다. 더욱이 노화된 지방조직에서는 기능장애로 인해 지방이 저장되고, 지방세포의 크기가 변하고, 인슐린 및 지방분해 인자(lipolytic agent)의 반응은 떨어진다. 게다가 증가된 지방조직에서는 염증성 사이토카인(inflammatory cytokine)을 생성을 높여 결국 당뇨병(diabetes), 고지질혈증(hyperlipidemia), 고혈압, 죽상경화증(atherosclerosis) 같은 질환을 높일 뿐만 아니라 다른 조직 내에서도 지방을 축적시키거나 독성을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Guo et al., 2007). 또한 이들 독성들은 세포내에서 산화스트레스를 만들고, 이로 인해 근육 내에서는 인슐린저항성이 생기고, 췌장 내에서는  $\beta$ 세포의 기능을 떨어뜨리기 때문에(Ruderman & Prentki, 2004) 혈당의 수준을 높인 것으로 판단된다. Saha & Ruderman(2003)가 제시한 바에 의하면, 비만 세포내에서 억제된 AMPK활동은 GLUT-4의 활동 역시 억제시키기 때문에 글루코스 수송에 영향을 준다고 하였다.

Holmes et al.(1999)도 AMPK가 글루코스 흡수 조절에 관여함을 입증하였고, Watson & Pessin(2001)에 의하면, 근육과 지방세포 내에서 GLUT-4수송 및 인슐린

신호는 글루코스 흡수에 영향을 미칠 수 있기 때문에, GLUT-4가 감소하면 인슐린 저항성 및 고혈당증(hyperglycemia), 그리고 제2형 당뇨병을 만든다고 하였다. 따라서 노화에 따른 체중증가와 지방세포의 비대, AMPK 및 GLUT-4 발현 감소는 지방대사장애와 관련된 여러 질병에 노출될 수 있음을 예측할 수 있다.

본 연구는 노화된 생쥐를 대상으로 8주간의 유산소운동을 통해 체중, 혈당을 비교분석하였고, 운동에 의해 나타난 복부지방의 크기 변화와 AMPK와 GLUT-4 단백질발현 양상을 비교 분석하였다. 그 결과 노화운동군은 초기에 노화군과 비슷하였던 체중이 수영운동을 수행한 2주 후부터 유의하게 감소하면서 운동종결 때까지 비슷한 무게를 유지 하였다(표 1). 게다가 노화운동군의 혈당은 처음 1주 때 다른 그룹과 비슷한 수치를 보였지만 2주부터 실험종결 때까지 서서히 감소된 현상을 보여 주었다(표 2). 뿐만 아니라 노화운동군의 복부지방세포크기는 노화대조군에 비해 확실하게 줄어들어 있었으며(그림 2), 노화운동군의 AMPK와 GLUT-4 단백질발현은 다른 두 군에 비해 유의하게 높게 발현하였다(그림 1).

이러한 결과는 운동에 의해 활성화된 AMPK가 지방산 산화와 글루코스 흡수를 높여준 것이라 할 수 있다. 더욱 자세히 설명하자면, acetyl CoA carboxylase(ACC)를 인산화시켜 ACC활동을 억제하여 malonyl CoA을 감소시킨 것이다(Saha & Ruderman, 2003). 또한 malonyl Co A은 미토콘드리아내로 long-chain fatty acyl-CoA

(LCAC)를 운반하는데 중추적인 역할을 하는 carnitine palmitoyltransferase (CPT-1)의 활동을 막는다. 그러므로 AMPK활성에 의한 malonyl Co A 감소는 LCAC의 운반을 높여 지방산 산화와 ATP 생성을 높여(Saha & Ruderman, 2003) 지방생성을 억제한 것으로 볼 수 있다. 특히 근수축과 같은 생리학적 자극을 통해 활성화된 AMPK는 수분내로 GLUT-4를 이동시키고, 이어서 세포 밖에 있는 글루코스를 세포내로 흡수시키는 것으로 보고되어 있다(Yamaguchi et al., 2005; McGee & Hargreave, 2006; Ivy, 2004). 더욱이 운동 중에 AMPK가 Histone deacetylase(HDAC)-5를 인산화시키고, HDAC-5와 myocyte enhancer factor(MEF)-2의 상호조절을 통해 GLUT-4유전자를 조절하기 때문에McGee & Hargreaves, 2006) 혈중 글루코스의 농도를 낮출 수 있는 것으로 판단된다. 결국 운동으로 인한 GLUT-4단백질의 증가는 주로 몸 전체 인슐린 활동과 글루코스 항상성을 개선시키기 때문에 인슐린저항과 제2형 당뇨병 같은 질병에 있어서 효과적인 치료를 할 수 있을 뿐만 아니라 관리역시 이루어진다고 볼 수 있다(Ren et al., 1995; McGee & Hargreaves, 2006).

McGee & Hargreaves(2006)에 의하면, 인간을 대상으로 운동을 시행한 후 GLUT-4가 바로 증가되었다고 보고하였으며, 이는 운동이 AMP/ATP 비율을 증가시켜 AMPK를 활성화 시켜(Hardie, 1997) 세포내에 있는 GLUT-4를 막쪽으로 이동하기 위해 활동을 증가한 것이라 하였다. Park et al.(2002)은 단기간 운동으로 AMPK 효소의 활동을 증가하였다고 하였고, Takekoshi et al.(2006)도 장기간 운동을 통해 피하지방보다 내장지방에서 AMPK 유전자 및 단백질이 증가되었다고 하였으며, 이러한 결과는 지방분해를 증가시키고 지방을 줄어들게 만든 것이라 할 수 있다(Winder et al., 2000).

따라서 본 연구는 노화에 의해 증가된 복부지방량을 장기간유산소운동을 통해 줄어들게 하였고, 이들 조직의 세포 크기 역시 작아졌음을 Oil-Red염색을 통해 형태학적으로 입증하였다. 또한 운동 2주 후부터 체중과 혈당의 변화가 유의하게 감소된 연구결과를 나타내었다. 뿐만 아니라 노화로 억제된 AMPK와 GLUT-4단백질 발현이 운동으로 증가되었음을 노화운동군을 통해 보여주었다(그림 1, 2).

이러한 결과는 운동이 노화된 생쥐의 복부지방에서 AMPK와 GLUT-4단백질발현을 증가시켜 지방대사를 유도하였고, 이러한 결과는 노화에 따른 대사질환으로부터 예방할 수 있음을 제시한다.

## 결론

본 연구는 노화된 생쥐의 체중과 혈당을 측정 하였고, 이들 생쥐의 복부지방에서 지방세포의 크기와 AMPK와 GLUT-4발현양상을 알아봄으로써 노화에 따른 운동의 효과를 규명하고자 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 노화대조군의 체중은 청년대조군에 비해 높게 나타났지만, 노화운동군은 운동을 시행한 2주 후부터 7주 때까지 노화대조군에 비해 유의하게 감소하였다( $p < .05$ ,  $p < .001$ ).
2. 혈당변화는 초기에 세군 모두 비슷하게 나타났으나, 운동을 시행한 2주 후부터 실험종결 때까지 다른 그룹에 비해 낮게 나타났다( $p < .05$ ,  $p < .001$ ).
3. 노화대조군의 복부지방에서의 AMPK 및 GLUT-4 단백질 양상이 다른 두 군에 비해 억제된 것으로 나타났다. 하지만 노화운동군은 다른 두 군에 비해 뚜렷하게 증가된 것으로 나타났다( $p < .001$ ).

이상의 결과를 요약하면 노화는 복부지방의 크기를 비례하게 하고, 복부지방에서의 AMPK와 GLUT-4발현을 억제시킨다. 하지만 장기간의 운동은 노화에 따른 지방크기를 감소시킬 뿐만 아니라 AMPK와 GLUT-4발현을 증가시켜 체중조절 및 혈당조절을 낮출 수 있었던 것으로 생각된다. 따라서 장기간의 수영운동은 노화에 따른 AMPK와 GLUT-4의 발현억제를 증가시킴으로써 복부지방감소 및 인슐린저항성을 낮춰 혈당증가를 억제되었음을 본 실험을 통해 알 수 있었다.

## 참고 문헌

- Adelman, R. C., Britton, G. W., & Rotenberg, S.(1987). *Endocrine regulation of gene activity in aging animals of different genotypes*. New York: Alan R. Liss, 355.
- Ascensao, A., Magalhaes, J., Soares, J., Ferreira, R., Neuparth,

- M., Marques, F., Oliveira, J., & Duarte, J.(2005). Endurance training attenuates doxorubicin-induced cardiac oxidative damage in mice. *Int J Cardiol*, **100**, 451-460.
- Bradford, M. M.(1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Charron, M. J., & Kahn, B. B.(1990). Divergent molecular mechanisms for insulin-resistant glucose transport in muscle and adipose cells in vivo. *J Biol Chem*, **265**, 7994-8000.
- Chiu, H. C., Jeng, J. R., & Shieh, S. M.(1994). Increased oxidizability of plasma low density lipoprotein from patients with coronary artery disease. *Biochemica et Biophysica Acta*, **1225**, 200-208.
- Florini, J. R.(1981). Composition and function of cells and tissues. Handbook of biochemistry in aging. Boca Raton(FL): CRC Press.
- Fehrenbach, E., & Northoff, H.(2001). Free radical exercise, apoptosis, and heat shock protein. *Exerc Immunol Rev*, **7**, 66-89.
- Garvey, W. T., Maianu, L., Huecksteadt, T. P., Birnbaum, M. J., Molina, J. M., & Ciaraldi, T. P.(1991). Pretranslational suppression of a glucose transporter protein causes insulin resistance in adipocytes from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and obesity. *J Clin Invest*, **87**, 1072-1081.
- Guo, W., Pirtskhalava, T., Tchkonina, T., Xie, W., Thomou, T., Han J., Wang, T., Wong, S., Cartwright, A., Hegardt, F. G., & Corkland, J. L.(2007). Aging results in paradoxical susceptibility of fat cell progenitors to lipotoxicity. *Am J Physiol Endocrinol Matab*, **292**, 1041-1051.
- Harman, D.(2003). The free radical theory of aging. *Antioxide Redox Signal*, **5(5)**, 557-561.
- Hardie, D. G., & Carling, D.(1997). The AMP-activated protein kinased-fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem*, **1**;246, 259-273.
- Hardie, D. G., & Pan, D. A.(2002). Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. *Biochem Xoc Trans*, **30**, 1064-1070.
- Holmes, B. F., Kurth-Kraczek, E. J., & Winder, W. W.(1999). Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. *J Appl Physiol*, **87**, 1990-1999.
- Ivy, J. L.(2004). Muscle insulin resistance amended with exercise training: Role of GLUT4 expression. *Med Sci Sports Exerc*, **36(7)**, 1207-1211.
- James, D. E., Strube, M., & Mueckler, M.(1989). Molecular cloning and characterization of insulin-regulatable glucose transporter. *Nature*, **2**; 338(6210), 83-87.
- Kahn, B. B.(1996). Lilly lecture 1995. Glucose transport: pivotal step in insulin action. *Diabetes*, **45**, 1644-1654.
- Kahn, B. B.(1994). Dietary regulation of glucose transporter gene expression: tissue specific effects in adipose cells and muscle. *J Nutr*, **124**, 1289S-1295S.
- Kreisberg, R. A., & Kasim, S.(1987). Cholesterol metabolism and aging. *Am J Med*, **26;82(B1)**, 54-60.
- Linda, S. P., Barry, A. F., Robert, F., William, B. F., George, A. K., & Chester, A. R.(2004). Exercise and Hypertension. *Medicine & Science in sports & Exercise.*, **36(3)**, 533-553.
- McGee, S. L., & Hargreaves, M.(2006). Exercise and skeletal muscle glucose transporter 4 expression: Molecular mechanisms. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **33**, 395-399.
- Park, H., Kaushik, V. K., Constani, M., Przybytkowski, E., Ruderman, N. B., & Saha, N. K.(2002). Coordinate regulation of malonyl -CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. *J Biol Chem*, **6;277(36)**, 32571-7.
- Ren, J. M., Marshall, B. A., Mueckler, M. M., McCaleb, M., Amatrua, J. M., & Shulman, G. I.(1995). Overexpression of GLUT4 protein in skeletal muscle increases basal and insulin-stimulated whole body glucose disposal in conscious mice. *J Clin Invest*, **95**, 429-432.
- Ruderman, N., & Prentki, M.(2004). AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. *Nat Rev Drug Discov*. **3(4)**, 340-51.
- Saha, A. K., & Ruderman, N. B.(2003). Malonyl-CoA and AMP-activated protein kinase: an expanding partnership. *Mol Cell Biochem*, **253(1-2)**, 65-70.
- Shock, N. W., Greulich, R. C., & Andres, R.(1984). Normal human aging: the baltimore longitudinal study of aging. Washington(DC): Department of health and human services(US). NIH Publication, 84-2450.



- Shock, N. W.(1985). *Longitudinal studies of aging in humans*. In: Finch CE, Schneider EL, editors. *Handbook of the biology of aging*. New York : Van Nostand Reinhold, 721.
- Sullivan, J. E., Brocklehurst, K. J., Marley, A. E., Carey, F., Carling, D., & Beri, R. K.(1994). Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat hepatocytes with AICAR, a cell permeable activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS Lett*, **353**, 33-36.
- Tahara, S., Matsuo, M., & Kaneko, T.(2001). Age-related changes in oxidative damage to lipids and DNA in rat skin. *Mech Aging Dev*, **122**, 415-426.
- Takekoshi, K., Fukuhara, M., Quin, Z., Nissato, S., Isobe, K., Kawakami, Y., & Ohmori, H.(2006). Long-term exercise stimulates adenosine monophosphate-activated protein kinase activity and subunit expression in rat visceral adipose tissue and liver. *Metabolism Clinical and Experimental*, **55**, 1122-1128.
- Troen, B. R.(2003). The Biology of aging. *Mt Sinai J Med.*, **70**, 3-22.
- Tsunoda, N., Cooke, D. W., Ikemoto, S., Maruyama, K., Takahashi M, Lane M. D., & Ezaki, O.(1997). Regulated expression of 5'-deleted mouse GLUT4 minigenes in transgenic mice: effects of exercise training and high-fat diet. *Biochem Biophys Res Commun*, **20;239(2)**, 503-9.
- Wake, S. A., Sowden, J. A., Storlien, L. H., James, D. E., Clark, P. W., Shine, J., Chisholm, D. J., & Kraegen, E. W.(1991). Effects of exercise training and manipulation on insulin-regulatable glucose-transporter mRNA in rat muscle. *Diabetes*, **40(2)**, 275-279.
- Watson, R. T., & Pessin, J. E.(2001). Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. *Recent Prog Horm Res*, **56**, 175-193.
- Winder, W. W., & Hardie, D. G.(1999). AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol*, **277**, E1-E10.
- Winder, W. W., Holmes, B. F., Rubink, D. S., Jensen, E. B., Chen, M., & Holloszy, J. O.(2000). Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, **88**, 2219-2226.
- Yamaguchi, S., Kstahira, H., Sachihiko, Ozawa, S., Nakamichi, Y., Tanaka, T., Shimoyama, T., Takahashi, K., Yoshimoto, K., Imaizumi, M. O., Nagamatsu, S., & Ishida, H.(2005). Activators of AMP-activity in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **289**, E643-E649.

## Changes of AMPK & GLUT-4 Protein Expression by Swim Exercise in Fat Tissue of Ageing Mice

Lee Jin<sup>a</sup>, Chang-Sub Shim<sup>b</sup>, Yon-Tak Shim<sup>b</sup>, Jin-Young Yoo<sup>b</sup>, Jong-Ryoung Kim<sup>b</sup>, & Won-Kyu Kim<sup>a</sup>  
*Hanyang University<sup>a</sup>, & Kook-Je College<sup>b</sup>*

The present study was designed to examine the protein changes of AMPK and GLUT-4 by swim exercise in fat tissue of ageing mice. We performed aerobics exercise by swimming, measured body weight(BW)and measured blood glucose(BG), and performed Oil-Red stain for adipocyte and western blot for AMPK and GLUT-4 protein in fat tissue.

SWV(n=30) mice at age of 2 months and 12months old were divided into 3 groups as follows: (1) Old control group (n=10, O-Con), (2) Young control group(n=10, Y-Con) (3) Old+exercise group (n=10, O-Ex). The swimming exercise was performed 5 days /week with duration of 40minutes for 8weeks. BW and BG were measured once per week. Results showed that the BW of O-Con group was is higher than other groups, interestingly, BW of Old-Ex was significantly decreased ( $p<.05$ ,  $p<.001$ ) from 2nd. BG of O-Ex groups showed markedly decreased ( $p<.05$ ,  $p<.001$ ) from 2 weeks after exercise and continuously lower than other groups. Retroperitoneal fat fed weight of O-Ex group was significantly decreased ( $p<.001$ ) and adipocyte size of O-Con group was bigger than other groups, but O-Ex group smaller sized adipocyte than other groups. Particularly, AMPK and GLUT-4 which are related with lipid metabolism was markedly inhibited compared to Y-Con group, whereas O-Ex group showed increased of AMPK and GLUT-4 protein expression than other groups.

These results suggest that swim exercise for 8 week should inhibit adipocyte hypertrophy by controlling the BW and decreasing retroperitoneal fat fed through AMPK protein expression and controlling protective of BG the by decreasing the BG through GLUT-4 protein expression in fat tissue of ageing mice. Thus, exercise may be helpful to improvement of lipid metabolism function and may be protective effect from lipid metabolism disease.

**key words:** Ageing, AMPK, Glut-4, Aerobics exercise 