

저항성 운동 시 동물성 단백질과 식물성 단백질 섭취량에 따른 흰쥐 골격근의 동화작용 반응

Anabolic reactions of skeletal muscles in mice following plant- and animal-based protein intake during resistance exercise

김동연(한국체육대학교 석사) · 안성환(한국체육대학교 교수) · 윤창선(한국체육대학교 교수) · 조준용(한국체육대학교 교수)*

Dong-Yeon Kim(Korea National sport Univ) · Sung-Hwan Ahn(Korea National sport Univ) · Chang-Sun Yoon(Korea National sport Univ) · Joon-Yong Cho(Korea National sport Univ)

요약

본 연구의 목적은 저항성 운동과 류신(L-Leucine) 및 아르기닌(L-Arginine)의 섭취가 근육 합성의 주요 인자 발현에 미치는 영향과 신체 기능을 비교하여 효과를 규명하고자 한다. 실험동물은 ICR을 사용 하였으며, 집단 당 10마리씩 4집단으로 나누어 Control Group(CON; n=10), Exercise Group(EXE; n=10), L-Leucine+Exercise Group(LEX; n=10), L-Arginine+Exercise Group(AEX; n=10)으로 사용했다. 8주간 주 3회 저항성 운동을 실시하였으며, 류신과 아르기닌을 54g/L로 희석하여 0.135g/kg씩 저항성 운동 후 한 시간 이내로, 주 5회 구강투여 하였다. 그 결과, 저항성 운동 후 류신 및 아르기닌을 섭취한 집단은 근력이 향상되었다. 하지만 모든 근육군의 p-mTOR, p-4EBP1, 및 p-AMPK 발현 수준에는 유의한 차이가 나타나지 않았지만 긍정적인 경향이 나타났다. 마지막으로 류신과 아르기닌을 섭취한 집단에서 근 섬유 다발이 유의하게 증가 하였다. 이러한 결과는 8주간 저항성 운동과 류신 및 아르기닌의 투여가 골격근량, 근력에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 생각한다.

Abstract

The aim of this study was to demonstrate the effectiveness of resistance exercise and the intake of leucine and arginine on the expression of key factors in muscle synthesis and body function by comparing it. Experimental animals used ICR, divided into 4 groups of 10 animals per group, Control Group (CON; n=10), Exercise Group (EXE; n=10), L-Leucine+Exercise Group (LEX; n=10), It was used in L-Arginine+Exercise Group (AEX; n=10). Resistance exercise was performed 3 times a week for 8 weeks, and leucine and arginine were diluted to 54 g/L and administered Oral administration 5 times a week within an hour after resistance exercise by 0.135 g/kg. In addition, the factors related to muscle synthesis and the number of muscle bundles were analyzed using H&E staining and western blot methods. In the group that ingested leucine and arginine, factors related to muscle synthesis were expressed, muscle strength increased, and there was no difference between the leucine and arginine groups. These results suggest that resistance exercise and administration of leucine and arginine for 8 weeks had a positive effect on skeletal muscle mass and strength. In conclusion, the intake of vegetable and animal protein after resistance exercise has no difference in the expression level of factors related to muscle synthesis, and both vegetable and animal proteins are effective in improving muscle strength and increasing muscle hypertrophy and skeletal muscle mass.

Key words : resistance exercise, leucine, arginine, muscle synthesis

* choihundong@ksu.ac.kr

이 연구는 2020년 김동연(한국체육대학교) 석사학위논문을 수정·보완하여 작성하였음

I. 서론

과거에는 비만에 대한 예방과 치료의 목적으로 육류와 같은 높은 식이의 단백질 섭취가 권장되었다(Westerterp-Plantenge et al., 2012). 육류 및 고단백 식품에는 대표적인 필수 아미노산인 류신(L-Leucine)이 다량 함유 되어있는데, 이는 발린(valine), 이소류신(isoleucine)과 함께 분자 사슬 아미노산(branched chain amino acids; BCAA)의 형태로 체내에 저장 되어있다. 이 중 류신은 동물성 단백질 중 유일하게 근 합성(Muscle Protein Synthesis)을 증가시키는데 효과적이라고 알려져 왔다(Pasiakos, 2012).

하지만 동물성 단백질 일일 권장량을 초과 할 경우 제 2형 당뇨병(Type 2 diabetes mellitus) 및 합병증과 같은 여러 질병으로 이어지며 인간에게 해롭게 작용한다(Bray et al., 2012). 이로 인해 채식을 기반으로 한 시장이 주목 받고 있으며, 식물성 단백질 섭취에 관심이 증가하고 있다(van Vliet et al., 2015). 대표적인 식물성 단백질 중 하나인 아르기닌(L-Arginine)은 조건부 필수 아미노산으로 요소의 생성을 통해 질소가 분해 작용을 하는 동안 형성된 암모니아의 해독에 관여할 뿐 아니라 단백질 합성의 주된 기능을 수행한다는 연구결과가 보고되었다(Campbell et al., 2004). 또한 아르기닌은 시트룰린(Citrulline), 크레아틴(Creatine), 산화질소(Nitric Oxide)와 같은 수많은 대사 및 합성경로에 의해 사용된다(Tong et al., 2004). 선행 연구에 따르면 혈중 아르기닌의 농도의 증가는 글루카곤(Glucagon)의 분비 증가와 글루코스(Glucose)를 소모시키게 된다. 이 때 부족해진 글루코스를 간으로부터 공급받아 근육에서의 글루코스 활용이 향상되어 근 합성의 촉진을 유발 한다고 보고 되고 있다(Trabelsi et al., 1996). 또한, 식물성 단백질인 아르기닌은 단백질 과다복용에 대한 부담이 덜하고, 혈관을 확장시켜 혈류를 개선해 주는 효과도 있다(Iannuzzi et al., 2001). 그럼에도 불구하고 아직까지 아르기닌의 효과에 대한 연구는 미흡한 실정이다(Arakawa et al., 2007).

근육은 자극을 받게 되면 인슐린 유사성 성장 인자(Insulin like growth factor-1; IGF-1)를 분비한다. IGF-1은 간 키나아제(Liver Kinase B1; LKB1)와 칼슘/칼모듈린 의존성 단백질(Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1; CamKK)을 각각 자극하여 독립적인 방식을 통하여, 활성화 단백질 키나아제(Activated protein kinase α 1; AMPK α 1)와 AMPK α 2를 인산화한다(Atsushi Suzuki 등, 2004). LKB1에 의해 인산화 된 AMPK α 2는 Atrogin-1을 발현시켜 근육 이화를 진행하고, CamKK를 통해 인산화 된 AMPK α 1은 표유류 표적 라파마이신(mammalian target of rapamycin; mTOR), 진행 생물 개시 인자(Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1; 4EBP1), 리보솜 단백질(P70-S6 Kinase 1; P70S6K)을 억제하여 근 합성을 방해한다. 따라서, IGF-1의 분비를 통해 발현된 AMPK는 ATP의 생성과 소모를 관장하여 에너지 항상성을 복원하는 역할을 담당하며 근육 이화 및 동화 작용에도 기여를 하고 있다(Grahame Hardie et al., 2015).

근 합성은 세포 내 신호전달 기전(signalling pathway)을 이용하여 이화작용(catabolism)과 동화작용(anabolism)을 통해 근 합성을

유도하는 신호전달이 발현될수록 효과적이다(Mcglory et al., 2017). 또한, 저항성 운동 후에 섭취한 단백질은 운동 전보다 활용성이 증가하여 근 합성을 자극하는데 효과적이다(Vinod Kumar et al., 2009). 근 합성을 유발하기 위해 저항성 운동을 수행할 경우 IGF-1, Insulin, AMPK와 같은 인자들이 발현된다(Ogasawara et al., 2018), 이들은 근 합성의 상위 조절 인자로써, PI3K-PKB/Akt-mTOR로 이어지는 신호전달 경로를 촉진시켜 근 합성을 증가시킨다(Bodine et al., 2001). 따라서 mTOR의 발현은 PI3K와 Akt 신호 전달에 의해 이루어지며, 세포 내에서의 근 성장신호를 통합하는 중심 신호전달 기전으로 인정되고 있다(Burnett et al., 1998). 또한 mTOR의 발현은 P70S6K와 4EBP1을 경유하는 독립된 두 가지 신호전달 기전으로 진행되어 근 합성에 결정적 역할을 수행한다고 보고한 바 있다(Hara et al., 1997).

따라서 본 연구는 항상성 운동 후 류신 및 아르기닌 섭취가 근육 합성의 주요 인자 발현에 미치는 영향과 신체 기능을 비교하여 효과를 규명하고자 한다. 이는 아르기닌의 근 합성 기전을 규명하여 근육의 감소를 늦추고, 손실을 예방하는데 효과적인 영향을 미칠 수 있을 것으로 기대된다.

II. 연구방법

1. 실험동물 및 사육

연구에 사용될 실험동물은 10주령 수컷 ICR mouse를 사용하였다. 실험동물은 대조 집단(CON; n=10), 운동 집단(EXE; n=10), 류신+운동 집단(LEX; n=10), 아르기닌+운동 집단(AEX; n=10)으로 구분하였고, 집단 당 10마리씩 사용하였다. 2주일간의 cage 적응기간과 운동적응 기간을 거친 후 8주간의 실험을 시작하였다. 실험의 구입 및 사육의 전 과정은 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 수행하였다. 시설 환경 기준 따라 명암주기를 12시간(light-dark cycle)으로 설정하며, 온도 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도는 $50 \pm 5\%$ 의 환경 유지 조건을 갖춘 K대학교 동물 실험실에서 사육하였다. 식이는 일반 사료 탄수화물 60.7%, 단백질 15.2%, 무기질 5%, 지방 2.9%(Samtaco Korea)를 24시간 자율배식 하였다.

2. 운동방법

2주일간의 적응 기간을 거친 실험동물은 실험실 내에서 자체 제작한 사다리(기울기 90° , 높이 1m)를 이용해 저항성 사다리 운동을 실시하였다. 근 비대를 목적으로 일주일간의 운동 적응 기간 동안 부하 없이 주 5회 사다리 운동을 실시하였으며, 본 실험에서는 8주간 주 3회 저항성 운동을 실시하였다. 운동 하는 도중 과부하를 주기 위해 10mL Falcon-tube안에 추(1g)와 쌀을 이용하여 중량을 조절하였다. 실험동물의 1RM(One Repetition Maximum)은 쥐의 무게를 1RM으로 설정하였으며, 최초 운동 시 1RM의 30% 5회, 60% 4회, 80% 3회, 100% 1회, 그 이후에는 쌀의 양을 늘려 총 15회가 넘지 않도록 설정하였다. 1주차에서 3주차까지는 운동 횟수

를 15회 넘지 않도록 설정하였고, 4주차부터 8주차까지는 실험동물의 체력수준에 맞게 운동 부하를 점진적으로 높여가며 실시하였다.

3. Hanging Test

저항성 운동 후 류신과 아르기닌을 처치한 마우스 모델에서 나타나는 근력 변화를 알아보기 위하여 Hanging Test를 실시하였다. Hanging Test는 와이어 메쉬(가로 1m x 세로 1m)위에 마우스를 올려놓고, 조심스럽게 와이어 메쉬를 시계방향으로 돌려 마우스가 부드러운 표면으로 떨어질 때까지 시간(sec)을 측정하여 결과 값을 실험 데이터로 적용하였다. 매달려 있는 최대 시간은 5분으로 설정하였고, 최소 시간은 10초로 설정하여 10초 내에 떨어진 마우스의 경우 재실험을 실시하였다.

4. Grip Test

저항성 운동 후 류신과 아르기닌을 처치한 마우스 모델에서 나타나는 근력 변화를 알아보기 위하여 Grip Test를 실시하였다. Grip Test는 와이어 메쉬(길이 1m)위에 마우스를 올려놓은 뒤 그립의 힘을 다한 마우스가 부드러운 표면으로 떨어질 때까지의 시간(sec)을 측정하여 결과 값을 실험 데이터로 적용하였다. 매달려 있는 최대 시간은 5분으로 설정하였고, 최소 시간은 10초로 설정하여 10초 내에 떨어진 마우스의 경우 재 실험을 실시하였다.

5. 류신 및 아르기닌 투여

류신과 아르기닌을 해외 M사로부터 구입하여 사용하였으며, Gagnon et al. (2002) 연구팀의 자료를 근거로 하여 mouse가 소화 가능한 최대 용량에 맞게 54g/L로 희석하여 류신 집단, 아르기닌 집단에 각각 0.135g/kg씩 주 5회 구강투여 하였다. 보조제 투여 시기는 운동 후 한 시간 이내로 동일한 시간에 실시하였다.

6. 조직 적출

8주간의 실험이 모두 종료되면 Ketamine50(Yuhan, Korea)과 Rumpun(Bayer, Korea)이 7:3 비율로 혼합된 마취약을 마우스의 복강에 주사하여 근육 조직 가자미근(Soleus), 장지신근(EDL), 족저근(Plantaris)을 적출하여 액화질소에 동결시키고, 분석 전까지 -80°C 초저온냉동기(Deep freezer, SANYO, Japan)에 보관하였다.

7. 조직 고정

마우스를 마취시킨 후, 흉강을 열어 좌심실에 10mM PBS(phosphate buffered saline)를 3분 동안 주입하고, 0.1M PBS와 4% paraformaldehyde(PFA) 혼합액을 10분 동안 관류시키며, 고정된 조직은 5일 동안 30% sucrose 용액에 침전시킨 후 동결용 박절기(Freezing micortome, Leica, Nussloch, Germany)를 이용하여 20µm 두께로 절편하여 storing solution에 저장하였다.

8. Western Blot analysis

적출된 근육조직을 정량하여 균일화 시킨 뒤, 원심분리(15,000rpm, 30분)를 통해 상층부의 액을 따로 처리하여 실험에 사용할 sample을 준비하였다. 각각 8%, 10%, 15%의 separating gel(1M tris ph8.8, 30% acrylamide, 10% Ammonium persulfate, TEMED)와 stacking gel(1M tris ph6.8, 30% acrylamide, 10% Ammonium persulfate, 10% SDS, TEMED)를 만들어 사용하였고, Sample 상층액(total cytosol fraction)과 2x sample buffer를 1:1비율로 잘 혼합한 후 70°C에서 10분간 가열하여 단백질을 변성시킨 다음, 알음에 10분간 식혔다. 마커(Dokdo-Maker)와 함께 각 샘플을 분주 한 후 100 Volt에서 90분 샘플이 바닥에 닿을 때까지 전기영동하였다. Nitro membrane(bio-rad, USA)과 Transfer buffer로 적신 3M paper를 차례로 겹쳐 trans-blot tank에 장치한 후 100 volt로 60분간 전사하였다. Membrane으로 증착이 끝나면 Skim milk(DW 10ml, Skim milk 0.3g)용액으로 Blocking을 시킨 후 1차 항체를 1000:1의 농도로 4°C에서 over night 시켰다. 이후 상온에서 2시간 동안 2차 항체(농도 5000:1)와 반응시킨 뒤 Luminate Forte Westetn HRP Substrate(Milipore, USA)에 1분간 발색시켜 나온 membrane을 이미지 분석 시스템(Molecular Imager ChemiDoc XRS System, Bio-Rad, USA)를 이용하여 분석하였다.

표 1. Primary antibody list

Antibody	Catalog No.	Vendor
Phospho-mTOR	sc-293133	Santa Cruz Biotechnology, USA
Phospho-P70S6K	sc-8416	Santa Cruz Biotechnology, USA
Phospho-4EBP1	2855S	Cell signaling Technology, USA
Phospho-AMPK α	sc-33524	Santa Cruz Biotechnology, USA

9. H&E Staining

샘플을 동결용 박절기(Freezing micortome, Leica, Nussloch, Germany)를 이용하여 20µm두께로 절편하여 slide에 부착 후 1시간 Room Temp 시켰다. DW를 이용해 세척 후 100% ethanol에 1분씩 1번, 80% ethanol 1분씩 1번, 70% ethanol 1분씩 1번을 거친 후 DW로 세척하였다. Hematoxyline 용액에 1분간 침적 한 후, DW로 세척한 다음 Eosin 용액에 1분간 침적 한 후, DW로 세척하였다. 이후 xylene용액에 1분씩 3번을 거쳐 봉입제로 봉입한 후 광학현미경(DM2500, Leica, Germany)으로 판독하였다.

10. 자료처리방법

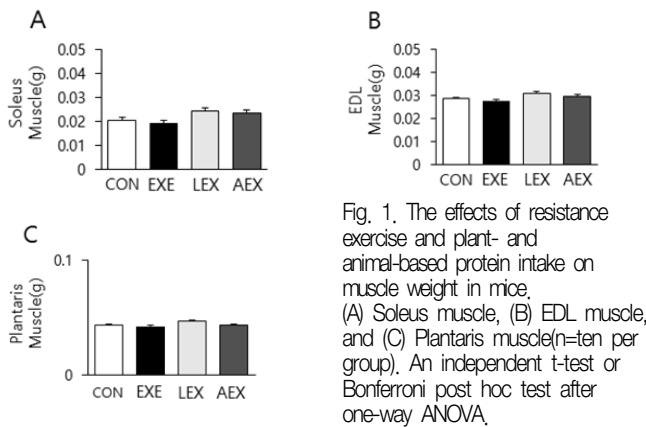
연구에서 얻어진 모든 자료는 윈도우용 22.0 통계 프로그램 SPSS를 이용하여 기술 통계치(mean±SD)를 산출하였다. 각 검사변인에 대하여, 집단 간 차이를 분석하기 위해 일원변량분석(one

way ANOVA)을 실시하고 Bonferroni's (least significant difference) 방법을 이용하여 집단 간 유의한 차이가 있을 경우 사후 검증을 실시하였다. 이 때 통계적 유의수준은 $\alpha=.05$ 로 설정하였다.

III. 연구결과

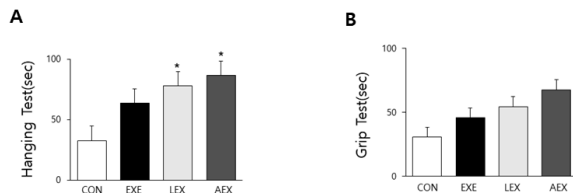
1. 집단 간 근육 무게의 변화

실험기간 동안 실험동물의 체중은 동일한 시간대에 매주 1회 측정하였다. 실험이 끝난 후 실험동물을 희생시켜 Soleus, EDL, Plantaris의 무게를 측정한 결과는 <Fig 1>과 같다. 8주간의 측정결과 집단 간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다(Soleus: $F[3,36]=2.327$, $p=.091$; EDL: $F[3,36]=1.027$, $p=.373$; Plantaris: $F[3,36]=1.149$, $p=.343$).



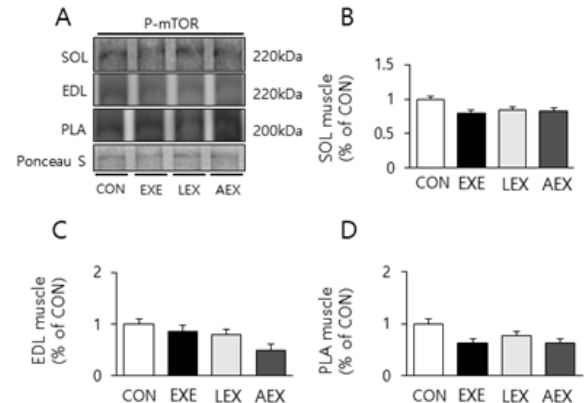
2. 집단 간 Hanging Test 및 Grip Test 수행 능력의 변화

ICR 쥐를 대상으로 8주간 류신과 아르기닌을 각각 구강 투여와 저항성 운동을 처치한 후 Hanging Test와 Grip Test를 수행 능력을 평가한 결과 <Fig 2>, Hanging Test에서는 집단 간 유의한 차이가 나타났지만($F[3,36]=6.094$, $p=.002$), Grip Test에서는 집단 간 유의한 차이가 나타나지 않았다($F[3,36]=1.787$, $p=.167$). Hanging Test의 사후 검증 결과 CON 집단에 비해 LEX 집단($p=.012$)과 AEX 집단($p=.002$)에서 통계적으로 유의하게 증가하였다.



3. 집단 간 Phospho-mTOR의 발현 수준의 변화

ICR 쥐를 대상으로 류신과 아르기닌을 각각 구강 투여와 저항성 운동을 처치한 후 Soleus, EDL, Plantaris의 P-mTOR 발현량을 분석한 결과(Fig 3), 모든 근육조직에서 m-TOR의 발현 수준은 집단 간 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Soleus: $F[3,20]=1.217$, $p=.329$; EDL: $F[3,20]=0.429$, $p=.735$; Plantaris: $F[3,20]=0.666$, $p=.583$).



4. 집단 간 Phospho-P70S6K의 발현 수준의 변화

ICR 쥐를 대상으로 류신과 아르기닌을 각각 구강 투여와 저항성 운동을 처치한 후 Soleus, EDL, Plantaris의 p-P70S6K 발현량을 분석한 결과(Fig 4), Soleus과 Plantaris에서 집단 간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다(Soleus: $F[3,20]=11.712$, $p=.001$; Plantaris: $F[3,20]=10.111$, $p=.001$). 하지만, EDL에서는 유의한 차이가 나타나지 않았다($F[3,20]=0.429$, $p=.620$). Soleus의 사후 검증 결과 CON 집단에 비해 LEX 집단($p=.011$) 및 AEX 집단($p=.004$)에서 집단 간 통계적으로 유의하게 감소하였다. 또한, Plantaris의 사후 검증 결과 CON 집단에 비해 EXE 집단($p=.008$), LEX 집단($p=.001$) 및 AEX 집단($p=.001$)에서 집단 간 통계적으로 유의하게 감소하였다.

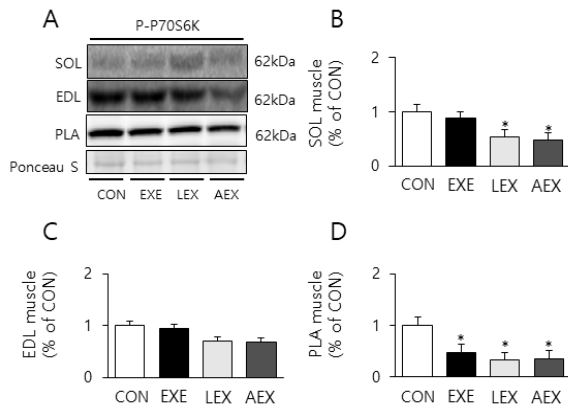


Fig. 4. The effects of resistance exercise and plant- and animal-based protein intake on Phospho-P70S6K in mice. (A) Representative western blot image of Phospho-P70S6K (n=six per group). (B-D) Quantification of Soleus, EDL, plantaris muscle, and p-P70S6K levels. An independent t-test or Bonferroni post hoc test after one-way ANOVA. * $p < .05$ vs CON.

5. 집단 간 Phospho-4EBP1의 발현 수준의 변화

ICR 쥐를 대상으로 류신과 아르기닌을 각각 구강 투여와 저항성 운동을 처치한 후 Soleus, EDL, Plantaris의 p-4EBP1 발현량을 분석한 결과(Fig 5), 모든 근육조직에서 p-4EBP1의 발현 수준은 집단 간 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Soleus: $F[3,20]=0.971$, $p=.426$; EDL: $F[3,20]=2.846$, $p=.064$; Plantaris: $F[3,20]=0.484$, $p=.697$).

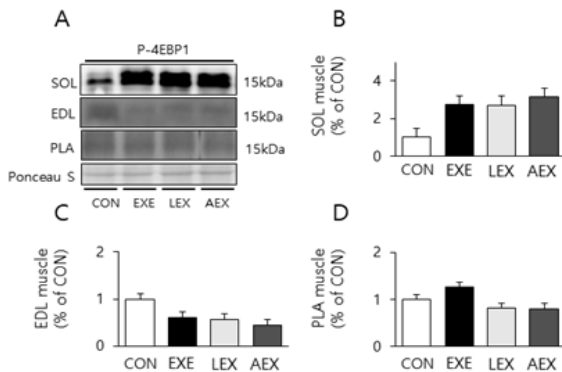


Fig. 5. The effects of resistance exercise and plant- and animal-based protein intake on Phospho-4EBP1 in mice. (A) Representative western blot image of Phospho-4EBP1 (n=six per group). (B-D) Quantification of Soleus, EDL, plantaris muscle, and p-4EBP1 levels. An independent t-test or Bonferroni post hoc test after one-way ANOVA.

6. 집단 간 Phospho-AMPK의 발현 수준의 변화

ICR 쥐를 대상으로 류신과 아르기닌을 각각 구강 투여와 저항성 운동을 처치한 후 Soleus, EDL, Plantaris의 p-AMPK 발현량을 분석한 결과(Fig 6), 모든 근육조직에서 p-AMPK의 발현 수준은 집단 간 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Soleus: $F[3,20]=0.835$, $p=.490$; EDL: $F[3,20]=0.657$, $p=.588$; Plantaris: $F[3,20]=0.208$, $p=.890$).

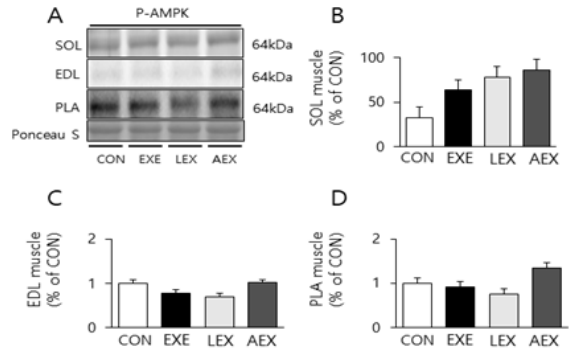


Fig. 6. The effects of resistance exercise and plant- and animal-based protein intake on Phospho-AMPK in mice. (A) Representative western blot image of Phospho-AMPK (n=six per group). (B-D) Quantification of Soleus, EDL, plantaris muscle, and p-AMPK levels. An independent t-test or Bonferroni post hoc test after one-way ANOVA.

7. 집단 간 근육 내 근다발 개수의 변화

ICR 쥐를 대상으로 류신과 아르기닌을 각각 구강 투여와 저항성 운동을 처치한 후 Soleus, EDL, Plantaris의 근 다발 개수의 변화를 분석한 결과(Fig 7), 모든 근육조직에서 집단 간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다(Soleus: $F[3,12]=74.665$, $p=.001$; EDL: $F[3,12]=25.594$, $p=.001$; Plantaris: $F[3,12]=27.455$, $p=.001$). 따라서, Soleus의 사후 검증 결과 CON 집단에 비해 EXE 집단($p=.001$), LEX 집단($p=.001$) 및 AEX 집단($p=.001$)에서 집단 간 통계적으로 유의하게 증가하였다. EDL의 사후 검증 결과 CON 집단에 비해 EXE 집단($p=.001$), LEX 집단($p=.001$) 및 AEX 집단($p=.001$)에서 집단 간 통계적으로 유의하게 증가하였다. 마지막으로 Plantaris의 사후 검증 결과 CON 집단에 비해 EXE 집단($p=.001$), LEX 집단($p=.001$) 및 AEX 집단($p=.001$)에서 집단 간 통계적으로 유의하게 증가하였다.

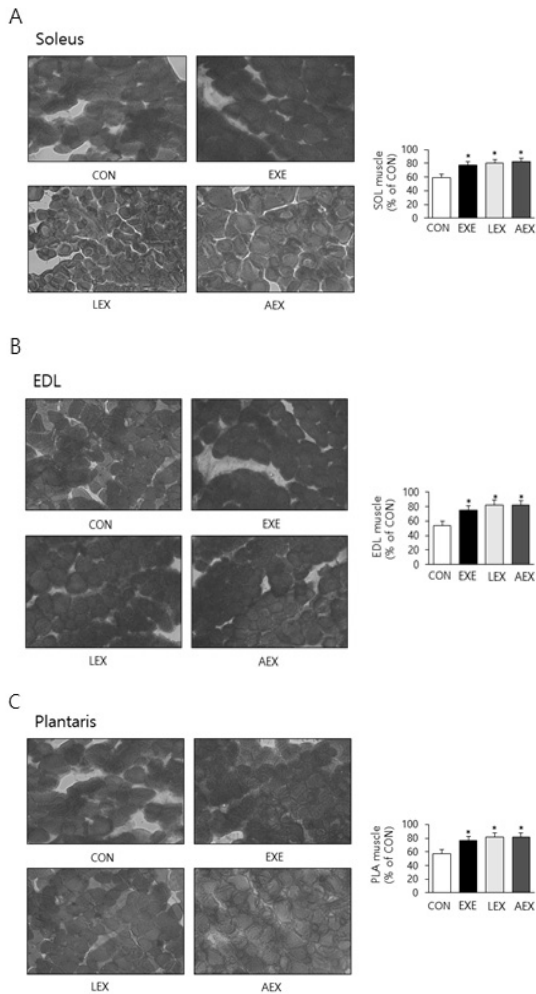


Fig. 7. 8 weeks of resistance training and eating plant and animal protein increases the number of muscle bundles. (A) Soleus muscle, (B) EDL muscle, and (C) Plantaris muscle (n=four per group). An independent t-test or Bonferroni post hoc test after one-way ANOVA. * $p < .05$ vs CON.

IV. 논의

영양섭취를 통한 운동은 단백질 합성과 근 비대를 위한 가장 중요한 요인이며, 운동 후 휴식을 통해 손상된 근육을 회복시키고 운동수행능력을 향상시킨다(Yuhei Makanae et al., 2015). 영양섭취의 중요성이 날로 강조됨에 따라 단백질 공급원 또한 관심을 받고 있다. 동물성 단백질 공급원은 심혈관질환 위험요인에 영향을 미칠 수 있다는 연구가 보고됨에 따라 식물성 단백질인 아르기닌의 관심이 높아지고 있다(Richter et al., 2015). 최근 대표적인 식물성 단백질 공급원인 아르기닌은 C1C12 세포에서 mTOR를 인산화하여 단백질 합성을 향상시킨다고 보고되었다(Wang et al., 2018). 따라서 본 연구는 실험동물을 이용하여 저항성 운동 직후 대표적인 동물성 단백질인 류신과 대표적인 식물성 단백질인 아르기닌을 각각 투여하여 근 합성에 영향을 주는 주요 인자 발현 정도를 분석하여

류신과 아르기닌의 발현량의 차이를 분석하여 단백 동화에 미치는 영향을 제시하였다.

먼저, 본 연구에서는 8주간 저항성 운동 후 류신 및 아르기닌을 처치하여 Hanging Test와 Grip Test를 실시하였다. Hanging Test에서 LEX 집단과 AEX 집단이 CON 집단에 비해 집단 간 통계적으로 유의한 차이가 있었으며, Grip Test에서는 LEX 집단과 AEX 집단이 CON 집단에 비해 근력의 향상은 있었으나 집단 간 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 또한, AEX 집단은 LEX 집단에 비해 근력의 향상은 있었으나 집단 간 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 따라서 류신과 아르기닌의 섭취는 근력 향상에 영향을 미치며, 근력 증가의 정도에는 차이가 없는 것으로 나타났다. Stokes et al. (2018)은 저항성 운동 후 단백질 섭취는 근 회복을 향상시켜 근력 증가와 근 비대를 유발하며, 근력이 고갈 될 때까지 저항성 운동을 시행 한 후 최대 30분 이내 단백질 섭취하는 것이 저항성 운동 전 섭취 것보다 흡수에 영향을 보고하였다. Hiroyasu et al. (2018)은 저항성 운동 후 단백질 보충이 운동 전 단백질 보충을 처치한 집단에 비해 골격근 질량과 신체 기능이 향상되었다는 연구 결과를 보고하면서 저항성 운동 후 단백질 섭취의 중요성을 강조하였다. 저항성 운동 후 적절한 단백질 섭취는 골격근량 증가에 효과가 있는 것으로 사료된다. 하지만 저항성 운동 전·후로 단백질 섭취 시점에 대한 추후 연구를 통해 논의가 필요한 것으로 사료된다.

다음으로 가자미근(Soleus), 장지신근(EDL), 족저근(Plantaris)에 따라 p-mTOR, p-4EBP1, 및 p-AMPK를 분석한 결과 집단 간 유의한 차이가 나타나지 않았지만 p-P70S6K는 유의한 차이가 나타났다. 단백질 합성은 저항성 운동 후 단백질 섭취 시, 체내 아미노산의 증가와 P70S6K, 4EBP1의 발현으로 인해 단백질 합성이 시작된다(Jeyapalan et al., 2007). 유의한 차이는 나타나지 않았지만 p-4EBP1은 증가하는 경향이 나타났지만, p-P70S6K는 감소하였다. 4EBP1은 mTOR의 영향에 따라 변화하지만 p-P70S6K와 상반된 결과가 나타난 것으로 볼 때, 독립적이거나 다른 단백질의 영향을 받는 가능성을 보여주고 있다(Deldicque et al., 2008).

또한, AMPK의 경우 증가는 했지만 유의한 차이는 없었다. 근육이 자극을 받아 스트레스가 유발되면 IGF-1인자는 AMPK를 발현시켜 미토콘드리아 기능을 증가시킨다고 보고되고 있다(Aghanoori et al., 2019). AMPK는 근 성장을 위한 에너지를 생산하는데 중요한 요인이지만, AMPK 활성이 mTOR 활성을 저하시킨다고 제기되고 있다(Bolster et al., 2003). 또한, Thomson et al. (2008)은 동물실험을 통해 p70S6K 활성이 감소는 AMPK의 활성이 골격근의 단백질 합성 과정을 억제하는 것을 확인하면서 AMPK 활성은 운동 강도에 따라 영향을 받는다고 보고하였다. Chan & Dyck. (2005)의 연구에서 낮은 운동 강도에서는 AMPK의 활성이 낮았으나 운동강도가 증가하였을 때 AMPK의 인산화가 증가하였다고 보고하였다. 이는 본 연구의 결과와 일치한다. 이러한 결과는 AMPK 인산화가 증가하면서 mTOR의 활성을 억제하는 TSC2를 활성화 시키는 것으로 보고하였다(Hay & Sonenberg, 2004).

AMPK에 대한 연구는 골격근 성장에 대한 부정적인 영향을 준

다는 메커니즘으로 지난 20년간 연구되어 왔지만(Deng et al., 2017), VO₂max의 70% 이상인 비교적 높은 강도의 운동은 AMPK α 1의 단백 동화 반응을 유발한다는 연구가 보고된바 있다(Thomson et al., 2018). 본 연구의 근 섬유 다발의 수를 확인한 결과 류신과 아르기닌을 섭취한 집단에서 근 섬유 다발이 유의하게 증가하였다. 아르기닌은 돼지 골격근의 위성세포 Akirin2 및 AMP를 통해 AMPK의 단백 동화 반응을 촉진한다는 연구가 보고되었다(Chen et al., 2018). 따라서 아르기닌은 mTOR를 포함하여 AMPK에 영향을 미쳐 단백 합성을 유발하는 것으로도 볼 수 있다.

저항성 운동 후에 섭취한 류신과 아르기닌은 IGF1-mTOR 신호 전달 기전을 통해 4EBP1과 P70S6K로 이어지는 하위 기전 정보에 대해 영향을 미치는 것을 볼 수 있었으며, 근 섬유 다발의 증가와 근력의 증가를 확인할 수 있었다. 또한, 아르기닌 또한 단백질 합성 주요 인자 발현을 유도하는 4EBP1을 발현시키며. 그러므로 아르기닌의 단백질 동화 작용은 긍정적으로 볼 수 있다.

V. 결론 및 제언

본 연구는 8주간 저항성 운동 후 류신 및 아르기닌 섭취가 단백질 합성 인자들의 발현 수준과 근력 향상에 미치는 영향을 규명하였고 다음과 같은 결론을 얻었다. 첫째, 저항성 운동 후 류신 및 아르기닌을 섭취한 집단은 근력이 향상되었다. 둘째, 모든 근육군의 p-mTOR, p-4EBP1, 및 p-AMPK 발현 수준에는 유의한 차이가 나타나지 않았다. 셋째, 류신과 아르기닌을 섭취한 집단에서 근 섬유 다발이 유의하게 증가하였다. 따라서, 저항 운동 후 동물성 단백질과 식물성 단백질 섭취로 인해 근 섬유 다발의 증가와 근력의 증가를 확인할 수 있었다. 추후 운동의 강도와 단백질 섭취량에 따른 다양한 근 합성 지표에 대한 후속 연구가 필요한 것으로 사료된다.

참고문헌

Aghanoori, M. R., Smith, D. R., Shariati-Ievvari, S., Ajisebutu, A., Nguyen, A., Desmond, F., Jesus, C. H. A., Zhou, X., Calcutt, N. A., Aliani, M., & Fernyhough, P. (2019). Insulin-like growth factor-1 activates AMPK to augment mitochondrial function and correct neuronal metabolism in sensory neurons in type 1 diabetes. *Mol Metab*, 20:149-165.

Arakawa, T., Ejima, D., Tsumoto, K., Obeyama, N., Tanaka, Y., Kita, Y., & Timasheff, S. N. (2007) Suppression of protein interactions by arginine: a proposed mechanism of the arginine effects. *Biophys Chem*, 127(1-2):1-8.

Bill I Campbell., Paul M La Bounty., Mike Roberts. (2004). The

ergogenic potential of arginine. 1(2):35-8.

Bodine, S. C., Stitt, T. N., Gonzalez, M., Kline, W. O., Stover, G. L., Bauerlein, R., Zlotchenko, E., Scrimgeour, A., Lawrence, J. C., Glass, D. J., & Yancopoulos, G. D. (2001). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol*, 11:1014-9.

Bolster, D. R., Kubica, N., Crozier, S. J., Williamson, D. L., Farrell, P. A., Kimball, S. R., Jefferson, L. S.(2003). Immediate response of mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated signalling following acute resistance exercise in rat skeletal muscle. *J Physiol*, 15:553(1):1.

Bray, G. A., Smith, S. R., de Jonge, L., Xie, H., Rood, J., Martin, C. K., Most, M., Brock, C., Mancuso, S., & Redman, L. M. (2012). Effect of dietary protein content on weight gain, energy expenditure, and body composition during overeating: a randomized controlled trial. 307(1):47-55.

Burnett, P. E., Barrow, R. K., Cohen, N. A., Snyder, S. H., & Sabatini, D. M. (1998) RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70S6 kinase and 4E-BP1. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1432-1437.

Campbell, B. I., Aguilar, D., Conlin, L., Vargas, A., Schoenfeld, B. J., Corson, A., Gai, C., Best, S., Galvan, E., & Couvillion, K. (2018). Effects of High Versus Low Protein Intake on Body Composition and Maximal Strength in Aspiring Female Physique Athletes Engaging in an 8-Week Resistance Training Program. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 28(6):580-585.

Campbell, B. I., Bounty, P. M. L., & Roberts, M. (2004). The ergogenic potential of arginine. *J Int Soc Sports Nutr*, 1, 35-3.

Chan, A. Y., & Dyck, J. R.(2005). Activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) inhibits protein synthesis: a potential strategy to prevent the development of cardiac hypertrophy. *J Physiol Pharmacol*, 83:24-28.

Deldicque, L., Atherton, P., Patel, R., Theisen, D., Nielens, H., Michael, J., Rennie, Francaux M.(2008). Effects of resistance exercise with and without creatine supplementation on gene expression and cell signaling in human skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 04:371-378.

Deng, Z., Luo, P., Lai, W., Song, T., Peng, J., & Wei, H. K.(2017). Myostatin inhibits eEF2K-eEF2 by regulating AMPK to suppress protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 494(1-2):278-284.

Gagnon, M., Maguire M., MacDermott, M., & Bradford, A.

- (2002). Effects of creatine loading and depletion on rat skeletal muscle contraction. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 29(10), 885–890.
- Grasso, A. C., Olthof, M. R., van Dooren, C., Broekema, R., Visser, M., & Brouwer, I. A. (2021). Protein for a Healthy Future: How to Increase Protein Intake in an Environmentally Sustainable Way in Older Adults in the Netherlands. *The Journal of Nutrition*, 151(1):109–119.
- Hara, K., Yonezawa, K., Kozlowski, M. T., Sugimoto, T., Andrabi, K., Weng, Q. P., Kasuga, M., Nishimoto, I., & Avruch, J. (1997). Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *J Biol Chem* 272:26457–26463.
- Hardie, D. G., Schaffer, B. E., & Brunet, A. (2016). AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs. *Trends Cell Biol*, (3):190–201.
- Hay, N., Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*, 18:1926–1945.
- Ilha, J., do Espírito-Santo, C. C., & de Freitas, G. R. (2018). mTOR Signaling Pathway and Protein Synthesis: From Training to Aging and Muscle Autophagy. *Adv Exp Med Biol*, 1088:139–151.
- Jeyapalan, A. S., Orellana, R. A., Suryawan, A., O'Connor, P. M., Nguyen, H. V., Escobar, J., Frank, J. W., & Davis, T. A. (2007). Glucose stimulates protein synthesis in skeletal muscle of neonatal pigs through an AMPK- and mTOR-independent process. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293(2):E595–603.
- Kumar, V., Atherton, P., Smith, K., & Rennie, M. J. (2009). Human muscle protein synthesis and breakdown during and after exercise. *J Appl Physiol*, 106(6):2026–39.
- Makanae, Y., & Fujita, S. (2015). Role of Exercise and Nutrition in the Prevention of Sarcopenia. *J Nutr Sci Vitaminol*, S125–7.
- McGlory, C., Devries, M. C., & Phillips, S. M. (2017). Skeletal muscle and resistance exercise training; the role of protein synthesis in recovery and remodeling. *J Appl Physiol*, 122(3):541–548.
- Mori, H., & Tokuda, Y. (2018). Effect of whey protein supplementation after resistance exercise on the muscle mass and physical function of healthy older women: A randomized controlled trial. *Geriatr Gerontol Int*, 18(9):1398–1404.
- Morton, R. W., Murphy, K. T., McKellar, S. R., Schoenfeld, B. J., Henselmans, M., Helms, E., Aragon, A. A., Devries, M. C., Banfield, L., Krieger, J. W., & Phillips, S. M. (2018). A systematic review, meta-analysis and meta-regression of the effect of protein supplementation on resistance training-induced gains in muscle mass and strength in healthy adults. *Br J Sports Med*, 52(6):376–384.
- Ogasawara, R., & Sugihara, T. (2018). Rapamycin-insensitive mechanistic target of rapamycin regulates basal and resistance exercise-induced muscle protein synthesis. *FASEB J*, 10.1096.
- Oxide-Dependent Manner in C2C12 Cells. *Oxid Med Cell Longev*, 26:7569127.
- Pasiakos, S. M. (2012). Exercise and amino acid anabolic cell signaling and the regulation of skeletal muscle mass. *Nutrients*, (7):740–58.
- Ramdath, D. D., Padhi, E. M. T., Sarfaraz, S., Renwick, S., & Duncan, A. M. (2017). Beyond the Cholesterol-Lowering Effect of Soy Protein: A Review of the Effects of Dietary Soy and Its Constituents on Risk Factors for Cardiovascular Disease. *Nutrients*, 9(4):324.
- Reidy, P. T., & Rasmussen, B. B. (2016). Role of Ingested Amino Acids and Protein in the Promotion of Resistance Exercise-Induced Muscle Protein Anabolism. *J Nutr*, (2):155–83.
- Richter, C. K., Skulas-Ray, A. C., Champagne, C. M., & Kris-Etherton, P. M. (2015). Plant protein and animal proteins: do they differentially affect cardiovascular disease risk? *Adv Nutr*, 6(6):712–28.
- Roberts, J., Zinchenko, A., Suckling, C., Smith, L., Johnstone, J., & Henselmans, M. (2017). The short-term effect of high versus moderate protein intake on recovery after strength training in resistance-trained individuals. *J Int Soc Sports Nutr*, 14:44.
- Rouy, E., Vico, L., Laroche, N., Benoit, V., Rousseau, B., Blachier, F., Tomé, D., & Blais, A. (2013). Protein quality affects bone status during moderate protein restriction in growing mice. *Bone*, 10.1016.
- Snijders, T., Res, P. T., Smeets, J. S., van Vliet, S., van Kranenburg, J., Maase, K., Kies, A. K., Verdijk, L. B., & van Loon, L. J. (2015). Protein Ingestion before Sleep Increases Muscle Mass and Strength Gains during Prolonged Resistance-Type Exercise Training in Healthy Young Men. *Nutrients*, (6):1178–84.
- Stokes, T., Hector, A. J., Morton, R. W., McGlory, C., & Phillips, S. M. (2018). Recent Perspectives Regarding the Role of Dietary Protein for the Promotion of Muscle Hypertrophy with Resistance Exercise Training. *7;10(2):180*.
- Suzuki, A., Kusakai, G., Kishimoto, A., Shimojo, Y., Ogura, T., Lavin,

-
- M. F., & Esumi, H. (2004). IGF-1 phosphorylates AMPK-alpha subunit in ATM-dependent and LKB1-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun.* 324(3):986-92.
- Tong, B. C., & Barbul, A. (2004). Cellular and physiological effects of arginine. *Mini Rev Med Chem*, 4(8):823-32.
- Trabelsi, F., Lavoie, J. M. (1996). Arginine-induced pancreatic hormone secretion during exercise in rats. *J Appl Physiol*, 81(6):2528-33.
- van Vliet, S., Burd, N. A., & van Loon, L. J. (2015). The Skeletal Muscle Anabolic Response to Plant- versus Animal-Based Protein Consumption. *J Nutr*, 145(9):1981-91.
- Wang, R., Jiao, H., Zhao, J., Wang, X., & Lin, H. (2018). L-Arginine Enhances Protein Synthesis by Phosphorylating mTOR (Thr 2446) in a Nitric
- Westerterp-Plantenga, M. S., Lemmens, S. G., Westerterp, K. R. (2012). Dietary protein-its role in satiety, energetics, weight loss and health. *Br J Nutr*, 2:S105-12.

