

고열에 노출된 Hsp70 knockout mice의 태아에게서 모체운동의 효과: 세포자멸사의 변화

이진 · 김원규(한양대학교), 심창섭(국제대학)

산모의 고열은 heat shock protein 70(Hsp70)을 조절하고 세포자멸사(apoptosis)를 유도하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 산모의 운동이 태아의 세포자멸사에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 임신한 생쥐에게 수영운동을 시행하였으며, 태아를 적출하여 Hsp 70과 Bcl-2 단백질의 발현양상을 western blotting을 통하여 분석하였고, 자멸된 세포의 수를 관찰하기 위해 TUNEL 염색법으로 분석하였다. 연구대상은 임신한 9주령 C57/BL6계(wild type: WT)를 정상대조군으로, C57/BL6계 Hsp70 knockout(KO) 생쥐를 실험군으로 정하였고, 두 군은 다시 대조군, 운동군, 운동고열군, 고열군의 네 군으로 분류하였다. 수영운동은 임신이 확인된 다음날부터 임신 제 8일까지 총 8일간 10분씩 시행하였으며, 고열노출은 임신 제 8일에 43.℃ 수조에서 유도하였다.

임신 제 9일 태아를 적출한 결과 태아의 생존률은 대조군에서는 유의한 차이가 없었으나, Hsp70 KO 군의 고열군은 다른 군에 비해 유의하게 감소하였다($p<.001$). 그러나 두 군의 운동고열군은 고열군에 비해 유의하게 높은 생존률을 나타내었다. Hsp 70의 발현은 정상대조군의 고열군에서 유의하게 증가하였지만, Hsp 70 KO 군의 모든 군에서는 매우 미약한 반응을 보였을 뿐 유의한 차이는 관찰할 수 없었다. Bcl-2의 발현은 두 군의 고열군은 대조군에 비해 유의하게 감소하였다($p<.001$). 그러나 두 군의 운동고열군은 고열군에 비해 Bcl-2 발현이 증가되어 있었다. 세포자멸사는 Hsp 70 KO 고열군에서 유의하게 가장 높게($p<.001$) 나타난 반면 운동고열군은 고열군에 비해 유의하게 감소($p<.05$)하였다.

이상의 결과를 종합하면 산모생쥐에게서 고열 노출전 운동은 태아의 생존률을 높이고, Bcl-2의 발현을 증가시켜 세포자멸사를 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다. 따라서 운동은 고열로 인한 태아손상으로부터 태아를 보호 할 수 있을 것으로 생각된다.

주요어: 고열, 운동, Hsp70, 세포자멸사

서 론

임신 중 산모의 체온 변화는 태아발달에 영향을 미칠 수 있으며, 특히 고열에 노출되면 태아와 산모에서 치명적인 손상을 유발할 수 있다.

고열(hyperthermia)은 정상중심체온 보다 1.5℃ 이상 체온이 올라가는 것을 뜻하며, 산모고열은 태아에서 무뇌증(anencephaly), 뇌탈출증(exencephaly), 작은안구증(microphthalmia), 관절굽은증(arthrogryposis), 배벽결손(abdominal wall defect), 사지결손(limb deficiency) 등과 같은 다양한 기형과 유산을 일으킨다(Martinez-Frias et al., 2001). 고열에 의해 유발된 선천성기형은 세포자멸사(apoptosis)에 의한 세포의 죽음 때문인 것으로 알려져 있으며, 특히 미토콘드리아 경로를 통한 caspase family의 활성화에 의해 나타난다고 보고되어 있다(Takle et al., 2006, Kim & Mirkes, 2003).

또한 포유동물에서 기형을 유발하는 세포자멸사는 DNA 분절(fragmentation)과 같은 형태학적 특징이 나타난다고 밝혀짐으로써(Mirkes & Little, 1998) 산모의 고열은 세포자멸사를 일으키는 것으로 이미 입증되어있다.

그러나 세포자멸사로부터 세포를 보호하는 단백질이 있으며, 그중 Bcl-2와 heat shock protein 70 (Hsp70)이 대표적인 단백질이다. Bcl-2는 스트레스 유도 세포자멸사에서 미토콘드리아 경로를 통한 세포자멸사의 신호들을 활성화시키는데 있어 중추적인 역할을 한다(Delchev et al., 2006). 즉 미토콘드리아에 의존하여 세포의 죽음을 예방하는 것이다(Yang et al., 1997; Salvesen & Dixit, 1997).

Hsp70은 세포자멸 자극에 의해 유도되고, 열내성인자의 역할을 함으로써 세포를 보호한다고 알려져 있다(Mirkes et al., 1999). 일반적으로 Hsp는 molecular chaperone으로서 역할을 하며, 분자량에 26, 60, 90, 70 및 110 kDa 으로 분류되고, 운동, 고열 그리고 산화적 스트레스와 같은 다양한 자극에 반응하여 유도된다

* 논문 투고일 : 2008. 6. 14.

* 게재 확정일 : 2008. 9. 22.

* 이 논문은 2007년 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성 사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음 (KRF-2007-000-0000-5739)

저자 연락처 : 김원규(kimwg@hanyang.ac.kr)

(Kregel, 2002). 따라서 고열에 노출된 태아에서 열내성 인자인 Hsp70의 발현 유도는 고열에 의한 기형유발로부터 태아를 보호한다고 제시되어 있다(Mirkes et al., 1999).

한편 임신 중에 고강도의 운동은 태아의 성장, 크기, 그리고 체온을 변화시킬 수 있다. 하지만 30분미만의 중.저강도 운동은 산모와 태아를 안정시키는데 긍정적인 효과를 제공해 준다. 즉 에너지를 증가시키고, 수면에 도움을 주며, 허리통증을 감소, 체중을 조절, 체력과 지구력을 증가시킨다(Gorski., 1985; Wang & Apgar., 1998; Wolfe & Weissgerber., 2003). 뿐만 아니라 태아의 뇌기능을 향상(Lee et al., 2006) 시키고, 태아와 산모에게 있어서 혈장량(plasma volume), 용모사이공간(intervillous space)의 혈액량, 태반기능(placental function)을 증가(Clapp, 2003)시키고 임신성고혈압 및 당뇨 등을 예방하거나 치료하는데 도움을 준다(Wolfe & Weissgerber., 2003). 흔히 운동은 항산화효소의 발현을 증가시켜 DNA 손상으로부터 세포를 보호하고(Fehrenbach & Northoff, 2001) Hsp70의 발현을 증가시킴으로써 산화적 손상으로부터 세포를 보호하는 효과를 가지고 있다고 알려져 있다(Powers et al., 1998).

Jin et al.(2000)의 연구결과에 의하면 운동이 세포자멸사를 억제하여 조직손상을 예방하고, 이진 등(2007)의 실험에서도 규칙적인 수영운동은 Bcl-2의 발현을 증가시켜 세포자멸사를 억제시킨다고 보고된 바 있다.

따라서 임신 중에 운동은 세포를 보호할 뿐만 아니라 발생 중인 태아를 보호하는 역할에 대하여 그 가능성을 제시해 볼 필요가 있을 것으로 생각된다. 그러나 지금까지의 연구 결과들은 고열에 따른 선천성기형에 대해 중점을 두고 이루어져 왔다. 따라서 고열노출에 따른 태아손상에 있어서 모체의 운동이 세포자멸사로부터 태아를 보호할 수 있다는 것을 비교분석한 기초자료가 요구되는 실정이다.

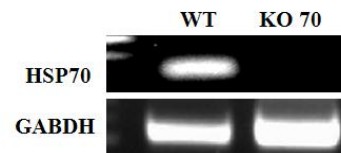
최근에 Hsp70 knockout (KO) 생쥐를 사용함으로써, Hsp70의 직접적인 역할은 규명되었지만(Choi et al., 2005) 운동전처치를 통해 고열에 노출된 태아에게서 세포자멸사와 Hsp70의 직접적인 관계는 아직까지 알려지지 않았다. 따라서 본 연구자들은 임신한 산모 쥐에게 추천되고 있는 수영운동을 적용(Hartmann & Bung., 1999)시켜 Hsp70이 세포자멸사와 직접적으로 관련되어 있음을 보다 명확하게 규명하고자 Hsp70 유전자가 결핍된 생쥐를 이용하였으며, 고열에 노출된 태아에게서 나타나는 세포자멸사가 모체의 운동을 통해 어떻게 변화하

는지 알아보기 위해서 임신한 생쥐에게 운동을 시행한 후 고열에 노출시켰다. 세포자멸사의 형태학적 변화를 TUNEL 염색을 통하여 현미경으로 관찰하였으며, Bcl-2와 Hsp70 단백질의 발현양상을 비교하여 운동의 항세포자멸사 효과를 제시하고자 한다.

연구 방법

실험동물

본 연구에서는 Hsp70을 유전자조작법으로 결손시킨 C57/BL6계 생쥐(Hsp70 KO)와 C57/BL6계 생쥐(wild type: WT)를 사용하였다. KO 생쥐는 미국 Mutant Mouse Regional Resource Centers (<http://www.mmrrc.org/strains/372/0372.html>)에서 미국 텍사스 소재 A&M 대학교 수의학과 Dr. Mirkes 교수가 분양받아 기증하였다(Schmitt et al., 2003). Hsp70 KO생쥐의 유전자형은 2개의 primer(Forward: 5'-GTA CAC TTT AAA CTC CCT-3', Reverse: 5'-CTG CTT CTC TTG GTC TCG-3')를 사용하여 생쥐꼬리조직에서 PCR로 유전자 존재여부를 확인했다(아래그림 참고).



임신유도

생쥐의 임신을 유도하기 위해 야간에 암컷 2마리와 수컷 2마리를 한 우리에 넣어 교배시켰고, 다음날 아침 vaginal plug이 관찰되면 임신 0일로 정하였다. 임신된 각 WT(n=20)과 KO(n=20) 군을 각각 5마리씩 배정하여 대조군(C: n=5), 운동군(E: n=5), 운동고열군(ex+H: n=5), 그리고 고열군(H, n=5)으로 나누어 분류하였다. 운동기간은 임신이 확인된 다음날부터 임신제 8일까지 총 8일간 시행하였다. 실험동물은 실험기간 동안 표준사료와 물을 무제한 공급하였고, 온도(22±1℃)와 습도(60±3%), 그리고 조명(12시간 light/dark

cycle)은 자동 조절에 의해 사육 되었다.

운동방법

운동방법은 산모와 태아의 안전을 고려한 중저강도의 수영방법으로서 Lee et al.(2006)와 Baunack et al.(1984)의 수영방법을 인용하였다. 운동군은 수심 30 cm, 수온 31-33℃의 실험동물용 수조(가로: 30cm x 세로: 70cm x 높이: 50cm)에서 생쥐 스스로 자유롭게 수영을 시행하였으며, 임신이 확인된 1일부터 8일까지 동일 시간대(오전 10:00)에 10분씩 실시하였다.

수영운동직후 생쥐의 생리학적 스트레스인 체온감소를 예방하기 위해서 원적외선조명을 이용하여 체온을 유지시킨 후 사육실로 옮겨졌다.

산모고열유도방법

고열유도방법은 김원규(2005)의 실험방법을 인용하였다. 임신이 확인된 날로부터 8일째 되는 날 열충격을 시행하였다. 임신한 WT과 KO 군 산모를 구멍이 뚫린 50ml 튜브에 넣고, 탐침(probe)이 부착된 디지털체온계를 임신생쥐의 직장에 삽입한 후 43℃의 수조에 담근다. 열충격 동안 수조의 온도는 43℃로 일정하게 유지하였고, 임신생쥐의 직장체온이 43℃에 도달하는 시점에서 5분간 유지하였다. 열충격이 끝난 후 저체온을 방지하기 위하여 물기를 닦은 후 37℃ 부양기 속에 물기가 제거 될 때까지 넣어두었다.

조직 처리

임신한 WT과 KO 생쥐는 임신 제 9일과 11일에 경추탈골법으로 희생시키고, Hanks 용액(culture media용액으로서 태아적출시 일반적으로 사용)내에서 태아를 적출하여 생존된 생쥐태아와 유산된 생쥐태아를 분리하였다. 임신 제 9일에 적출한 생쥐태아는 생존된 태아만 western blot을 하기 위해 -70℃에 보관 하였고, 임신 제 11일에 적출한 태아는 TUNEL염색을 위하여 0.1% glutaraldehyde 4% paraformaldehyde 혼합용액(pH 7.4)에서 고정시킨 후 통상적인 조직표본제작법에 따라 파라핀 포매한 후 5-6 μ m로 절편 하였다.

Western Blot

-70℃ 초저온 냉동고에 보관된 생쥐태아는 lysis 완충액과 함께 homogenizer를 이용하여 조직을 균질화 하였다. 균질액은 4℃에서 13000x g 으로 15분간 원심분리한 후 상층액을 Bradford(1976)법에 따라 총 단백질량을 정량하였다. 정량된 단백질은 30 μ g으로 10% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동 후 PVDF membrane (Amersham Bio, UK) 으로 전이시켰다. 전이된 membrane은 TBST 완충액과 함께 5% skim milk를 첨가한 후 1시간동안 실온에서 blocking 시켰다. HSP70의 1차항체는 1: 1000 (Stressgen, USA), Bcl 2의 1차항체는 1: 1000 (Cell Signaling, USA)으로 각각 첨가된 5% skim milk용액을 희석한 후 4℃에서 overnight 하였다. 이어서 TBST 완충액으로 10분간 3회 세척한 후 2차항체(1: 5000)를 첨가된 5% skim milk용액과 함께 희석시킨 후 1시간동안 실온에서 반응시켰다. 이후 TBST 완충액으로 10분간 3회 세척한 후 ECL substrate (Amersham Bio, UK)로 1분간 발색한 후 X-ray film(Kodak, NY)를 이용하여 현상하였다. 단백질농도측정은 Gel doc 2000(Bio Rad, ITALY)를 이용하여 농도를 정량하였으며, 정량된 단백질의 농도를 수치화하여 WT의 C그룹을 기준으로 다른 그룹간의 차이를 나타내었다.

TUNEL 염색

세포자멸사를 관찰하기 위하여 ApoTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, USA)을 사용하였다. Slide는 xylene으로 탈 파라핀하고 함수과정을 거친 후 TUNEL방법을 시행하였다. Slide는 실온에서 protein K (Chemicon, USA)에 15분간 처리한 후 증류수로 2회 세척하였다. 3% H₂O₂용액에서 4분간 처리하고 DW로 3회 세척한 후 equilibrium buffer로 10분간 반응시킨 후 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)를 2:1비율로 1시간 동안 37℃ 배양기에서 반응시켰다. Stop-Wash buffer에 10분간 반응시킨 다음 PBS로 3회 세척한 후 anti-digoxigenin에 30분간 반응시켰다. PBS로 3회 세척한 후 DAB로 3분간 발색한 후 methylgreen으로 3분간 대조염색한 후 탈수, 청명과정을 거친 후 permount로 봉입하고 광학 현미경으로 관찰하였다.

Apoptosis 수의 산정 및 분석

Apoptosis 양성인 세포의 수를 산정하기 위해 조직 내부를 구분하여 겹치지 않도록 x 400배에서 7시야를 찍어 계수하였으며 평균치를 내어 통계 처리하였다.

통계 처리

자료처리실험결과에 대한 통계처리 방법은 SPSS 12.0을 이용하여 각 그룹별 자멸된 세포 수, Hsp70, 그리고 Bcl-2 단백질변화에 대한 평균과 표준오차를 산출하였으며, 측정변인별 평균 차이 검증을 위하여 이원변량측정 (Two way ANOVA)을 하여 분석하였다. 모든 통계치의 유의확률은 $P(0.05)$ 로 설정하였다.

연구 결과

태아의 생존률

적출한 태아의 생존률은 <표 1>에서 나타난 것처럼, WT과 Hsp70 KO의 대조군은 모두 생존하였다.

표 1. Survival rates (unit : %)

	WT	Hsp70 KO
① C	100	100
② E	100	98.3±3.7
③ ex+H	98.6±6.7	75.2±5.4#
④ H	85.4±5.3	59.2±6.2**

Value are mean ±SEM, Difference between groups : * $p<0.05$, ** $p<0.001$.

① C: 대조군 ② E: 운동군 ③ ex+H: 운동고열군 ④ H: 고열군
ex+H vs H : $p<0.05$, ** C vs H : $p<0.001$

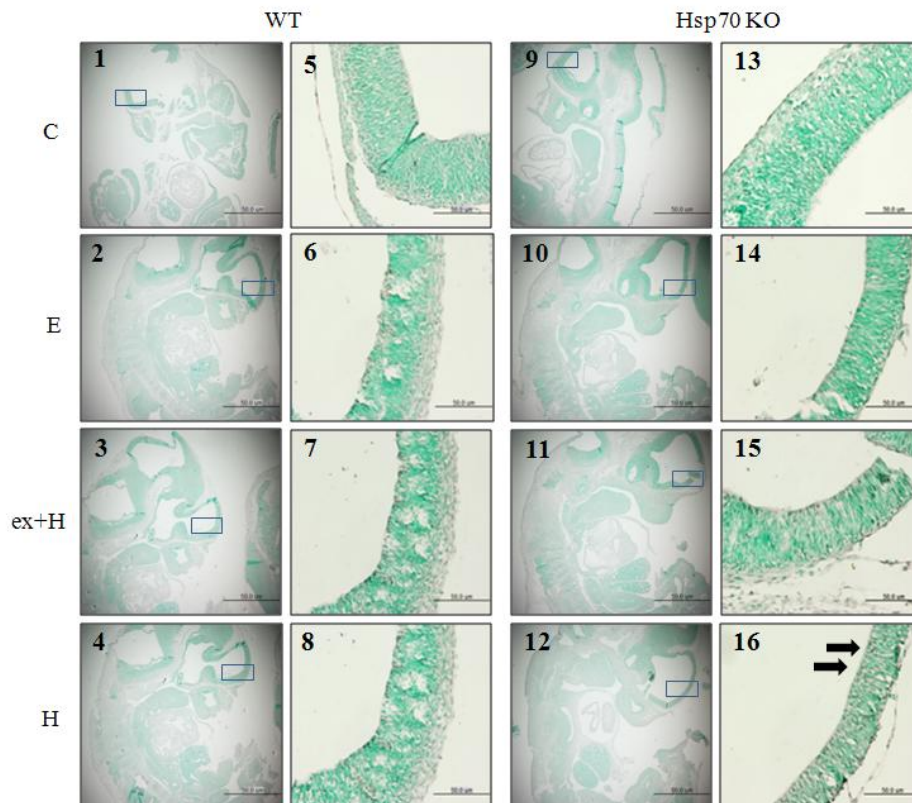


그림 1. Photographs of apoptosis 40 x magnification in head (WT: 1~4, KO: 9~12) of GD 11 fetuses by TUNEL stain. Higher magnification (400 x) of the boxed head regions in WT (5~8) and KO (13~16). Apoptotic cells in H group (16) of Hsp70 KO (see arrow) are significantly increased compared to other groups and arrows are indicate the apoptotic cells.

그러나 Hsp70 KO 고열군의 생존률은 대조군에 비해 유의하게 감소(59.2%, $p<.001$)하였지만, 운동고열군은 고열군에 비해 유의하게 증가(75.2%, $p<.05$)하였다.

Hsp 70 및 Bcl-2의 변화

생쥐태아에서 Hsp70 단백질 발현양상을 관찰한 결과, WT의 운동고열군은 대조군에 비해 유의한 차이가 나타나지 않았지만, 고열군에서는 다른 세 군에 비해 가장 높게 ($p<.001$) 발현된 것으로 보여주었다.

반면 Hsp70 KO의 모든 그룹에서 Hsp70 단백질 발현은 WT에 비해 유의하게 발현되지 않았다($p<.001$) (그림 2-A, B).

WT과 Hsp70 KO군의 Bcl-2 단백질 발현양상을 관찰한 결과, WT과 Hsp70 KO의 고열군은 다른 군에 비해 유의하게 감소($p<.001$)된 것으로 나타났다. 반면 운동고열군은 각각의 고열군에 비해 유의하게 높은($p<.001$) Bcl-2 단백질 발현양상을 보여 주었다(그림 2-A, C).

세포자멸사의 조직학적 소견

산모 생쥐에게 운동을 적용시킨 후 고열 노출에 따른 각 군별 세포자멸사를 규명하기 위해 자멸된 세포의 수를 산정하였다. 그 결과, WT에서의 고열군은 다른 3군에 비해 자멸된 세포의 수가 유의한 차이로 높게($p<.05$) 관찰되었다. 또한 Hsp70 KO에서도 고열군이 다른 군들에 비해 유의하게 증가($p<.001$)된 것으로 나타났다.

반면 Hsp70 KO의 운동고열군은 고열군에 비해 자멸된 세포의 수가 두드러지게 감소($p<.05$)되었으나, 대조군보다는 높게 나타났다(그림 1)(표 2).

표 2. 세포자멸사의 조직학적 변화

	C	E	ex+H	H
WT	18.1± 4.6	16.4± 5.5	18.1± 4.4	26.8± 2.8*
Hsp 70 KO	17.9± 6.0	18.1± 5.2	25.8± 6.1#	41.8± 3.9**

Values are mean ± SEM (n=5 maternal).

Difference between groups : #, *: $p<.05$, ##, **: $p<.001$.

ex+H vs H : $p<0.05$, ** C vs H : $p<0.001$.

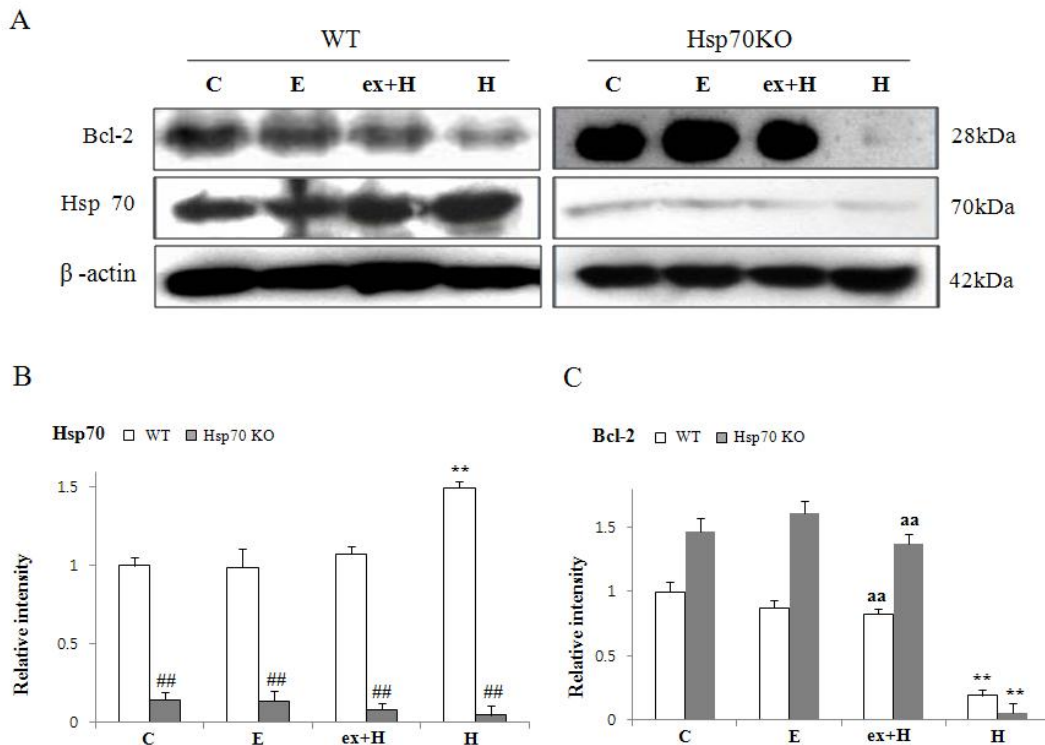


그림 2. Note western blot band(A) and graph(B, C) of Hsp70 and Bcl-2 proteins. Hsp70 protein expression in H group of WT is significantly increased compared to other groups. Bcl-2 protein expression in H group of WT and Hsp70 KO is significantly decreased compared to other groups. Values are mean ± SEM (#, *: $p<.05$; ##, aa, **: $p<.001$). ## WT vs Hsp70 KO : $p<0.001$, ** C vs H : $p<0.001$, aa H vs ex+H : $p<0.05$.

고 찰

임신 중 고열은 사람을 비롯하여 모든 동물 종(species)에서 선천성기형을 일으키는 기형유발물질로 제기되어 왔다(Lundberg et al., 2003). 임신 초기에 사우나를 비롯한 열탕, 독감을 포함한 열성질환, 그리고 고온에서의 운동 등이 산모의 체온을 증가시킬 수 있으며(Sasaki et al., 1995), 고열에 의한 선천성 기형은 세포자멸사현상이 나타난다고 한다. 이는 고열에 노출된 이후 태아의 세포에서 caspase가 활성화되고(Mirkes & Little, 2000) 미토콘드리아에서 cytochrome c를 방출하기 때문이다(Kim & Mirkes, 2003). 또한 cytochrome c는 Bax의 이동과 함께 동시에 방출되며, 결국 caspase 9과 3의 활동은 분할(cleavage) caspase 9의 활동을 증가시켜 세포자멸사를 일으킨다(Cao et al., 2001; Mirkes & Little, 2000)고 보고되어 있다. 지금까지 고열에 의한 세포자멸사의 기전에 관한 연구는 활발히 진행되어 왔지만 그 방어 기전에 대한 연구는 매우 부족하다. 특히 운동이 세포자멸사를 억제한다는 연구결과가 있음에도 불구하고 고열노출로 손상된 태아 보호효과에 관한 기전은 명확하게 보고된 바가 없다. 뿐만 아니라 고열노출에 있어서 운동수행 전처치효과와 관련된 항세포자멸사에 대한 연구는 아직까지 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 고열에 노출시키기 전 운동을 적용시켜 자멸된 세포의 변화를 관찰하여 태아를 보호하는 운동의 효과를 규명하고자 Hsp70 유전자가 결손된 C57/BL6계 생쥐를 사용하여 운동을 시행한 후 고열에 노출시켰다.

Hsp70은 스트레스에 반응하여 발현되며, 미토콘드리아를 조절(Li et al., 2000)하고, cytochrome c의 방출을 억제시킴으로써 열충격에 의해 유도되는 세포의 죽음으로부터 세포자멸현상을 억제하기 때문이다(Mosser et al., 2000) 세포자멸현상이 억제되는 것이다. 하지만 이것의 결핍은 cytochrome c의 downstream과 caspase 3의 upstream을 활성화시키기 때문에(Li et al., 2000) 세포자멸사를 일으킨다.

본 연구에서도 임신된 Hsp70 KO 생쥐를 사용하여 고열에 노출시킨(임신 제 8일) 다음날(임신 제 9일) 태아의 생존률은 유의하게 감소된 것으로 나타났고, Hsp70의 발현은 매우 미약했으며, 자멸된 세포의 수는 증가된 것으로 나타났다. 반면 WT 생쥐에서는 고열노출에 의해 Hsp70의 발현이 증가되었고, 자멸된 세포의 수는 대조군

에 비해 증가하였지만 유의한 차이는 나타나지 않았으며, WT 군에서 보다 Hsp70 KO 태아에서 세포자멸사가 더 많이 나타났다(표1, 2)(그림1, 2). 이러한 결과는 선행연구를 토대로 알 수 있듯이 열노출에서 Hsp70의 발현증가는 세포자멸사를 예방하여 태아를 보호하지만, 이것의 발현억제는 태아손상으로부터 보호하지 못한 것으로 판단된다. 흥미롭게도 본 연구에서는 Hsp70유전자가 결손된 생쥐임에도 불구하고 Hsp70의 미약한 발현을 보여주었다. 이는 Hsp70은 Hsp70.1과 Hsp70.3인 두 종류의 단백질로 이루어져 있으며, 이들은 한 개의 아미노산만이 다르기 때문에 western blot에서 약한 반응이 일어난 것(Dix et al., 1998)으로 생각된다.

김원규(2005)의 보고에 의하면 임신한 Hsp70 KO 생쥐를 고열에 노출한 결과 72.6%가 선천성기형(뇌탈출증, 무안증, 신경세포자멸사, 연골속뼈발생지연)이 나타났다고 하였으며, 이는 산모의 고열이 발생중인 태아의 미토콘드리아의 기형을 일으켜 세포자멸을 유발한 것이라고 보고한 바 있다(Kim & Mirkes, 2003). 그러므로 세포자멸사는 고열에 의해 유도되지만, Hsp70유전자 결핍에서는 더욱 확실하게 증가함을 본 실험을 통해 증명하였다(그림 1, 2).

한편 항세포자멸사 단백질인 Bcl-2는 미토콘드리아에서 cytochrome c 방출과 caspase 9의 활동을 억제시킴으로써 세포자멸사 신호를 조절한다(J äättelä, 1999). 즉 스트레스로 유도된 세포자멸사에서는 미토콘드리아 쪽으로 세포자멸신호들을 이동시키는데 Bcl-2가 중추적인 역할을 한다(Delchev et al., 2006).

본 연구에서 고열에 노출된 WT과 Hsp70 KO 태아에서 Bcl-2 발현은 두 군 모두 유의하게 감소된 것으로 나타났다. 그러나 WT과 Hsp70 KO 생쥐의 운동고열군에서 Bcl-2 발현은 고열군에 비하여 뚜렷하게 높은 발현을 보여주었다. 뿐만 아니라 자멸된 세포수 역시 고열군에 비해 유의하게 증가되지 않은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 운동이 미토콘드리아에서 방출되는 Bcl-2를 증가시키기 때문에 Bax의 활동이 억제되어(Siu et al., 2004) 최종적으로 세포자멸현상이 감소된 것으로 생각된다. 게다가 고열과 같은 스트레스에 노출된 미토콘드리아는 ROS (reactive oxygen species) 생성을 조절(Halliwell & Gutteridge, 1989)하기 때문에 최종적으로 세포자멸사를 일으킨다(Buttke & Sandstrom, 1994). 하지만 운동은 Hsp의 발현을 증가시켜 세포자멸로부터 조직들을

보호하며(Powers et al., 1998; Walsh et al., 2001; van Ginneken et al., 2006), 특히 산모취에서 생성된 ROS생성은 수영운동을 통해 항산화효소를 증가시켰기 때문에(Osorio et al, 2003) 태아손상을 예방한 것으로 사료된다.

최근 산화적손상으로부터 조직손상을 보호하기 위한 노력이 다양한 분야에서 이루어지고 있으며, 특히 운동처치는 매우 긍정적으로 보고되어 있다. Ding et al.(2006)은 뇌허혈모델 쥐를 대상으로 유산소 운동전처치를 시행한 후 TNF-alpha I 과 II의 발현이 억제되어, 허혈성 뇌손상이 감소시켜 운동의 효과를 증명하였다. Domenech (2006)도 운동전처치에 따라 심근경색부위가 줄었기 때문에 심혈관질환으로부터 예방할 수 있다고 하였다. 게다가 Hartmann & Bung(1999)의 보고에 의하면, 임신중수중(aquatic)운동은 체온조절과 관절을 보호하기 때문에 가장 많이 추천한다고 하였다.

그러므로 고열에 노출되기 전 10분간의 수영운동전처치는 Hsp70의 발현이 억제되었음에도 불구하고 태아조직에서 Bcl-2의 발현을 증가시켜 세포자멸사를 감소시키는 효과를 본 실험을 통해 증명하였다.

이상 여러 학자들의 실험과 임상보고에 따라 운동은 세포자멸사로부터 조직을 보호하는 것으로 알려져 있지만, 고열에 노출시킨 후 세포자멸사를 유도하기 위하여 항세포자멸사 단백질인 Hsp70을 knock-out한 생쥐를 이용한 본 연구와 같이 운동의 효과와 항세포자멸사 단백질인 Bcl-2의 발현 변화, 그리고 세포자멸사의 변화를 조직학적 분석을 통해 연구한 것은 거의 보고 된 바가 없다. 따라서 고열노출전 운동처치는 태아의 생존률을 높이고, 항세포자멸사인 Bcl-2단백질을 증가시켜 세포자멸사를 억제시키는 효과가 있는 것을 본 연구에서 western blot과 TUNEL assay 염색법을 통하여 규명할 수 있었다. 그러나 고열에 노출된 태아에게서 세포자멸사를 유발시키는 주요인자들은 여러 가지 있으며, 이를 활성화 및 억제시키는 인자 또한 다양하므로 운동을 통해 이들 연관인자들의 상호관계에 대한 연구는 다양한 방법에서 더욱 접근할 필요가 있는 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 고열에 노출되어 손상받은 태아의 보호 및

세포자멸사에 대한 운동의 방어효과를 규명하기 위해 임신한 Hsp70 KO 생쥐를 이용하여 8일간 운동을 실시한 후 고열(43℃)에 노출하였고, 다음날인 임신 제 9일에 태아를 적출하여 태아의 생존률을 조사하였다. 또한 태아조직에서 항세포자멸사 단백질인 Hsp70과 Bcl-2를 분석하였으며, 임신 제 11일째 태아를 적출하여 세포자멸사를 TUNEL 염색법을 시행하여 자멸된 세포의 수를 측정함으로써 운동이 고열에 의한 태아의 손상 예방효과를 규명하고자 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. Hsp70 KO 태아의 생존률은 고열에 노출된 다음날 급격히 증가하였지만($p < .001$) 운동을 적용한 운동고열군은 고열군에 비해 유의하게 감소하였다($p < .05$).
2. Hsp70 단백질발현은 모든 Hsp70 KO 군에서 거의 미약한 발현양상을 나타내었다. 그러나 WT에서는 Hsp70 단백질을 모두 발현하고 있었으며, 특히 고열군에서 높은 발현양상을 보였다.
3. Bcl-2 단백질발현은 WT과 Hsp70 KO 군의 고열군에서 약한 발현을 나타내었지만, 두 군의 운동고열군은 고열군에 비해 감소되지 않았다.
4. 태아조직에서의 세포자멸사 분포는 Hsp70 KO군의 고열군에서 뚜렷하게 증가되어 있었지만($p < .001$), 운동고열군은 고열군에 비하여 감소하였다.

이상의 결과를 요약하면 고열노출 전 운동수행은 태아의 생존률을 증가시킬 뿐만 아니라 태아조직내 세포자멸사를 억제시키기 위해 Bcl-2 발현을 증가시킨 것으로 생각된다. 또한 운동은 고열노출상태에서 Bcl-2 발현을 향상시키는 효과가 있었음을 알 수 있었다. 따라서 고열 노출전 운동은 태아의 생존 및 Bcl-2 발현증가와 동시에 세포자멸사를 억제시킴을 본 실험을 통해 알 수 있었다.

참고문헌

- 김원규(2005). 모체고열이 C57/BL6계 Hsp 70 KO 태아 발생에 미치는 영향. 대한 체질인류학회지, 18, 105-113.
- 이진(2008). 노화된 생쥐의 근육에서 규칙적인 운동의 효과: 세포자멸사와 근육형성조절인자의 변화. 한국체육학회, 47, 411-419.
- 이진, 조형숙, 김원규(2007). 규칙적인 운동이 고혈압원인의 심장에서 Bcl-2 발현 및 Apoptosis 변화에 미치는 영향. 체육과학연구, 17, 45-54.

- Baunack, E., Falk, U., & Gärtner. (1984). Monozygotic vs. Dizygotic twin behavior in artificial mouse twins. *Genetics*, **106**, 463-477.
- 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.
- Buttke, T. M., & Sandstrom, P. A. (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today*, **15**, 7-10.
- Cao, G., Minami, M., Pei, W., Yan, C., Chen, D., O Horo, C., Graham, S. H., & Chen, J. (2001). Intracellular Bax translocation after transient cerebral ischemia: implications for a role of the mitochondria apoptosis signaling pathway in ischemic neuronal death. *J Cereb Blood Flow Metab*, **21**, 321-33.
- Clapp, J. F 3rd. (2003). The effects of maternal exercise on fetal oxygenation and feto-placental growth. *Eur J obstet Gynecol Reprod Biol*, **110**, s80-s85.
- Choi, S., Park, K. A., Lee, H. J., Park, MS., Lee, J. H., Park, K. C., Kim, M., Lee, S. H., Seo, J. S., & Yoon, B. W. (2005). Expression of Cu/Zn SOD protein is suppressed in hsp 70.1 knockout mice. *J Biochem Mol Bio*, **38**, 111-114.
- Ding, Y. H., Mrizek, M., Lai, Q., Wu, Y., Reyes, R Jr., Li, J., Davis, W. W., & Ding, Y. (2006). Exercise preconditioning reduces brain damage and inhibits TNF- α receptor expression after hypoxia/ reoxygenation: an in vivo and in vitro study. *Curr Neurovasc Res*, **3**, 263-71.
- Dix, D. J., Garges, J. B., Hong, R. L. (1998). Inhibition of hsp70-1 and hsp70-3 expression preimplantation embryogenesis and heightens embryo sensitivity to arsenic. *Mol Reprod Dev*, **51**, 373-380.
- Delchev, S. D., Georgieva, K. N., Koeva, Y. A., & Atanassova, P. K. (2006). Bcl-2/Bax ratio, mitochondrial membranes and aerobic enzyme activity in cardiomyocytes of rats after submaximal training. *Folia Med*, **48(2)**, 50-56.
- Domenech, R. J. (2006). Precondition. A new concept about the benefit of exercise. *Circulation*, **113**, e1-e3.
- Fehrenbach, E., & Northoff, H. (2001). Free radical, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exerc Immunol Rev*, **7**, 66-89.
- Gorski, J. (1985). Exercise during pregnancy: maternal and fetal responses. A brief review. *Med Sci Sports Exerc*, **17**, 407-416.
- Halliwell, B., & Gutteridge, JMC. (1989). Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, *Oxford University Press, New York*.
- Hartmann, S., & Bung, P. (1999). Physical exercise during pregnancy-physiological considerations and recommendations. *J Perinat Med*, **27**, 204-215.
- Jäättelä, M. (1999). Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res*, **248**, 30-43.
- Jin, H., Yang R., Li, W., Lu, H., Ryan, A. M., Ogasawara, A. K., Peborgh, J. V., & Paoni, N. F. (2000). Effects of exercise training on cardiac function, gene expression, and apoptosis in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **279**, H2994-3002.
- Kim, W. K., & Mirkes, P. E. (2003). Alterations in mitochondrial morphology are associated with hyperthermia-induced apoptosis in early postimplantation mouse embryos. *Birth defects Res A Clin Mol Teratol*, **67**, 929-940.
- Kregel, K. C. (2002). Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol*, **92**, 2177-2186.
- Lee, H. H., Kim, H., Lee, J. W., Kim, Y. S., Yang, H. Y., Chang, H. K., Lee, T. H., Shin, M. C., Lee, M. H., Shin, M. S., Park, S., Beak, S., & Kim, C. J. (2006). Maternal swimming during pregnancy enhances short-term memory and neurogenesis in the hippocampus of rat pups. *Brain Dev*, **28**, 147-154.
- Li, C. Y., Lee, J. S., Ko, Y. G., Kim, J. I., & Seo, J. S. (2000). Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem*, **275**, 25665-25671.
- Lundberg, Y. W., Wing, M. J., Xiong, W., Zhao, J., & Finnell, R. H. (2003). Genetic dissection of hyperthermia-induced neural tube defects in mice. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, **67**, 409-413.
- Mirkes, P. E., & Little, S. A. (1998). Teratogen-induced cell death in postimplantation mouse embryos: differential tissue sensitivity and hallmarks of apoptosis. *Cell death Differ*, **5**, 592-600.
- Mirkes, P. E., & Little, S. A. (2000). Cytochrome c release from mitochondria of early postimplantation murine embryos exposed to 4-hydrozycyclophosphamide, heat shock, and staurosporine. *Toxicol Appl Pharmacol*, **162**, 197-206.
- Mirkes, P. E., Cornel, L. M., Wilson, K. L., & Dilmann, W.

- H. (1999). Heat shock protein (Hsp70) protects postimplantation murine embryos from the embryolethal effects of hyperthermia. *Dev Dyn*, **214**, 159-170.
- Mosser, D. D., Caron, A. W., Bourget, L., Meriin, A. B., Sherman, M. Y., Morimoto, R. I., & Massie, B. (2000). The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*, **20**, 7146-7159.
- Martinez-Frias, M. L., Garcia Macario, M. J., Caldas, C. F., Conejero Gallego, M. P., Bermejo, E., & Rodriguez-Pinilla, E. (2001). High maternal fever during gestation and congenital limb disruptions. *Am J Med Genet*, **98**, 201-203.
- Osorio, R. A. L., Christofani, J. S., D'Almeida, V., Russo, A. K., & Picarro, I. C. (2003). Reactive oxygen species in pregnant rats: effects of exercise and thermal stress. *Comp Biochem Physiol Pharmacol*, **135**(1), 89-95.
- Powers, S. K., Demirel, H., Coombes, J. S., Naito, H., Hamilton, K. L., Shanely, R. H., & Jessup, J. (1998). Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Physiol*, **275**, R1468-1477.
- Salvesen, G. S., & Dixit, V. M. (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, **91**, 443-446.
- Sasaki, J., Yamaguchi, A., Nabeshima, Y., Shigemitsu, S., Mesaki, N., & Kubo, T. (1995). Exercise at high temperature causes maternal hyperthermia and fetal anomalies in rats. *Teratology*, **51**, 233-236.
- Schmitt, E., Parcellier, A., Gurbuxani, S., Cande, C., Hammann, A., Morales, M. C., Hunt, C. R., Dix, D. J., Kroemer, R. T., Giordanetto, F., Jäättelä, M., Penninger, J. M., Pance, A., Kroemer, G., & Garrido, C. (2003). Chemosensitization by a non-apoptogenic heat shock protein 70-binding apoptosis-inducing factor mutant. *Cancer Research*, **63**(23), 8233-8240.
- Siu, P. M., Bryner, R. W., Martyn, J. K., & Alway, S. E. (2004). Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. *FASEB J*, **18**, 1150-1152.
- Takle, H., McLeod, A., & Andersen, O. (2006). Cloning and characterization of the executioner caspases 3, 6, 7 and Hsp70 in hyperthermic Atlantic salmon (*Salmo salar*) embryos. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Bio*, **144**, 188-198.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P., & Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, **275**, 1129-1132.
- van Ginneken, M. M., de Graaf-Roelfsema, E., Keizer, H. A., van Dam, K. G., Wijnberg, I. D., van der Kolk, J. H., & van Breda, E. (2006). Effect of exercise on activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, c-Jun NH2 terminal kinase, and heat shock protein 27 in equine skeletal muscle. *Am J Vet Res*, **67**(5), 837-844.
- Walsh, R. C., Koukoulas, I., Garnham, A., Moseley, P. L., Hargreaves, M., & Febbraio, M. A. (2001). Exercise increases serum Hsp72 in humans. *Cell Stress Chaperones*, **6**, 386-393.
- Wang, T. W., & Apgar, B. S. Exercise during pregnancy. *Am Fam Physician*, **57**, 1857.
- Wolfe, L. A., & Weissgerber, T. L. (2003). Clinical physiology of exercise in pregnancy: a literature review. *J Obstet Gynaecol Can*, **25**, 451-453.

Effects of Exercise on Hsp70 Knock-out Mice Fetuses Exposed to Maternal Hyperthermia

Jin Lee^a, Won-Kyu Kim^a, & Chang-Sub Shim^b

Hanyang University^a, & Kook-Je college^b

Maternal hyperthermia is characterized by the regulation of heat shock protein 70 (Hsp70) and induction of apoptosis in various experimental animals. The present study was designed to examine the changes of apoptosis by Hsp70 and Bcl-2 proteins expression followed by hyperthermia after exercise by using Hsp70 knock-out(KO) pregnant mice. We performed exercise in pregnant mice, estimated survival ratio (SV), and measured Hsp70 and Bcl-2 protein on embryo day (ED) 9, and performed TUNEL stain for apoptosis on ED 11.

Method: Pregnant mice, C57/BL6 strain (Wild type: WT) and Hsp70 KO, were divided into 4 groups as follows: (1) control group (C), (2) exercise group (E), (3) exercise + hyperthermia group (ex+H), (4) hyperthermia group (H). The pregnant mice were induced to swim (10min) for 8 days and then exposed to hyperthermia (43°C, 5min) on ED 8.

Survival fetuses on ED 9 and ED 11 were collected. Results showed that the SV in WT groups was not different in each group. However SV in ex+H groups of Hsp70 KO was significantly increased ($p<.001$) and higher ($p<.05$) than H group. Hsp70 expression was significantly increased in H group of WT and not different in all groups of Hsp 70 KO. Interestingly, Bcl-2 expression, which is related with anti-apoptosis, was markedly decreased in H group of WT ($p<.05$) and Hsp70 KO ($P<.001$), and ex+H groups of WT and Hsp70 KO were higher than H group. Numbers of apoptotic cells in H group of Hsp70 KO were higher than any other groups, whereas those of ex+H group were lower than H group.

These results suggest that Hsp70 is positively correlated to the hyperthermia induced apoptosis. Exercise reduces the embryonic death and apoptotic changes by increasing Bcl-2 expression in Hsp70 KO mice. Thus, exercise may have protective roles against embryonic damage exposed to maternal hyperthermia.

key words: Hyperthermia, Exercise, Hsp70, Apoptosis 