운동이 고지방식으로 비만해진 쥐의 인슐린과 산화 스트레스 및 최종당화산물에 미치는 영향

강동우[†], 김성민[†], 전용관^{*}

연세대학교 스포츠레저학과

Effects of Voluntary Running-Wheel Exercise on Insulin, Oxidative Stress and Advanced Glycation End Products in High-Fat Diet-Induced Obese Mice

Dong-Woo Kang[†], Sung Min Kim[†], Justin Y. Jeon^{*}

Department of Sport and Leisure Studies, Yonsei University, Seoul, Korea

Background: Obesity-induced insulin resistance is an important risk factor for type 2 diabetes and cardiovascular disease. However, as potential mechanisms of increased insulin, how oxidative stress (OS) advanced glycation end-products (AGEs) can be changed through exercise is not fully understood. **Methods:** A total of 36 C57BL/6 mice were fed either a high-fat diet (HFD; n = 19) or chow diet (Chow; n = 17) for 7 weeks. The two groups were then divided into voluntary running wheel exercise or no-exercise subgroups each, and the four groups were provided with another 8 weeks of intervention: 1) HFD+exercise (HE; n = 11), 2) HFD+no exercise (HN; n = 8), 3) Chow+exercise (CE; n = 8), and 4) Chow+no exercise (CN; n = 9). Body weight, fasting insulin level, and AGEs were measured before and after intervention. ANOVA and Pearson's multiple correlation coefficients were used for statistical analysis using SPSS statistics software version 20.0. **Results:** The HE group showed significantly greater weight reduction ($P < 0.01$), while CE and CN did not show significantly different weight reductions between each other. Also, the fasting insulin level was significantly lower in the HE group than in the HN group. The 7-week HFD intervention significantly increased OS and AGEs. However, 8 weeks of exercise did not significantly change OS and AGEs among the groups. **Conclusion:** The findings of the current study suggest that OS and AGEs may not be related to the pathway of exercise-induced improvement in insulin levels in obese mice.

Key words: Obese mice, Exercise, Insulin, Oxidative stress, Advanced glycation end products

서론

비만은 각종 질환의 유병률뿐만 아니라 사망률 증가의 중요한 원인으로 알려져 있는데^{1,2}, 이와 연관된 매개 요인으로서 인슐린 저항성이 대표적이다.^{3,4} 한편, 산화스트레스가 비만과 혈중 인슐린의 잠재적인 연결고리로서 주목을 받고 있고⁵, 항산화물질은 인슐린 저항성을 야기한다.⁶ 또한, 산화스트레스와 함께 선행 연구들은 최종당화산물(advanced glycation end products, AGEs)이 고지방식이에 따른 비만

에 의해 야기된다고 보고하였다.⁷ 최종당화산물과 내장 최종당화산물의 형성은 조직의 손상과 인슐린 저항성의 악화를 가져오는데, 이 물질들은 nuclear factor kappa-B (NF- κ B) 활성을 증가시키고, NF- κ B는 endothelin-1과 thrombomodulin 유전자들의 발현과, interleukin-6 (IL-6) 및 tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)와 같은 염증 전 사이토카인들의 발생을 증가시킨다.⁸ 한편, 선행연구들에 따르면 운동에 따른 체중감소는 oxidized low density lipoprotein (OxLDL)과 myeloperoxidase (MPO)와 같은 산화스트레스의 바이오마커들을 개선시

Corresponding author Justin Y. Jeon

Department of Sport and Leisure Studies, Yonsei University, 50 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 120-749, Korea

Tel +82-2-2123-6197 Fax +82-2-2123-8376 E-mail jjeon@yonsei.ac.kr

[†]Equally contributed.

Received Aug. 25, 2014 Reviewed Sep. 11, 2014 Accepted Nov. 19, 2014

Copyright © 2015 Korean Society for the Study of Obesity

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

켰다고 보고하였다.⁹ 하지만, 운동 또는 운동에 따른 체중감소가 산화 스트레스 및 최종당화산물과 이와 관련된 혈중 인슐린에 미치는 영향을 본 연구는 매우 부족한 실정이다. 따라서 본 연구의 목적은 비만이 유도된 쥐에서 자발적 운동이 고지방식으로 유도된 비만과 산화 스트레스 및 최종당화산물에 미치는 영향을 확인하는 데 있다.

방 법

본 연구에서는 5주령 된 수컷 쥐(C57BL/6) 총 36마리가 사용되었다. 쥐는 일반식이(Chow; N=17)와 고지방식이(high-fat diet, HFD; N=19)로 먼저 나뉘어 7주간 사육되었고, 7주 후 각각의 그룹에서 다시 운동그룹과 비운동그룹으로 나누어 총 4개의 그룹으로 실험이 진행되었다. 1) HFD+exercise (HE; n=11), 2) HFD+no exercise (HN; n=8), 3) Chow+exercise (CE; n=8), and 4) Chow+no exercise (CN; n=9). CE와 HE그룹의 cage에는 Voluntary Running Wheel (wheel circumference, 106 cm; Bio-Serv, Frenchtown, NJ)이 설치되었다. CE와 HE그룹의 쥐들은 설치된 Voluntary Running Wheel에서 자발적으로 운동에 참여하였고, 부착된 카운터로 wheel의 회전수를 일일 단위로 측정함으로써 주행거리를 계산하여 운동의 효과를 확인하였다. 포도당 내성검사, 인슐린 내성검사, 산화 스트레스(thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) 그리고 최종당화산물이 종속변인으로 측정되었으며, 측정은 baseline, 7주, 그리고 12주차에 실시되었다. 포도당 내성검사는 검사 12시간 전부터 쥐의 식이섭취를 제한한 후 쥐의 꼬리에서 혈당측정기(Elite; Bayer, Mishawaka, IN)를 통해 혈액을 채취하였다. 그 후 쥐의 혈액에 포도당을 주입(2 g/kg body weight)하였고, 주입 후 15분, 30분, 60분, 그리고 120분이 각각 경과 되었을 때 쥐의 꼬리에서 다시 혈액을 측정하였다. 각 변인별 그룹 간 차이를 비교하기 위하여 one-way ANOVA를 사용하였고, 운동과 식이 간의 상호작용을 평가하기 위하여 two-way ANOVA를 사용하였으며, 중재들 간의 유의한 차이를 알아내기 위해 Scheffe의 사후검정을 사용하였다. 체중의 변화, 운동, 식이, 인슐린, 산화 스트레스, 그리고 최종당화산물간의 관계는 Pearson's multiple correlation coefficients를 사용하여 분석하였다. 통계분석에는 SPSS version 20.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA)이 사용되었고, 통계적 유의수준은 0.05 미만으로 제한하였다.

결 과

고지방식이그룹의 평균 체중 증가량은 11.89 ± 2.85 g, 일반식이그룹의 평균 체중 증가량은 4.94 ± 0.85 g로 고지방식이그룹에서 더 큰 체중증가를 보였고 통계적으로 유의한 차이를 나타냈다($P < 0.05$)

Table 1. Body weights of four groups before and after 8 weeks of exercise

Group	N	Baseline weight (g)	Final weight (g)	F
HE	11	20.07 ± 0.31	36.73 ± 1.05^a	95.395 [*]
HN	8	20.34 ± 0.32	47.13 ± 0.71^b	
CE	8	20.19 ± 0.19	27.25 ± 1.18	
CN	9	19.94 ± 0.40	28.61 ± 0.65^a	

Values are mean $\pm$ SD.

HE, high-fat diet + exercise; HN, high-fat diet + no exercise; CE, chow diet + exercise; CN, chow diet + no exercise.

^{a,b} indicate significant higher in weight change than CE and HE respectively (Scheffe post-hoc tests, $P < 0.05$)

^{*} $P < 0.001$.

(data not shown). HN, HE, CN, CE도 그룹 간 체중변화가 나타났다 (Table 1). 포도당 내성검사 수치에서 HN그룹이 CE그룹과 CN그룹에 비해 유의하게 높게 나타났고($P < 0.05$) (Fig. 1A), HN그룹의 glucose area under curve (AUC) 및 인슐린 수치는 HE그룹, CE그룹, CN그룹보다 유의하게 높게 나타났고($P < 0.05$) (Fig. 1B and 1C). 산화 스트레스에서는 고지방식이그룹의 TBARS 수치가 일반식이그룹보다 유의하게 더 높게 나타났지만($P < 0.05$), 운동을 통한 체중감소에 따른 TBARS 수치의 감소는 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 1D). 한편, 최종당화산물 수치에서는 고지방식이그룹이 일반식이 그룹보다 유의하게 더 높게 나타났으나($P < 0.05$), 운동중재 후 HE그룹과 HN그룹 간의 유의한 차이는 발견되지 않았다(Fig. 1E).

고 찰

본 연구에서는 체중 그리고 인슐린 내성검사를 통한 혈중 인슐린 및 AUC가 예상했던 것과 같이 고지방식이보다 일반식이군, 그리고 비운동군보다 운동군에서 더 낮게 나타난 것을 확인하였다. 반면, 산화 스트레스에서는 운동을 시킨 고지방식이 그룹과 일반식이그룹 모두 유의한 증가가 나타나지는 않았으며 오히려 감소하는 경향을 보였는데, 일반적으로 비만한 경우 산화 스트레스 수치가 높은 것으로 나타나지만¹⁰, 산화 스트레스는 일반적으로 높은 강도로 운동이 지속되었을 때 증가한다고 알려져 있다. 본 연구에서 사용된 운동방법은 자발적 형태의 wheel running으로, 운동그룹의 평균 운동 거리는 일일 3,537 m였던 반면 식이섭취량은 늘어난 것으로 보아 체중의 감소는 식이섭취조절에 기인한 것이 아니라 운동에 의한 것으로 볼 수 있다. 하지만, 본 연구의 특성상 자발적으로 운동이 이루어졌기 때문에 운동강도는 불분명하다. 그러나 산화 스트레스에서의 변화가 나타나지 않은 것으로 미루어 볼 때 본 연구에서의 운동중재는 상대적으로 낮은 강도의 운동이었고, 산화 스트레스에서의 충분한 변화를 가져오지 못한 것으로 사료된다. 또한, 운동이 최종당화산물에 미치는 영향은 본 연구의 결과를 포함하여 선행연구들은 일치하지 않은 결과를

Fig. 1. Effects of the exercise intervention. (A) Glucose tolerance test (GTT) after the exercise intervention, (B) Changes in glucose area under the curve (AUC), (C) Changes in plasma insulin levels, (D) Changes in thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and (E) Changes in advanced glycation end products (AGEs).

HE, high-fat diet + exercise; HN, high-fat diet + no exercise; CE, chow diet + exercise; CN, chow diet + no exercise.

*significantly different from HN ($P < 0.05$).

나타내는데^{11,12}, 운동이 최종당화산물에 미치는 영향에 대한 선행 연구가 미비할 뿐만 아니라, 연구 대상 및 운동중재 방법이 상이하여 서로 다른 결과가 나타난 것으로 보인다. 혈당 및 인슐린은 고강도뿐만 아니라 저강도 및 중강도 운동을 통해서도 개선되고 특히 당뇨가 유도된 쥐에게서 당뇨를 개선하는 것으로 잘 알려져 있지만³, 일반적으로 산화 스트레스는 고강도 운동을 통해 변화하며 저강도 운동에서 감소되기 위해서는 충분한 지방의 감소를 가져와야 하는 것으로 보인다. 하지만, 연구의 제한점으로서 본 연구에서는 여러 산화 스트레스 지표들(항산화효소 및 글루타티온) 중에서 malondialdehyde (MDA)를 통한 TBARS 수치로만 평가하였기 때문에, 도출된 결과가 다소 불분명할 수 있다. 따라서 본 연구의 결과를 통해 운동을 통한 인슐린 및 산화 스트레스와 최종당화산물의 관계를 분명하게 밝힐 수 없었으며, 추후 관련 여러 지표들을 다각적으로 분석한 쥐 실험 연구와 더 나아가 큰 규모의 임상연구가 필요할 것으로 사료된다. 따라서, 본 연구의 결과는 산화 스트레스 및 최종당화산물이 고지방식이와 운동을 함께 한 그룹에서 보인 인슐린 민감도 개선과 큰 관련이 없을 수도 있다는 것을 시사한다. 따라서, 본 연구는 산화 스트레스와 혈중 인슐린 간의 상관관계에 대해 알아본 첫 번째 연구라는 데 의의가 있다.

요 약

배경: 비만에 의한 인슐린 저항성은 제2형 당뇨병과 심혈관계 질환을 일으키는 중요한 위험요인이지만 비만이 혈중 인슐린을 증가시키는 기전으로 산화 스트레스 및 최종당화산물이 운동을 통해 어떻게 변화되는지에 대한 연구는 매우 부족하다.

방법: 총 36마리의 C57BL/6 쥐를 고지방식이그룹(HFD; $n = 19$)과 일반식이그룹(Chow; $n = 17$)으로 나누어 7주 동안 식이를 제공한 후, 운동유무에 따라 각각 두 그룹씩 총 네 그룹으로 나누어 8주 동안 voluntary running wheel 운동을 중재하였다: 1) HFD+exercise (HE; $n = 11$), 2) HFD + no exercise (HN; $n = 8$), 3) Chow + exercise (CE; $n = 8$), and 4) Chow + no exercise (CN; $n = 9$). 종속변인으로 체중과 혈중 인슐린, 산화 스트레스 지표와 최종당화산물이 중재 전후로 측정되었다. 통계분석은 SPSS 20.0을 사용하였고, ANOVA와 Pearson's multiple correlation coefficients를 사용하였다.

결과: 고지방식이를 하면서 운동을 한 그룹은 운동을 하지 않은 그룹에 비해 통계적으로 유의하게 체중이 감소하였으나($P < 0.01$), 일반식이를 하면서 운동을 한 그룹은 운동을 하지 않은 그룹에 비해 유의한 체중의 차이가 없었다. 또한, 고지방식이를 한 운동군의 인슐린 역시

비운동군보다 통계적으로 유의하게 낮았다($P < 0.05$). 고지방식은 통계적으로 유의하게 산화 스트레스와 최종당화산물을 증가시켰으나, 이후 8주간의 운동참여가 산화 스트레스와 최종당화산물에서 유의한 차이는 보이지 않았다.

결론: 운동을 통한 인슐린 감소는 산화 스트레스 및 최종당화산물의 변화와 상관관계가 없을 수도 있다는 것을 시사한다.

중심단어: 비만 쥐, 운동, 인슐린, 산화 스트레스, 최종당화산물

Conflicts of Interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

1. Nguyen NT, Magno CP, Lane KT, Hinojosa MW, Lane JS. Association of hypertension, diabetes, dyslipidemia, and metabolic syndrome with obesity: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 to 2004. *J Am Coll Surg* 2008;207: 928-34.
2. Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, Kipnis V, Mouw T, Ballard-Barbash R, et al. Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N Engl J Med* 2006; 355:763-78.
3. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2006;444:840-6.
4. Krentz AJ, Hitman GA. The expanding pathogenic role of insulin resistance in human disease. *Diabet Med* 2014 [Epub ahead of print].
5. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:816-23.
6. Dokken BB, Saengsirisuwan V, Kim JS, Teachey MK, Henriksen EJ. Oxidative stress-induced insulin resistance in rat skeletal muscle: role of glycogen synthase kinase-3. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;294:E615-21.
7. Li SY, Liu Y, Sigmon VK, McCort A, Ren J. High-fat diet enhances visceral advanced glycation end products, nuclear O-Glc-Nac modification, p38 mitogen-activated protein kinase activation and apoptosis. *Diabetes Obes Metab* 2005;7:448-54.
8. Neumann A, Schinzel R, Palm D, Riederer P, Münch G. High molecular weight hyaluronic acid inhibits advanced glycation endproduct-induced NF-kappaB activation and cytokine expression. *FEBS Lett* 1999;453:283-7.
9. Rector RS, Warner SO, Liu Y, Hinton PS, Sun GY, Cox RH, et al. Exercise and diet induced weight loss improves measures of oxidative stress and insulin sensitivity in adults with characteristics of the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293: E500-6.
10. Chang SP, Chen YH, Chang WC, Liu IM, Cheng JT. Increase of anti-oxidation by exercise in the liver of obese Zucker rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004;31:506-11.
11. Boor P, Celec P, Behuliak M, Grancic P, Kebis A, Kukan M, et al. Regular moderate exercise reduces advanced glycation and ameliorates early diabetic nephropathy in obese Zucker rats. *Metabolism* 2009;58:1669-77.
12. Delbin MA, Davel AP, Couto GK, de Araújo GG, Rossoni LV, Antunes E, et al. Interaction between advanced glycation end products formation and vascular responses in femoral and coronary arteries from exercised diabetic rats. *PLoS One* 2012;7:e53318.
13. Wu Y, Yang X, Li Y. Exercise induces increased CLUT4 gene expression and protein content in diabetic rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2000;80:172-4.