

고지방 및 고포도당 조건에서 배양한 근육 세포의 지방산 대사에 미치는 PPAR- α 와 PPAR- γ agonist의 효과

연세대학교 의과대학 대학원 의과학과 (BK21 의과학 사업단)¹, 연세대학교 의과대학 내과학교실 내분비내과², 인하대학교 의과대학 내과학교실³, 포천중문 의과대학 내과학교실⁴, 아주대학교 의과대학 내분비내과 내과학교실⁵, 서울의료원 부설연구소 임상의학연구실⁶

이용직^{1,6} · 조정산¹ · 김수경⁴ · 김혜진⁵ · 심완섭³ · 안철우² · 이현철² · 차봉수²

Effects of PPAR- α and - γ Agonists on Fatty Acid Metabolism of Muscle Cells in Hyperlipidemic and Hyperglycemic Conditions

Yong jik Lee^{1,6}, Zheng Shan Zhao¹, Soo Kyung Kim⁴, Hae Jin Kim⁵, Wan Sub Shim³, Chul Woo Ahn², Hyun Chul Lee², Bong Soo Cha²

Yonsei University Brain Korea 21 Project for Medical Science¹;

Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine²;

Department of Internal Medicine, Inha University College of Medicine³;

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Pochon CHA University⁴;

Department of Endocrinology and Metabolism, Ajou University School of Medicine⁵;

Division of clinical research, Affiliated Research Institute, Seoul Medical Center⁶

- Abstract -

Background: Studies for the regulation of fatty acid metabolism are deficient relatively in skeletal muscle and heart. The investigations in pathological conditions for malonyl-CoA decarboxylase (MCD) and for the relation of MCD and PPAR- α · - γ agonists are insufficient in particular.

Methods: In the current study, fully differentiated H9c2 muscle cells were exposed to pathological conditions such as hyperlipidemic (0.1 mM Palmitate) and hyperglycemic (16.5 mM Glucose) condition with 5 μ M PPAR- γ agonist (rosiglitazone) and 10 μ M PPAR- α agonist (WY14,643) and then experiments such as MCD activity assay, MCD real-time RT-PCR, MCD reporter gene assay, MCD Western blotting, PPAR- α Western blotting, and palmitate oxidation test were carried out.

Results: Only PPAR- α agonist increased MCD activity. In the result of real-time RT-PCR, both PPAR- α and PPAR- γ agonists elevated MCD mRNA expression in hyperlipidemic condition. MCD protein expression was decreased in hyperlipidemic condition, however, increased in rosiglitazone, or WY14,643 treated conditions. Rosiglitazone, and WY14,643 treated groups showed increased MCD protein expression in hyperglycemic condition.

Hyperlipidemic control group and PPAR- α · - γ agonists treated groups presented about 3.8 times more increased palmitate oxidation level than normolipidemic control group in hyperlipidemic condition.

PPAR- α agonist treated group showed 49% more increased palmitate oxidation rate than hyperlipidemic control group in primary cultured rat skeletal muscle cells. The amount of palmitate oxidation from differentiated H9c2 muscle cells that had overexpressed PPAR- α structural genes was more increased than control group.

Conclusion: This study suggests that PPAR- α agonist ameliorates the defects induced by hyperlipidemic condition through the regulation of MCD.

In summary, a closely reciprocal relation among PPAR- α agonist, MCD, and fatty acid oxidation existed distinctly in hyperlipidemic condition, but not in hyperglycemic condition.

(J Kor Diabetes Assoc 30:324~335, 2006)

Key Words: Fatty acid oxidation, Hyperglycemic, Hyperlipidemic, H9c2 cell, Malonyl-CoA decarboxylase (MCD), PPAR- α agonist, PPAR- γ agonist, Rosiglitazone, Skeletal muscle cell, WY14,643,

서 론

인슐린은 포도당의 자극을 받아 췌장 β 세포에서 분비되어 근육, 간장, 지방조직 같은 주 표적 장기에 작용하여 glucose uptake의 증대, 지방산 합성의 증대, glycogen 합성의 증대와 같은 작용을 하는 호르몬이다. 제2형 당뇨병에서 인슐린은 간과 근육조직에서 본래의 기능을 나타내지 못하는 즉 인슐린 저항성이 발생하게 되고 췌장은 이와 같은 비정상 상태를 정상화하기 위해 더 많은 양의 인슐린을 분비하게 되며 결국 췌장에서 추가로 분비할 수 있는 인슐린 양이 그 한계를 초과하게 되면 혈당이 높아지는 당뇨병이 유발되고 당뇨병은 고지혈증, 비만 같은 다른 대사적 이상 증상을 수반한다.

Malonyl-CoA는 간장^{1,2)} 골격근³⁻⁵⁾, 그리고 심장⁶⁻⁸⁾ 내 지방산 산화 조절에 핵심적인 역할을 하는 대사물질로서 지방산 산화 과정 중 rate-limiting 단계를 촉매 하는 효소인 carnitine palmitoyltransferase I (CPT I)을 억제함으로써 결국 지방산 산화를 떨어뜨리는 조절 작용을 한다¹⁾. malonyl-CoA 농도는 이를 합성하는 acetyl-CoA carboxylase에 의해 조절되는데 간장과 근육에서 malonyl-CoA 농도의 증감은 acetyl-CoA carboxylase 활성 변화와 밀접하게 상호 관련되어 있다⁹⁾. Malonyl-CoA를 분해함으로써 malonyl-CoA의 농도를 조절할 것으로 생각되는 malonyl-CoA decarboxylase (MCD)와 malonyl-CoA 농도와의 상관관계에 대해서는 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다. 지방산은 세포 내에서 많은 필수적인 기능들-생체 내에서 에너지를 생산하는 fuel의 기능, 세포 내 신호 전달의 매개체로서 작용, 생체막의 필수적인 구성 성분, PPAR- α 같은 nuclear transcription factors의 ligands로서 작용을 하므로 세포 내 지방산과 지방산 유도체들의 농도는 엄격하게 조절되지만 세포 내 지방산과 지질들의 증가는 인슐린 저항성^{10,11)}, 췌장 기능장애^{12,13)}, cardiotoxicity¹⁴⁾ 등과 같은 여러 질병들과 관련이 있다¹⁵⁾.

지방 및 포도당 대사에 관련된 많은 유전자 조절에 핵 수용체인 PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor)

들이 관여하는데¹⁶⁾ rosiglitazone 등의 PPAR- γ agonist들은 골격근, 지방 조직, 간장 등의 표적 장기에 insulin-dependent glucose uptake를 촉진시키는 insulin sensitizer로서 작용하며 지방 세포들을 더 작고 더 많은 수의 인슐린에 민감한 세포들로 분화시키는 기능도 한다. 또한 GLUT 4의 발현과 세포 표면으로의 이동을 증대시켜 결과적으로 인슐린에 반응하여 포도당 이용을 증가시킨다¹⁷⁻²⁰⁾.

WY14,643은 PPAR- α activator로서 mitochondria와 peroxisome에서 지방산의 β 산화를 담당하는 효소들의 유전자 전사를 촉진시킴으로써 지방산 산화를 증대하여 결국 강력한 hypolipidemic 효과를 나타낸다²¹⁾.

최근 MCD promoter region을 연구한 자료에 따르면 upstream 쪽 -55~-325 부위에 PPARs binding sites를 포함한 여러 군데의 positive cis-regulatory element들이 존재하고 -1380~-2240 부위에는 negative regulatory element들이 있을 것으로 추측하고 있다²²⁾.

인슐린 저항성을 동반한 질환들에서 포도당 대사 이상과 함께 지방산 대사 조절의 이상은 충분히 예견되고 간장과 같은 기관에서는 많은 연구가 진행되었다. 하지만 인슐린의 주요 표적 장기인 골격근과 에너지 소모량의 60~70%를 지방산 산화로부터 얻는 심장과 같은 기관들에서 지방산 대사 조절에 대한 연구는 상대적으로 부족하며 특히 지방산 산화 및 합성 조절에 핵심적인 역할을 할 것으로 생각되는 MCD의 효소 활성, mRNA 수준에서의 조절, 단백질 발현에서의 조절, 그리고 PPAR agonist들과 MCD의 상호관계 등의 pathophysiological condition들에서의 연구는 더욱 미흡하다. Young 등¹⁵⁾이 발표한 논문에 따르면 SD rat에 고지방식을 섭취시키거나, 일정기간 굶렸을 때, 그리고 streptozotocin으로 당뇨병을 유발시켰을 경우 혈장 내 nonesterified fatty acid들 농도가 모두 의미 있는 수준으로 증가하였고 동시에 쥐 심장과 골격근의 MCD mRNA 발현이 증가하였다. 이 결과는 지방산이 MCD mRNA 발현에 어떤 역할을 함을 암시한다고 볼 수 있다. 또한 PPAR- α agonist 함유 먹이를 먹은 쥐의 심장과 골격근 내 MCD mRNA 발현이 증가하였지만 PPAR- γ agonist 함유 먹이를

먹은 쥐에서는 오히려 MCD mRNA 발현이 감소하였다. 또한 고지방식을 섭취한 쥐의 심장 내 MCD 활성은 감소하였다.

본 연구에서는 근육 세포를 재료로 하여 pathophysiological condition들 즉 hyperlipidemic condition과 hyperglycemic condition에서 세포들에 동시에 rosiglitazone과 WY14,643 등의 PPAR agonist들을 처리하여 MCD 활성, mRNA 발현, protein 발현 등의 변화를 enzyme activity assay, real time RT-PCR, Western blotting 등의 실험을 통해 알아봄으로써 고지방 및 고포도당 조건의 병적 상태에서 MCD가 지방산 대사 조절에 어떻게 작용하는가를 연구하였고 PPAR- α 단백질 발현량 측정을 하였다. 이와 같은 MCD에 대한 직접적인 연구와 함께 지방산 산화 시험 (palmitate oxidation test)을 수행하여 MCD의 지방산 대사 조절 기능을 증명하였다. 또한 PPAR- α 구조 유전자를 정상 근육 세포에 transfection하여 이를 과 발현 시킨 후 지방산 산화 실험과 PPAR- α 단백질 발현량을 측정하여 지방산 산화에 미치는 PPAR- α 의 작용을 참고로 알아보았다.

대상 및 방법

1. 재료

H9c2 근육 세포주는 한국 세포주 은행에서 구입하였다 (서울, 대한민국).

세포배양 시약들은 제일생명공학 (서울, 대한민국)과 GIBCO (Carlsbad, California, USA)에서 구입했다. 방사성 동위원소들은 다음과 같은 회사들로부터 구입했다: American Radiolabeled chemicals, Inc. (St Louis, MO, USA), PerkinElmer Life Sciences, Inc (Boston, MA, USA). ABI Prism 7700 Sequence Detection System과 TaqMan EZ RT-PCR Core Reagents은 Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)에서 구입했다. rat MCD/Luc reporter gene (+1~325)은 김유삼 교수 연구실 (연세대학교, 서울, 대한민국)로부터 공여 받았다. rat PPAR- α 구조유전자는 안용호 교수 연구실 (연세대학교, 서울, 대한민국)로부터 공여 받았다. reporter gene assay에 쓰이는 luciferase assay system은 Promega (Medison, WI, USA)에서 구입했고 O-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG)는 SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, USA)에서 구입했다. 항체들은 다음과 같은 회사들로부터 구입했다: guinea pig polyclonal anti-MCD (PEPTRON, Inc., Seoul, Korea), goat polyclonal anti-PPAR- α (Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA), goat polyclonal anti-cyclophilin B (Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA). chemiluminescence Western blot

detection kit는 Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, England)로부터 구입했다.

2. H9c2 근육 세포주의 배양과 처리

6 well 혹은 12 well 배양 접시에 세포를 분주한 뒤 10% fetal bovine serum (FBS) 함유 배지 (DMEM-F12, 5.5 mM 포도당 농도의 DMEM 저포도당 배지)로써 80% 정도 confluence해질 때까지 자라게 한 뒤 1% FBS 함유 분화 배지로 배지를 갈아주고 4일 동안 myotube 상태로 분화를 시킨다. 4일 동안 분화 중 2일째 때 배지를 바꿔주면서 고농도지방 (0.1 mM palmitate) 혹은 고농도포도당 (16.5 mM glucose) 상태를 만들어주고 동시에 rosiglitazone (5 μ M) 과 WY14,643 (10 μ M)을 처리한다.

3. HepG2 간장 세포주의 배양과 처리

6 well 혹은 12 well 배양 접시에 세포를 분주한 뒤 10% FBS 함유 배지 (DMEM-F12)로써 80% 정도 confluence해질 때까지 자라게 한 뒤 세포의 성장을 멈추게 하기 위해 1% FBS 함유 배지로 갈아 준 다음, 2일 동안 고지방 (0.1 mM palmitate) 상태를 만들어주고 동시에 rosiglitazone (5 μ M) 과 WY14,643 (10 μ M)을 처리한다.

4. 쥐 골격근 세포 배양과 처리

Blau와 Webster²³⁾ 및 Sarabia 등²⁴⁾의 방법을 응용하여 쥐 골격근 배양을 시행한다. 생검 후 골격근 조직을 15 mL DMEM/F-12 media에 넣어 조직을 잘게 분해시킨 다음 실온에서 25 mL 0.05% trypsin/EDTA에서 30분간 3번에 걸쳐 세포를 분리한다. 분리하는 동안 모든 세포는 4°C에 보관한다. 분리된 세포액을 1200 rpm에서 4분 동안 원심 분리한 후, 상층액을 버리고 남은 세포를 골격근 배양액 (DMEM/F-12 with 10% FBS, 1% Antibiotics)을 넣어 재부유 시킨다. 혼합된 세포액을 100 mm 배양 접시에 넣어 95% O₂/ 5% CO₂ incubator에 넣어 배양시킨다. 배양액은 2일에 한번 바꾸어 주어 70~80% confluence가 이루어지는 때에 실험에 이용한다. 분화 및 처리는 H9c2 근육 세포주의 방법에 따른다.

5. MCD 효소 활성 측정

6 well 배양 접시에서 4일 동안 분화시키고 그 중 2일 동안 처리한 세포들을 0.5 mL MCD 추출 완충용액 (pH 7.4 HEPES buffer containing protease inhibitors: 0.575 mM PMSF, 0.002 mg/mL leupeptin, 0.001 mg/mL pepstatin A, 0.002 mg/mL aprotinin, 1 mM EDTA, 10 μ M DTT)을 넣고 수확 및 파쇄를 한 뒤 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리를 하여 그 상층액을 효소액으로 사용한다. MCD 효소 활성 측정은 ¹⁴CO₂ 포집방법을 이용하는데 다음과 같다. 적

Table 1. Primer and Probe Sequences Used for Real Time RT-PCR

Gene	Primer/Probe	Sequence
MCD	Forward	5'-CGGCACCTTCCTCATAAAGC-3'
	Reverse	5'-GGGTATAGGTGACAGGCTGGA-3'
	Probe	5'-FAM-AGTGGTCAAGGAGCTGCAGAAGGAGTTT-TAMRA-3'
Cyclophilin	Forward	5'-CTGATGGCGAGCCCTTG-3'
	Reverse	5'-TCTGCTGTCTTTGGAACCTTTGTC-3'
	Probe	5'-FAM-CGCGTCTGCTTCGAGCTGTTTGCA-TAMRA-3'

당량 (20~30 μ g)의 효소액을 1 mM pH8.0 Tris-HCl, 0.02 mM DTE, 0.018 mM malonyl-CoA(hot:cold=1:3) 0.0375 μ Ci], 증류수 등을 함유한 반응 혼합액에 첨가하여 최종 부피가 150 μ L가 되게 한다. 1시간 30분 동안 반응을 시킨 뒤 10% perchloric acid 25 μ L를 첨가하여 반응을 중지시킨 다음 얼음 속에서 20분 동안 방치하여 $^{14}\text{CO}_2$ 가 충분히 포집되도록 한다. $^{14}\text{CO}_2$ 를 포집한 종이를 vial에 옮기고 scintillation solution을 넣고 counting을 한다.

6. MCD mRNA 발현량 측정

MCD mRNA 발현량을 측정하기 위해 세포들을 각 처리군 당 3개씩 100 mm 접시에 분주, 분화, 그리고 처리한 뒤 mRNA 추출 시약인 TriZol을 1 mL씩 넣고 매뉴얼에 따라 mRNA를 추출한다. MCD mRNA 발현량 측정은 real time RT-PCR (ABI Prism 7700 Sequence Detection System) 방법을 사용하는데 TaqMan EZ RT-PCR Core Reagent들을 사용하여 수행한다. 50 μ L 반응 혼합물의 구성은 다음과 같다.

100 ng total RNA, TaqMan EZ buffer, 3 mM Mn (OAc)₂, 300 μ M dATP, 300 μ M dCTP, 300 μ M dGTP, 600 μ M dUTP, 200 nM MCD forward and reverse primers (or 200 nM Cyclophilin forward and reverse primers), 100 nM MCD Probe (or 100 nM cyclophilin Probe), 0.1 U/L rTth DNA Polymerase, and 0.01 U/L AmpErase.

one-step real time RT-PCR의 조건은 다음과 같다.

2 min at 50°C (initial step), 30 min at 60°C (RT step), 5 min at 95°C (deactivation step), 40 thermal cycles of 20 seconds at 94°C (melting) and 1 min at 62°C (annealing and extend)

7. 유전자 이입 (Transfection)

가. 6 well 배양 접시에 세포를 80%정도 confluence하게 자라게 한 다음

나. (1) 한 well 당 100 μ L 배지 (무 혈청) + 3 μ L Lipofectamine

(2) 한 well 당 100 μ L 배지 (무 혈청) + 1 μ g plasma DNA + 2 μ L Plus reagent, (1)과 (2)를 각각 고르게 섞은 뒤 상온에서 5분 동안 배양
다. (1)과 (2)를 섞은 다음 30분 동안 상온에서 배양
라. 배지 (무 혈청) 800 μ L를 각 well에 넣어준다
마. 각 well에 transfection complex를 옮김
바. 37°C에서 3시간 동안 배양
사. Lipid/DNA를 제거
아. 각 well을 PBS로 닦아주고 혈청을 포함한 배지를 넣은 다음 밤새워 배양

8. Reporter gene assay

가. Luciferase assay reagent 준비

Luciferase assay substrate를 담은 용기에 assay buffer를 첨가한다.

나. 세포 파쇄액 준비

2일 동안 고지방, 고포도당, 그리고 동시에 PPAR- γ 와 PPAR- α agonist를 처리한 후 MCD promoter gene construct를 transfection시킨 배양한 세포에서 배양액을 제거한 뒤 phosphate buffered saline (PBS)으로 씻어준 다음 배양 접시의 각 well에 1 \times lysis buffer를 넣고 파쇄 후 12000 g에서 원심분리를 하고 상층액만 취한다.

다. Luminometer를 사용하여 측정

Luminometer tube에 20 μ L의 세포 파쇄액을 넣고 100 μ L의 substrate를 첨가하여 측정한다.

라. β -galactosidase assay

96 well plate에 세포 파쇄액 50 μ L를 넣고 2 \times buffer 50 μ L를 첨가한 뒤 잘 섞고 용액의 색깔이 약한 노란색을 띠 때까지 37°C에서 30분 동안 반응시킨 다음 1 M sodium carbonate 150 μ L를 첨가하여 반응을 중지시킨 후 420 nm 파장에서 흡광도를 측정한다.

9. 단백질 발현량 측정 (Western blot analysis)

세포가 80% 정도 confluence하게 자란 100 mm 배양 접시에 단백질 추출액 200 μ L를 넣고 수확 후 50초 동안 vortexing을 하여 세포를 파쇄한 뒤 20분 동안 영하 20°C

냉동고에 방치한 후 15,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상층액만을 분리하여 모은 뒤 Bradford 방법으로 단백질량을 측정하고 SDS-PAGE를 실시한다. 전기영동이 끝나면 바로 nitrocellulose membrane에 1시간 30분 동안 transfer를 한 뒤 5% (w/v) fat-free milk powder / TBS-T로 overnight blocking을 실시한다. blocking 후 TBS-T로 10분씩 3번 씻어내고 난 다음 2% (w/v) fat-free BSA / TBS-T에 희석시킨 anti-MCD 또는 PPAR- α polyclonal primary antibody를 2시간 동안 처리한다. TBS-T로 10분씩 3번 씻어낸 뒤 5% (w/v) fat-free milk powder / TBS-T에 희석시킨 HRP-conjugated secondary antibody를 1시간 동안 처리한 후 TBS-T로 10분씩 3번, TBS로 10분 동안 1번 씻어낸 뒤 ECL western blotting detection reagent들을 처리하여 반응을 시킨 뒤 결과를 확인한다. 대조 단백질로서 cyclophilin을 사용하였다.

10. 지방산 산화량 측정 (Palmitate oxidation)

Palmitate oxidation 측정은 Rognstad의 방법²⁵⁾을 변형하

여 사용한다. 즉, 12 well 배양접시에서 세포를 serum-free media 490 μ L를 넣고 배양하는데, 10 μ L의 기질액 ([9,10- 3 H] palmitic acid, 0.2 μ Ci, final concentration = 5 μ mol/L)을 첨가하여 3시간 동안 37°C 95% O₂ : 5% CO₂ incubator에서 배양한다. 배양 후 배양액 100 μ L를 ion-exchange resin이 들어 있는 column에 넣고 배양액이 충분히 내려간 후에 증류수 0.75 mL를 두 번에 걸쳐 넣어 준다. 이때 non-oxidized palmitate (charged state)는 resin에 걸려 column안에 머무르게 되고, oxidized palmitate는 자유롭게 column을 통과하여 물 (HO³H)의 형태로 아래로 흘러 vial에 모아진다. 3 H의 radioactivity를 liquid scintillation spectrophotometer를 이용하여 측정한다.

11. 통계학적 분석

두 실험 군 사이의 통계학적으로 의미 있는 차이 여부는 Student's t-test를 사용하여 결정하였고 $P < 0.05$ 일때 의미 있는 값으로 하였으며 모든 실험 결과는 평균값 \pm 표준 오차로써 나타내었다.

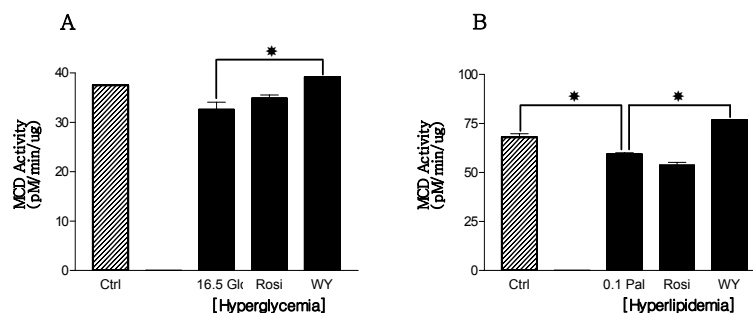


Fig. 1. The alteration of MCD activities in hyperglycemic (A) and hyperlipidemic (B) conditions. Fully differentiated myotubes were treated with 5 μ M rosiglitazone and 10 μ M WY14,643 in hyperglycemic condition and in hyperlipidemic condition. Only WY-14,643 increased MCD enzyme activity in hyperglycemic and hyperlipidemic conditions.

* $P < 0.05$

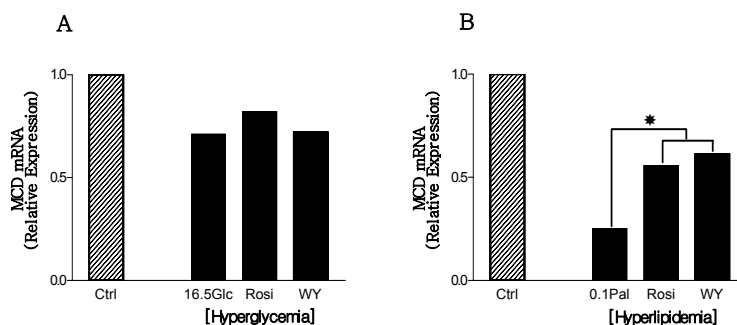


Fig. 2. The alteration of MCD mRNA expressions in hyperglycemic (A) and hyperlipidemic (B) conditions. The elevation of MCD mRNA expression by PPAR agonists was observed in hyperlipidemic condition, however, not in hyperglycemic condition.

* $P < 0.05$

결 과

1. MCD 효소 활성

H9c2 근육 세포를 배양접시에 80%까지 자라게 한 후 생장배지 (혈청 10% 함유)에서 분화용 배지 (혈청 1% 함유)로 바꿔주어 4일 동안 분화시킨다. 분화 중 마지막 2일 동안 고포도당 및 고지방 처리를 해주고 동시에 PPAR- γ 와 PPAR- α agonist를 처리해 준다. 배양이 끝난 뒤 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)을 사용하여 세포를 씻어준 다음 수확하고 파쇄하여 MCD 효소 활성 측정을 위한 효소 추출액을 제조한다.

$^{14}\text{CO}_2$ 포집방법을 사용하여 MCD 효소 활성을 측정한 결과 PPAR- α agonist인 WY-14,643만이 고지방 및 고포도당 상태에서 저하된 MCD 효소 활성을 증가시켰다. 그러나 PPAR- γ agonist인 rosiglitazone은 고지방 및 고포도당 두 조건에서 MCD 효소 활성을 증가시키지 못하였다 (Fig. 1).

2. MCD mRNA 발현량

Real time RT-PCR 실험 방법을 이용하여 MCD mRNA 발현량을 측정한 결과 고포도당 조건에서는 정상 대조군,

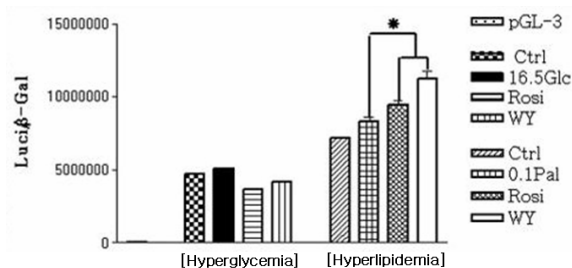


Fig. 3. The result of MCD promoter gene assay in hyperglycemic and hyperlipidemic conditions. The expression rate of MCD promoter gene was increased by PPAR agonists in hyperlipidemic condition, however, not in hyperglycemic condition.

* $P < 0.05$

고포도당 대조군, 그리고 rosiglitazone 및 WY14,643 처리군들 사이에 의미 있는 MCD mRNA 발현량의 차이가 없었다. 그러나 고지방 조건에서는 고지방 대조군이 정상 대조군보다 1/4 정도로 감소하였는데 rosiglitazone 및 WY14,643 처리를 하면 두 배 이상 MCD mRNA 발현량이 증가하였다 (Fig. 2).

3. MCD reporter gene assay

MCD promoter gene construct (+1~325)를 H9C2 세포에 이입시킨 후 reporter gene assay를 한 결과 real time RT-PCR 결과와 유사하게 고지방 조건에서만 PPAR- α 와 PPAR- γ agonist들이 MCD promoter gene의 발현을 증가시켰다.

즉 고포도당 조건에서는 각 실험군들 사이에 MCD promoter gene 발현율에 차이가 없었다. 그러나 고지방 조건에서는 rosiglitazone 및 WY14,643 처리를 받은 실험군이 고지방 대조군보다 MCD promoter gene 발현율이 증가하였다. MCD real time RT-PCR 결과와 달리 고지방 대조군이 오히려 정상 대조군보다 promoter gene 발현율이 약간 더 증가하였다 (Fig. 3).

4. MCD 단백질 발현량

고포도당 조건에서 MCD 단백질 발현량은 정상 대조군과 통계학적으로 의미 있는 차이는 없었고 고포도당 조건에서 PPAR- γ - α agonist들인 rosiglitazone과 WY-14,643을 처리했을 경우 단백질 발현량이 증가했다. 고지방 조건에서는 정상 대조군의 MCD 단백질 발현량의 42%로 저하되었고 rosiglitazone과 WY-14,643을 처리했을 때 2배 이상 발현량이 증가하였다 (Fig. 4).

5. H9c2 근육 세포주와 HepG2 간장 세포주에서 지방산 산화

H9c2 근육 세포주의 경우 고포도당 조건에서 각 실험군

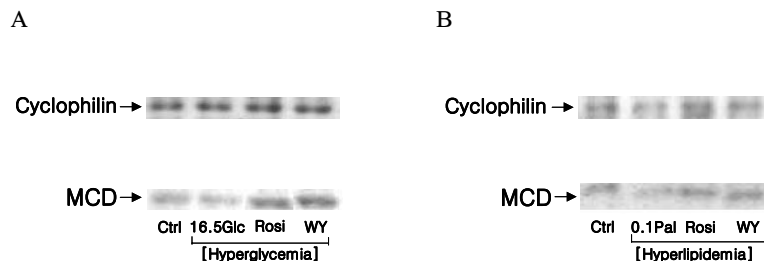


Fig. 4. The alteration of MCD protein expressions in hyperglycemic (A) and hyperlipidemic (B) conditions. MCD protein expression that was decreased in hyperlipidemic condition was increased by treatments of PPAR agonists. In hyperglycemic condition PPAR agonists increased MCD protein expression.

* $P < 0.05$

들 간에 지방산 산화량 차이는 없었다. 그러나 고지방 조건에서는 고지방 대조군과 PPAR- α , - γ agonist들을 처리한 군들이 정상 대조군에 비해 지방산 산화량이 약 3.8배 증가했다. 그러나 고지방 대조군과 agonist들을 처리한 군들 사이에 지방산 산화량에 차이는 없었다.

고지방 조건에서 HepG2 간장 세포주의 지방산 산화 양

상 또한 H9c2 근육 세포주와 마찬가지로 고지방 대조군과 PPAR- α , - γ agonist들을 처리한 군들이 정상 대조군에 비해 지방산 산화량이 증가하였다. 그러나 고지방 대조군과 PPAR agonist들을 처리한 군들 사이에 지방산 산화량에 차이는 없었다 (Fig. 5).

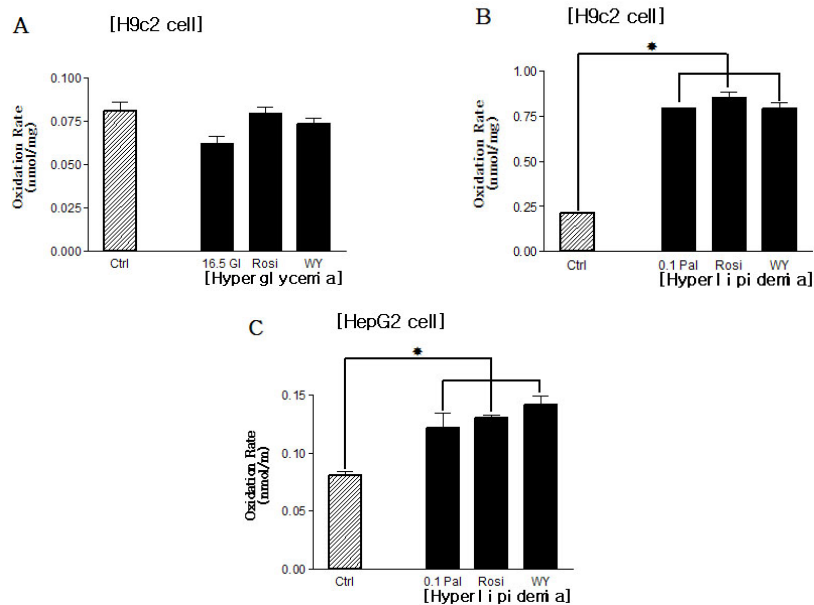


Fig. 5. The effects of PPAR agonists on palmitate oxidations from H9c2 cells (A, B) in hyperglycemic (A) and hyperlipidemic (B) conditions, and from HepG2 cells (C) in hyperlipidemic condition. Palmitate oxidation was increased in only hyperlipidemic condition.

The increase of palmitate oxidation from H9c2 cells occurred only in hyperlipidemic condition, but palmitate oxidation rates among hyperlipidemic control group and PPAR agonists treated groups were not different. HepG2 cells in hyperlipidemic condition was like to the palmitate oxidation aspect of H9c2 cells in same condition.

* $P < 0.05$

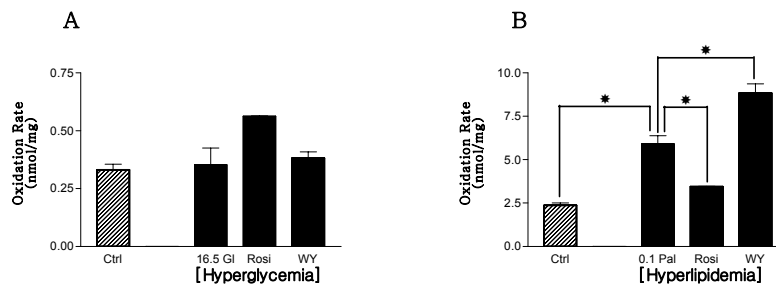


Fig. 6. The effects of PPAR agonists on palmitate oxidations from primary cultured rat skeletal muscle cell in hyperglycemic (A) and hyperlipidemic (B) conditions. There was no differences among experimental groups in hyperglycemic condition. But in hyperlipidemic condition the palmitate oxidation rates of hyperlipidemic control group and PPAR- α agonist treated group were more increased than normolipidemic control group and hyperlipidemic control group respectively, however, the palmitate oxidation rate of PPAR- γ agonist treated group was decreased in comparison with hyperlipidemic control group.

* $P < 0.05$

6. 배양한 쥐 골격근 세포의 지방산 산화

배양한 쥐 골격근 세포에서도 고포도당 조건에서는 각 실험 군들 사이에 지방산 산화량에 차이는 없었다. 고지방 조건에서 정상 대조군보다 고지방 대조군이 2배 이상 지방산 산화량이 증가 하였으며 PPAR- α agonist를 처리한 군이 고지방 대조군보다 지방산 산화량이 49% 더 증가했다. 그러나 PPAR- γ agonist를 처리한 군은 고지방 대조군보다 오히려 지방산 산화량이 감소하였다 (Fig. 6).

7. PPAR- α 단백질 발현량

고지방 조건에서 정상 대조군, 고지방 대조군, 그리고 고지방 조건에서 rosiglitazone을 처리한 실험 군들은 모두 동일한 수준의 PPAR- α 단백질 발현 양상을 나타냈고 PPAR-

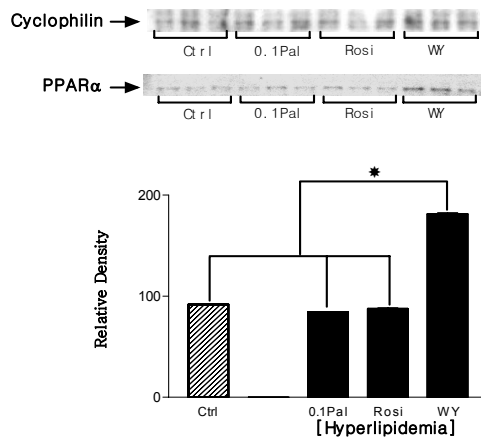


Fig. 7. The alteration of PPAR- α protein expression in hyperlipidemic condition

In hyperlipidemic condition, only protein expression of WY14,643 treated group was increased.

* $P < 0.05$.

α agonist인 WY-14,643을 처리한 실험 군에서만 다른 실험 군들에 비해 PPAR- α 단백질 발현량이 약 2배로 증가하였다. 결과에는 배제하였지만 고포도당 조건에서는 오직 PPAR- α agonist인 WY-14,643을 처리한 실험 군에서만 PPAR- α 단백질 발현 때가 관찰되었다 (Fig. 7).

8. PPAR- α 구조 유전자를 과발현시킨 상태에서 지방산 산화량의 변화와 PPAR- α 단백질 발현량의 변화

PPAR- α 구조 유전자를 과발현 시킨 경우 대조군보다 지방산 산화량이 증가하였다. PPAR- α 구조 유전자를 과발현 시키면서 동시에 WY14,643을 처리한 실험군은 과발현만 시킨 실험군보다 지방산 산화량이 증가는 하였지만 통계학적 의미는 없었다. PPAR- α 단백질 발현량 변화 또한 지방산 산화량 변화와 마찬가지로 PPAR- α 구조 유전자를 과발현시킨 경우 대조군보다 증가함. 하지만 PPAR- α 구조 유전자를 과발현 시키면서 동시에 WY14,643을 처리한 실험군은 과발현만 시킨 실험군보다 단백질 발현량이 더 증가하지는 않았다 (Fig. 8).

고 찰

최근 발표된 논문들에 따르면 WY-14,643 처리를 받은 hepatoma cells과 fenofibrate (PPAR- α agonist)를 먹인 Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) rat에서 MCD mRNA 발현이 증가하였음이 보고되었다. 같은 논문에서 PPAR- α 는 MCD promoter내의 PPRES에 결합함으로써 rat hepatic MCD transcription을 촉진시키고 따라서 MCD는 malonyl-CoA의 농도를 변화시킴으로써 지방산 산화와 활성화된 PPAR- α 사이의 조절 기전을 이해하는데 중요한 역할을 할 수 있다고 보고하고 있다²⁷⁾.

Campbell 등²⁸⁾의 보고에서는 PPAR- α 가 결여된 생쥐의

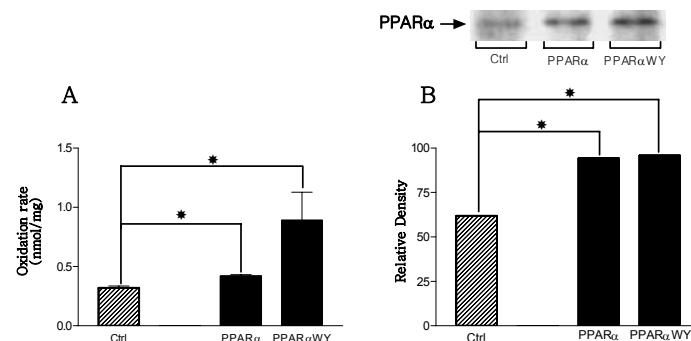


Fig. 8. The variations of palmitate oxidation (A) and PPAR- α protein expression (B) rates after PPAR- α structural gene overexpression. PPAR- α overexpression group showed increased palmitate oxidation rate and PPAR- α protein expression as comparison with control group.

* $P < 0.05$.

심장 내 감소된 지방산 산화율과 증가된 포도당 산화율은 malonyl-CoA 농도의 증가 및 MCD 발현의 저하와 관련이 있음을 주장하고 있다. 또한 WY-14,643이 PPAR- α 를 활성화시켜 심장과 골격근에서 MCD의 mRNA 발현을 증가시켰지만 PPAR- γ agonist인 troglitazone은 MCD mRNA 발현을 감소시켰으며 지방산 자체가 쥐의 심장과 골격근에서 MCD의 발현을 유도했다는 보고도 있다²⁶⁾. 이밖에 다른 PPAR- α agonist인 GW7647은 primary human skeletal muscle cells에서 MCD의 mRNA 발현을 증가시켰다는 논문도 발표되었다²⁹⁾.

본 연구결과 H9c2 근육 세포주에서 malonyl-CoA decarboxylase (MCD)는 고지방 조건에서 PPAR- γ 와 - α agonist들인 rosiglitazone과 WY-14,643의 자극을 받아 효소활성 (activity), mRNA 발현, 그리고 단백질 발현 등이 증가하였는데 특히 WY-14,643의 효과가 두드러졌다. 반면 고평도당 조건에서는 rosiglitazone이 MCD 효소활성에 영향을 끼치지 못했으며 오직 WY-14,643만이 MCD의 효소활성과 단백질 발현량 둘 다를 증가시켰다.

MCD mRNA 발현이 고지방 조건 시 고지방 대조군이 정상 대조군보다 1/4 정도로 감소하였는데 MCD reporter gene assay에서는 고지방 조건에서 대조군보다 16% 정도 promoter의 발현 (normalized luciferase activity)이 증가하였다. Rat MCD gene promoter의 특징은 -55~-325 region에 positive cis-regulatory elements이 결합을 하고 -1380~-2240 region에는 negative regulatory elements이 존재할 것으로 추측²²⁾하고 있는데 본 연구에서 사용된 MCD reporter gene construct는 +1~-325 region의 promoter gene이다. 따라서 real time RT-PCR을 이용한 MCD mRNA 발현량 측정 실험에서는 H9c2 세포 MCD의 +1~-2240의 전체 promoter region이 존재하므로 고지방 조건을 위해 처리한 palmitate가 promoter의 upstream region (-1380~-2240)에 결합하여 negative regulator로 작용하여 대조군보다 mRNA 발현량이 현저하게 감소한 것으로 추론을 할 수 있다. 같은 맥락에서 negative regulatory elements이 결합할 자리가 없는 짧은 MCD promoter gene을 사용한 MCD reporter gene assay에서는 palmitate가 억제 작용을 하지 못하여 오히려 약간 증가한 양상을 보인 것으로 생각할 수 있다.

WY-14,643은 PPAR- α 와 결합하여 이를 활성화시키고 활성화된 PPAR- α 는 고지방 상태에서 저하된 MCD의 transcription과 translation을 증가시켜 MCD 효소활성을 증가시켰다고 추론할 수 있다. PPAR- γ 는 지방조직에서 주로 발현되고 adipogenesis와 lipogenesis를 촉진하며 인슐린 저항성 개선에 관여한다고 일반적으로 알려져 있으며 골격근 세포에서는 지방세포의 5~10%의 PPAR- γ 발현율을 보인다고 한다³⁰⁾. PPAR- γ agonist인 rosiglitazone이 고지방 조건

에서 MCD의 mRNA 발현과 단백질 발현을 증가시켰음에도 MCD 효소활성이 증가하지 않은 것은 rosiglitazone 처리 조건에서 MCD 효소 단백질이 합성된 후 어떤 posttranslational modification이 발생하여 MCD 효소활성이 증가하지 않은 것일 수 있다는 조심스러운 추론을 할 수 있다. MCD와 PPAR- γ 그리고 rosiglitazone간의 상관관계를 밝힌 연구는 매우 드물며 앞으로 이 관계를 다루는 연구 및 고찰이 필요하다.

심한 lipotrophic diabetes 동물 모델인 A-ZIP/F-1 생쥐에서 WY-14,643을 처치하면 혈청 내 중성 지방 (triglyceride)과 지방산 수준이 정상화되었고, 간장과 근육 내 중성 지방 함량을 낮추었다²¹⁾. Dominant-negative muscle-specific IGF- I receptor (MKR) 생쥐에서 WY-14,643을 처치하면 간장 내 CD36 (지방산 획득 단백질)의 mRNA 발현이 증가하고, 근육 내 uncoupling protein 3 (UCP 3)의 mRNA 발현이 높아졌으며 결과적으로 간장과 근육의 중성 지방 함량이 감소하였다는 보고가 있다³¹⁾.

OLETF 쥐의 islet과 soleus muscle에서 PPAR- α agonist인 fenofibrate와 PPAR- γ agonist인 rosiglitazone 등이 지방산 산화를 증가시켰다는 보고 또한 있다³²⁾.

본 연구 결과에서 H9c2 근육세포에서는 고지방 대조군 및 고지방에 rosiglitazone과 WY-14,643을 처리한 실험군들이 정상 대조군보다 3배 정도 지방산 산화가 증가하였으나 고지방 대조군과 고지방에 rosiglitazone과 WY-14,643을 같이 처리한 실험군들 간에 차이는 없었다. 고지방 조건에서 HepG2 간장 세포주에서 수행한 지방산 산화 실험에서도 H9c2 근육세포에서와 동일한 결과를 얻었다. 배양한 쥐 골격근 세포에서 수행한 고지방 조건에서 지방산 산화 실험 결과는 고지방 대조군이 정상 대조군보다 2배 이상 산화량이 증가한 것은 H9c2 근육세포와 같았지만 rosiglitazone을 처리했을 때는 오히려 고지방 대조군보다 더 낮아졌고 WY-14,643을 처리했을 때는 고지방 대조군보다 49% 이상 더 증가하였다. 고평도당 조건에서 수행한 지방산 산화 실험에서는 H9c2 근육세포와 배양한 쥐 골격근 세포 둘 다에서 각 군 간 지방산 산화량에 차이가 없었다.

이상의 결과에서 고지방 조건 자체가 지방산 산화를 자극하는 요인이 됨을 알 수 있고 쥐 골격근 세포의 실험결과로부터 PPAR- α agonist인 WY-14,643이 지방산에 의해 증가된 지방산 산화를 더 촉진함을 알 수 있다. H9c2 근육세포와 쥐 골격근 세포 사이에 고지방 조건에서 지방산 산화 양상이 PPAR agonists을 처리하였을 때 다르게 나타난 것은 세포주 (cell line)와 생체에서 바로 떼어 내 배양한 세포 간의 세포 특이성 차이 때문인 것으로 추론할 수 있다. 이는 HepG2 간장 세포주와 H9c2 근육 세포주에서 수행한 고지방 조건에서 지방산 산화 양상이 같은 데서도 증명된다.

고포도당 조건에서 각 세포와 실험 군들에서 지방산 산

화가 차이가 없는 것은 포도당 농도의 증가가 직접적으로 지방산 산화에 영향을 미치지 못하며 고포도당 인자는 PPAR들을 자극하지 못한다고 추론할 수 있다.

Rosiglitazone이 지방산 산화를 증가시켰다는 보고는 있으나 그 정확한 기전 및 상세한 연구는 아직 부족한 상황이고 향후 PPAR- γ agonist와 지방산 산화 사이의 관계에 대한 더 심도 있는 연구가 필요할 것이다.

지방산 산화 실험 결과에 보충적인 설명을 위하여 고포도당 및 고지방 조건에서 PPAR- α 의 단백질 발현량을 알아본 결과 고포도당 조건에서는 PPAR- α 의 발현이 각 실험군들에서 거의 일어나지 않았으며 고지방 조건에서는 정상 대조군, 고지방 대조군, 그리고 rosiglitazone 처리군들 간에는 발현량에 차이가 없었으나 고지방 조건에서 WY-14,643을 처리하였을 때는 다른 세 실험 군들보다 2배 정도 단백질 발현량이 증가하였다. 이 결과로부터 WY-14,643이 PPAR- α 를 자극하여 그 단백질량을 증가시켜 결국 지방산 산화를 증대시킴을 알 수 있다.

PPAR- α 가 Knock-out된 생쥐에서 PPAR- δ 의 지방산 자극 효과로 인해 별다른 지방산 산화의 감소 효과가 일어나지 않았다는 보고가 있고³³⁾, 지방조직에서 PPAR- δ 의 in vivo activation은 지방산 산화를 통한 에너지 소비의 up-regulation을 유도하고 결과적으로 혈청 내 중성 지방과 유리 지방산 수준은 감소하고 지질 축적 역시 떨어지게 되며 에너지 항상성을 유지하기 위한 sensor로서 PPAR- δ 는 작용 (과식과 유전적인 요인에 의한 비만을 막기 위한)하며 PPAR- δ 와 PPAR- α 는 동시에 지방산 연소를 증가시킨다는 보고가 발표되었다³⁴⁾.

H9c2 근육 세포에서 PPAR- α 단백질 발현이 정상 대조군에 비해 고지방 대조군과 rosiglitazone 처리군들에서 증가하지 않았음에도 불구하고 고지방 조건의 지방산 산화 실험에서는 정상 대조군에 비해 3배 정도 증가한 것은 H9c2 근육 세포 안에 존재하는 PPAR- δ 의 지방산 자극 효과 때문인 것으로 추론할 수 있다.

정상 조건에서 H9c2 근육 세포에 PPAR- α 구조 유전자를 transfection시켰을 때, 그리고 동시에 WY-14,643을 처리하였을 때 지방산 산화량 변화를 본 실험 결과에서 대조군보다 PPAR- α 구조 유전자를 transfection시킨 군들에서 통계학적으로 의미 있는 증가가 나타난 것은 지방산 산화에 PPAR- α 가 촉진 인자로서 작용함을 증명하는 것이다.

결론적으로 근육세포 특히 H9c2 근육 세포에서 고지방 조건으로 인해 유도된 대사 이상은 PPAR- α agonist인 WY-14,643의 PPAR- α 활성화와 그에 따른 MCD 효소 활성의 증대와 지방산 산화 수준의 높아짐 등의 효과를 통해 개선이 되었다고 할 수 있다.

그러나 PPAR- γ agonist인 rosiglitazone은 고지방 조건으로 유도된 대사 이상의 MCD를 통한 개선 효과가 없었다.

고포도당 조건에서 WY-14,643과 rosiglitazone 등을 통한 MCD활성과 지방산 산화에 전체적으로 별다른 변화가 없는 것을 볼 때 고포도당 조건에서 PPAR agonist들의 지방산 산화 대사의 개선 효과는 없고 고포도당 조건 자체가 본 연구의 실험 조건에서는 지방산 산화에 의미 있는 영향을 미치지 못했다고 볼 수 있다.

앞으로 지방산 대사 특히 지방산 산화에 미치는 PPAR- γ 의 더 장기적인 실험 조건에서 그 영향을 보는 것과 PPAR- δ 의 지방산 산화 증가와 지방 대사 조절 등을 알아보는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구는 PPAR- α agonist인 WY-14,643이 MCD의 조절을 통해서 고지방 조건으로 인해 유도된 대사적 결함을 완화하는 기능을 할 수 있음을 강하게 암시하고 있다. 그러나 PPAR- γ agonist는 병리적 조건에서 MCD와 지방산 산화 등과 밀접한 상호관련이 없었다.

즉, 고지방 상태에서 PPAR- α agonist, MCD, 그리고 지방산 산화 사이에는 강한 상호관계가 존재한다. 그러나 고포도당 상태에서는 이러한 상호관계가 없다.

요 약

연구배경: 골격근과 심장에서 지방산 대사의 조절에 관한 연구는 상대적으로 부족한 실정이다. 특히 지방산 대사에서의 필수적인 역할을 할 것으로 추측되는 malonyl-CoA decarboxylase (MCD)와 PPAR- α · γ agonist들과의 상호관계 등에 관한 병리적 조건에서 수행된 연구는 미흡한 상태이다.

방법: 본 연구에서는 충분히 분화된 H9c2 근육 세포들을 고지방 (0.1 mM palmitate) 및 고포도당 (16.5 mM glucose)같은 병리적 조건에서 5 μ M PPAR- γ agonist (rosiglitazone) 혹은 10 μ M PPAR- α agonist (WY14,643)를 처리한 상태에서 MCD activity assay, MCD real-time RT-PCR, MCD reporter gene assay, MCD Western blotting, PPAR- α Western blotting, 그리고 지방산 산화 시험 (palmitate oxidation test)등의 실험을 수행하였다.

결과: 병리적 조건에서 감소된 MCD 활성은 PPAR- α agonist인 WY14,643만이 증가시켰다. real-time RT-PCR을 한 결과 PPAR- α 및 PPAR- γ agonist들 둘 다 고지방 조건에서 MCD mRNA 발현을 증가시켰다.

MCD 단백질 발현은 고지방 조건에서 감소하였지만 rosiglitazone과 WY14,643을 처리하였을 때 증가하였다. 고포도당 조건에서 고포도당 대조군은 정상 대조군과 단백질 발현에 차이는 없었으나 rosiglitazone과 WY14,643을 처리하였을 때 MCD 단백질 발현이 증가하였다.

고지방 조건에서 고지방 대조군과 PPAR- α · γ agonist들을 처리한 군들은 정상 대조군보다 3.8배 더 증가한 지방산

산화량을 나타내었다.

배양한 쥐 골격근 세포들에서 지방산 산화 시험 결과는 PPAR- α agonist 처리 군이 고지방 대조군보다 49% 더 증가한 지방산 산화량을 보여 주었다.

PPAR- α 구조 유전자가 과 발현된 H9c2 근육 세포들은 대조군보다 지방산 산화량이 더 증가 하였다.

결론: 이상의 연구를 통해서 PPAR- α agonist인 WY14,643은 MCD를 조절함으로써 고지방 조건으로 인해 유도된 대사적 결함들을 완화하는 효과가 있다고 추론할 수 있다. 그러나 PPAR- γ agonist인 rosiglitazone은 병리적 조건에서 MCD 및 지방산 산화와 밀접한 상호관계를 보여주지 못했다. 결론적으로 고지방 조건에서 PPAR- α agonist인 WY14,643, MCD, 그리고 지방산 산화 사이에는 밀접한 상호관계가 존재한다. 그러나 고포당 조건에서는 이와 같은 상호관계는 관찰되지 않았다.

핵심단어: 고지방, 고포도당, 골격근 세포, 지방산 산화, H9c2, Malonyl-CoA decarboxylase (MCD), PPAR- α agonist, PPAR- γ agonist, Rosiglitazone, WY14,643

참 고 문 헌

- Chien D, Dean D, Saha AK, Flatt JP, and Ruderman NB: Malonyl-CoA content and fatty acid oxidation in rat muscle and liver in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279:E259-65, 2000
- Dyck JRB, Berthiaume LG, Thomas PD, Kantor PK, Amy J. Barr AJ, Barr R: Characterization of rat liver malonyl-CoA decarboxylase and the study of its role in regulating fatty acid metabolism. *Biochem. J* 350: 599-608, 2000
- Alam N, and Saggerson, ED: Malonyl-CoA and the regulation of fatty acid oxidation in soleus muscle. *Biochem. J* 334:233-41, 1998
- Ruderman NB, Saha AK, Vavvas D, and Witters LA: Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am J Physiol.* 276:E1-18, 1999
- Saha AK, Schwarsin AJ, Roduit R, Kaushik V, Tornheim K, and Ruderman NB: Activation of malonyl-CoA decarboxylase in rat skeletal muscle by contraction and the AMP-activated protein kinase activator 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-D-ribofuranoside. *J Biol Chem* 275:24279-83, 2000
- Awan MM, and Saggerson ED: Malonyl-CoA metabolism in cardiac myocytes and its relevance to the control of fatty acid oxidation. *Biochem J* 295: 61-6, 1993
- Kudo N, Barr AJ, Barr RL, Desai S, and Lopaschuk GD: High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem* 270:17513-20, 1995
- Sakamoto J, Barr RL, Kavanagh KM, and Lopaschuk GD: Contribution of malonyl-CoA decarboxylase to the high fatty acid oxidation rates seen in the diabetic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H1196-204, 2000
- Park HJ, Kaushik VK, Constant S, Prentki M, Przybytkowski E, Ruderman NB, and Saha AK: 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* 277:32571-7, 2002
- Reaven GM: Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37:1595-607, 2000
- Ruderman NB, Saha AK, Vavvas D, and Witters LA: Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 276: E1-18, 1999
- Shimabukuro M, Zhou Y, Levi M, and Unger R: Fatty acid-induced b-cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(5):2498-502, 1998
- Unger R, Zhou Y, and Orci L: Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:2327-32, 1999
- Zhou Y, Grayburn P, Karim A, Shimabukuro M, Higa M, Baetens D, Orci L, and Unger R: Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:1784-89, 2000
- Young ME, Goodwin G, Ying J, Guthrie P, Christopher R, Wilson CR, Laws FA, Taegtmeier H: Regulation of cardiac and skeletal muscle malonyl-CoA decarboxylase by fatty acids. *Am J Physiol Enocrinol Metab* 280:E471-9, 2001
- Latruffe N, Vamecq J: Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) as regulators of lipid metabolism. *Biochimie* 79:81-94, 1997
- Zinman B: PPAR γ agonists in type2 diabetes: how far

- have we come in preventing the inevitable? A review of the metabolic effects of rosiglitazone. *Diabetes Obes Metab* 3:S34-43, 2001
18. Kramer D, Shapiro R, Adler A, Bush E, Rondinone CM: *Insulin-sensitizing effect of rosiglitazone (BRL-49653) by regulation of glucose transporters in muscle and fat of Zucker rats. Metabolism* 50: 1294-300, 2001
 19. Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, Glass L, Mahankali S, Ferrannini E, Cusi K, Mandarino LJ, DeFranzo RA: *Improved glycemic control and enhanced insulin sensitivity in type 2 diabetic subjects treated with pioglitazone. Diabetes Care* 24:710-9, 2001
 20. Spiegelman BM: *PPAR- γ : Adipogenic regulator, thiazolidinedione receptor, Diabetes* 47:507-17, 1998
 21. Chou CJ, Haluzik M, Gregory C, Dietz KR, Vinson C, Gavrilova O, and Reitman ML: *WY14643, a PPAR α Agonist, Improves Hepatic and Muscle and Steatosis and Reverses Insulin resistance in Lipoatrophic A-ZIP/F-1 Mice. J Biol Chem* 277:24484-9, 2002
 22. Lee GY, Cho JW, Lee HC, Kim YS: *Genomic organization and characterization of the promoter of rat malonyl-CoA decarboxylase gene. Biochim Biophys Acta* 1577(1):133-8, 2002
 23. Blau HM, Webster C: *Isolation and characterization of human muscle cells. Proc Natl Acad Sci USA* 78:L5623-7, 1981
 24. Sarabia V, Lam L, Burdett E, Leiter LA, Klip A: *Glucose uptake in human and animal muscle cells in culture. Biochem Cell Biol* 68:536-42, 1990
 25. Rognstad R: *Estimation of peroxisomal and mitochondrial fatty acid oxidation in rat hepatocytes using tritiated substrates. Biochem J* 279:147-50, 1991
 26. Young ME, Goodwin GW, Ying J, Guthrie P, Wilson CR, Laws FA, and Taegtmeier H: *Regulation of cardiac and skeletal muscle malonyl-CoA decarboxylase by fatty acids. Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E471-9, 2001
 27. Lee GY, Kim NH, Zhao ZS, Cha BS, and Kim YS: *Peroxisomal-proliferator-activated receptor α activates transcription of the rat hepatic malonyl-CoA decarboxylase gene: a key regulation of malonyl-CoA level. Biochem J* 378:983-90, 2004
 28. Campbell FM, Kozak R, Wagner A, Altarejos JY, Dyck JRB, Belke DD, Severson DL, Kelly DP, Lopaschuk GD: *A Role for Peroxisome Proliferator-activated Receptor α (PPAR α) in the Control of Cardiac Malonyl-CoA Levels. J Biol Chem* 277:4098-103, 2002
 29. Muoio DM, Way JM, Tanner CJ, Winegar DA, Klierer SA, Houmard JA, Kraus WE, Dohm GL: *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α Regulates Fatty Acid Utilization in Primary Human Skeletal Muscle Cells. Diabetes* 51:901-9, 2002
 30. Braissant O, Fufelle F, Scotto C, Dauca M, and Wahle W: *Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β , and - γ in the adult rat. Endocrinology* 137(1):354-66, 1996
 31. Kim H, Haluzik M, Asghar Z, Yau D, Joseph JW, Fernandez AM, Reitman ML, Yakar S, Stannard B, Heron-Milhavet L, Wheeler MB, LeRoith D: *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α Agonist Treatment in a Transgenic Model of Type 2 Diabetes Reverses the Lipotoxic State and Improves Glucose Homeostasis. Diabetes* 52:1770-8, 2003
 32. Koh EH, Kim MS, Park JY, Kim HS, Youn JY, Park HS, Youn JH, Lee KU: *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)- α Activation Prevents Diabetes in OLETF Rats: Comparison With PPAR-Activation. Diabetes* 52:2331-37, 2003
 33. Muoio DM, MacLean PS, Lang DB, Li S, Houmard JA, Way JM, Winegar DA, Corton JC, Dohm GL, Kraus WE: *Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α knock-out mice. Evidence for compensatory regulation by PPAR δ . J Biol Chem* 277:26089-97, 2002
 34. Wolf G: *The function of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor δ in energy homeostasis. Nutr Rev* 61:387-90, 2003