

OLETF 쥐에서 페노피브레이트에 의한 당뇨병 예방: 내장 지방증 감소의 간에서의 기전

동아대학교 의과대학 내과학교실¹, 동아대학교 의과대학 약리학교실², 침례병원 내과³, 진주반도병원 내과⁴,
한서병원내과⁵, 동아대학교의료원 내과⁶, 동아대학교 대학원 의학과⁷, 동아대학교 의과대학 병리학교실⁸, 동아대학교 의과대학
영상의학교실⁹, 동아대학교 의과대학 해부학교실¹⁰, 동아대학교 의과대학 생리학교실¹¹

이혜정²·박미경¹·이경일³·안용준⁴·김지민⁵·박자영⁶·한 영⁷
홍숙희⁸·최순섭⁹·유영현¹⁰·서덕준¹¹·김덕규¹

Prevention of Diabetes by Fenofibrate in OLETF Rats: Hepatic Mechanism for Reducing Visceral Adiposity

Hye-Jeong Lee², Mi-Kyoung Park¹, Kyung Il Lee³, Young-Jun An⁴, Ji Min Kim⁵, Ja Young Park⁶,
Young Han⁷, Sook-Hee Hong⁸, Sun-Seob Choi⁹, Young Hyun Yoo¹⁰, Joon Duk Suh¹¹, Duk Kyu Kim¹

*Internal Medicine Department¹, Medical College of Dong-A University; Pharmacology Department²,
Medical College of Dong-A University; Internal Medicine Department³, Baptist Hospital; Internal Medicine Department⁴, Bando
Hospital, JinJu; Internal Medicine Department⁵, Hanseo Hospital; Internal Medicine Department⁶, Dong-A University Medical
Center; Graduate School⁷, Dong-A University; Pathology Department⁸, Medical College of Dong-A University;
Diagnostic Radiology Department⁹, Medical College of Dong-A University; Anatomy Department¹⁰, Medical College of Dong-A
University; and Physiology Department¹¹, Medical College of Dong-A University*

- Abstract -

Background: The aim of this study is to evaluate the hepatic mechanism of fenofibrate that has the diabetes protective action in rats.

Methods: We chose OLETF rats and divided them into three groups. Fenofibrate (DF) group was fed with diet and fenofibrate (300 mg/kg/day). Paired feeding (Dd) group and free diet (DD) group were fed with diet. After 36 weeks of treatment, all the rats were sacrificed.

Results: The fasting blood glucose level of DF group (8.5 ± 0.9 mmol/L) showed normal. The fasting blood glucose level of Dd group (22.4 ± 3.0 mmol/L) and DD group (16.9 ± 3.7 mmol/L) showed significantly increased than that of DF group ($P < 0.01$, respectively). The body weight, visceral adipose tissue and subcutaneous adipose tissue of DF group were significantly decreased compared to those of Dd and DD groups ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.05$). DF group showed significantly increased state-3 respiration rate, ATP synthetic activity, state-4 respiration rate and their blood β -keton body levels than those of control groups ($P < 0.01$, respectively). DF group showed normal morphology of hepatocytes but DD and Dd groups showed hepatic steatosis with mitochondrial swellings.

Conclusion: Chronic fenofibrate treatment prevents the development of diabetes in OLETF rats with inhibiting gain of body weight and abdominal adiposity. The hepatic mechanism for reducing visceral adiposity is that fenofibrate leads to increasing oxidative phosphorylation, uncoupling and ketogenesis as well as increasing beta-oxidation of fatty acids. Moreover, fenofibrate treatment prevents the development of hepatic steatosis. (J Kor Diabetes Assoc 31:63~74, 2007)

Key Words: Adiposity, Insulin resistance, PPAR alpha, Weight loss

접수일자: 2006년 8월 4일, 통과일자: 2007년 1월 10일, 책임저자: 김덕규, 동아대학교 의과대학 내과학교실

* 이 논문은 2002년 대한당뇨병학회 (MSD) 연구비를 지원 받아 연구되었음.

서 론

인슐린저항성과 인슐린 분비장애는 제2형 당뇨병의 중요한 두 가지 발병기전이다. 인슐린 표적장기인 근육조직과 간에서의 인슐린저항성의 발병에는 이 두 장기로의 유리지방산의 유입의 증가가 관련되어있다¹⁻³⁾. 특히 간에서 long chain fatty acid-coenzyme A, 디아실글리세롤 (diacylglycerol)과 중성 지방의 축적이 간에서의 인슐린저항성을 유도하는 것으로 알려져 있다⁴⁻⁶⁾.

이러한 인슐린 표적 장기로의 지방 유입의 증가가 인슐린저항성을 초래한다는 가설과는 별도로 최근 보고에 의하면 비록 근육 조직에 한정된 가설이기는 하지만 미토콘드리아의 기능장애도 인슐린저항성의 발병과 관련 있는 것으로 알려져 있다. 즉 미토콘드리아의 산화 인산화 (oxidative phosphorylation)의 유전적인 결함이 제2형 당뇨병환자들의 자손들에게 발견된 바 있고⁷⁾ 미토콘드리아의 생물에너지학 (bioenergetics) 장애 역시 제2형 당뇨병환자에게서 발견되고 있다⁸⁾. 미토콘드리아의 uncoupling 단백질 중의 하나인 uncoupling protein (UCP)-3는 에너지 소비를 결정하는 인자인데, 이 단백질이 제2형 당뇨병환자의 근육에서 감소되었다는 보고와 함께^{9,10)}, 이 단백질의 감소가 지방에 의한 미토콘드리아의 장애를 초래한다고 하였다¹¹⁾.

PPAR (peroxisome proliferator activated receptor) 활성체인 페노피브레이트는 체중을 감소시키고 전신 지방증을 감소시키므로 인슐린저항성을 개선시키는 것으로 알려져 있다^{12,13)}. 또한 페노피브레이트는 주로 근육조직에서 지방산 산화를 증가시키므로 OLETF 쥐에서 당뇨병의 발병을 예방하는 것으로 알려져 있다¹⁴⁾. 한편 페노피브레이트는 간에서 UCP-3발현을 유도하므로 미토콘드리아의 생물에너지학에 긍정적인 기여를 하는 것으로 알려져 있으나¹⁵⁾ 실제 당뇨병 발병의 예방함에 있어서 페노피브레이트의 표적 장기인 간에서의 역할에 대해서는 연구가 미미한 실정이다.

그러므로 저자들은 페노피브레이트에 의한 당뇨병의 예방 효과는 근육조직과 췌도 베타 세포에 대한 직접적인 작용과 함께, 간에서의 지방산 산화 증가를 유도하고 그 결과 내장지방증 (visceral adiposity)을 개선시키고 이로 인하여 인슐린의 표적 장기인 간, 근육조직과 인슐린 분비 기관인 췌도 베타세포에서의 지방 부담을 초래하지 않도록 하는 간접적인 작용도 관여한 결과일 것으로 가정하였다. 이 연구의 목적은 당뇨병 예방을 유도하는 페노피브레이트의 주 작용 목표가 되는 간에서의 작용기전을 밝히려는 것이다.

연구 대상 및 방법

1. 실험동물

4주된 제2형 당뇨병 실험동물인 OLETF 쥐 30마리를 오츠카 제약회사 (토꾸시마, 일본)에서 공급받았다. 이 실험동물은 표준 쥐 먹이와 물을 자유롭게 먹도록 하여 10주까지 키웠다. 출생 후 10주된 모든 쥐를 세 군으로 즉 페노피브레이트 처리군 (n = 10, 이하 DF군)과 자유 먹이군 (n = 10, 이하 DD군), 동등 먹이군 (n = 10, 이하 Dd군)으로 나누어 실험을 진행하였다. 각 군의 평균 체중은 세 군 사이에 유의한 차이가 없었다. 세 군 모두 일주일 간격으로 체중을 측정하였다. DF군에게는 미세화된 페노피브레이트가 하루에 체중당 300 mg 섞인 가루 형태의 먹이를 먹였고, 매 이를 마다 먹는 양을 기록하였다. Dd군에게는 DF군이 먹은 양과 동등한 먹이량을 먹였다. 출생 후 46주에 모든 실험동물을 에테르와 케타민 (200 mg/kg, 복강 내 주입)으로 마취한 후 혈액채취를 하였고 이어서 희생시킨 다음 간 조직에서 미토콘드리아를 얻기 위하여 간을 추출하였다. DF군에 속한 두 마리 쥐를 제외한 모든 쥐는 실험이 끝날 때까지는 살아있었다. 실험 대상이 된 모든 쥐는 한국 의료 과학 협회가 정한 동물 실험 지침에 따라 관리되었다.

2. 혈당과 케톤체 측정

출생 후 38주, 42주, 46주에 혈당을 측정하였다. 혈당은 12시간 금식 후 꼬리 정맥을 통해 얻은 혈액을 Accutrend Sensor (Roche Diagnostics, Indianapolis)로 측정하였다. 또한 46주에는 MediSense Optium (Abbott Laboratories, Bedford, MA)을 사용하여 전혈에서 베타 케톤체의 농도를 측정하였다.

3. 혈장지질, 인슐린과 아디포넥틴 측정

유리지방산 (FFA), 총 콜레스테롤, 중성지방, 고밀도지단백 콜레스테롤, 인슐린, 아디포넥틴, 랩틴을 측정하기 위하여 꼬리 정맥에서 채혈 후, 4.5% EDTA로 처리된 시험관에 나누어 넣은 다음 -20℃에서 보관 하였다. 총 콜레스테롤 (Infinity Cholesterol Reagent, Sigma Diagnostics), 중성지방 (Infinity Triglycerides Reagent Sigma Diagnostics), 고밀도지단백 콜레스테롤 (EZ HDL Cholesterol Sigma Diagnostics)은 효소처리법으로 측정하였다. 유리지방산 (NEFA ZYME-S, Aiken Japan)은 ACS-ACOD 효소처리법으로 측정하였고, 인슐린은 rat insulin radioimmunoassay kit (Linco Research Inc, St. Charles, Missouri)을 이용하여 방사면역측정법으로 측정하였다. 아디포넥틴은 human adiponectin ELISA kit (B-Bridge International, Inc.)을 이용하여 enzyme-linked immunosorbent assay 방법으로 측정

하였고, 랩틴은 rat leptin RIA kit (Linco Research Inc, St. Charles, Missouri)을 이용하여 방사면역측정법으로 측정하였다.

4. 인슐린저항성 측정

출생 46주에 채혈한 혈액에서 혈당과 인슐린 농도를 측정한 후 다음의 공식을 이용하여 인슐린저항성의 지표인 HOMA_{IR} (homeostasis model assessment of insulin resistance)을 계산하였다¹⁶⁾.

$$\text{HOMA}_{\text{IR}} = \frac{\text{공복 혈당 (mmol/L)} \times \text{공복 혈장 인슐린 (mU/L)}}{22.5}$$

5. 복부 지방 면적의 측정

출생 후 45주에 총 12마리 쥐 (n = 4, 각 군에서)를 무작위 추출하여 상기와 같은 방법으로 마취하여 자기공명영상 촬영을 시행하였다. 측정 시마다 동일한 자세를 얻기 위해 만든 V형태의 고정 장치를 이용하였고, 뒷다리의 근육이 당기지 않게 고관절을 느슨하게 하였고 와위를 취하도록 했다. 1.5 테슬라 MRI (Magnetom Vision, Siemens, Erlangen, Germany)을 사용하여 복부의 중간 위치에서 관상영상 (coronal view)과 시상영상 (sagittal view)을 촬영하였다. 관상 스카우트영상을 먼저 얻은 다음 시상 스캔이 좌측 신장의 하극 바로 밑에서 시행되었다. 스캔 영상 위에 MRI에 장착된 프로그램 (Vision VB33D)을 이용하여 내장지방과 피하지방의 관심영역 (region of interest)을 그리면 관심영역의 면적은 자동적으로 계산되었다.

6. 광학현미경

간 조직을 제거해서 10% 중성 완충 포르말린으로 고정시킨 다음 파라핀에 포매 시켰다. 절편은 헤마톡실린과 에오신 (H & E)으로 염색하였다.

7. 전자현미경

간 조직을 제거한 후 즉시 2.5% glutaraldehyde와 0.1 M phosphate buffer로 pH 7.4 상태에서 1시간 동안 고정시켰다. 고정된 간 조직들은 1% OsO₄ 와 0.1 M phosphate buffer 로 pH 7.4 상태에서 1시간 동안 다시 고정 후 에탄올로 탈수시킨 다음 Epon 812에 포매 시켰다. 전자현미경 검사를 위하여 Reichert Ultracut E-ultramicrotome (Leica, Inc. Buffalo, N.Y.)을 이용하여 초박절편으로 만든 다음 uranyl acetate와 lead citrate로 다시 염색하여 Hitachi H600-3 transmission 전자현미경 (Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

8. 미토콘드리아의 분리

간조직의 일부분을 8 mL의 H 완충액 (0.22 M

-mannitol, 0.07 M sucrose, 20 mM Hepes, 1 mM EGTA, and 1% bovine serum albumin, pH 7.2)에 넣은 다음 호모게나이저로 5번 부드럽게 분쇄하여 균질화하였다. 균질액을 1,500 g에서 5분간 원심분리 하여, 상층액을 10,000 g에서 10분간 다시 원심분리 하였다. 미토콘드리아 pellet은 약 250 µL의 완충액 H로 재현탁액화시킨 다음 얼음에 보관하였다. 최종 단백질의 농도는 40~60 mg/mL이 되도록 하였다.

1) Oxygraphy

미토콘드리아의 커플링 상태는 Polarography로 구해졌다. 약 600 µg의 간 미토콘드리아 단백질은 0.3 mL의 R 완충액 (0.25 M sucrose, 50 mM HEPES, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 10 mM KH₂PO₄, pH 7.4)으로 재현탁액화시켰다. 산소 소모량은 20 mM의 succinate 또는 30 mM의 glutamate에 30 mM의 malate를 첨가하여 Clark-type의 electrode oxygraph (YSI model 53, Yellow Springs Instrument Co, Inc. USA)로 측정하였다 (2기 호흡, state 2 respiration). 이어서 300 mM의 ADP를 첨가하여 산소 소모량을 측정하였다 (3기 호흡, state 3 respiration). 또한 1 mg/mL의 oligomycin을 첨가하여 미토콘드리아의 ATP synthase를 억제시켜 산소 소모량을 ADP첨가하기 전의 수준까지 감소시켰다 (4기 호흡, state 4 respiration). 3기 호흡과 4기 호흡의 비를 계산하여 호흡조정계수 (respiratory control ratios)를 구하였다.

2) ATP 합성의 측정

간 미토콘드리아 단백질 20 µg을 buffer A로 재현탁액화시킨 후, 800 g로 원심 분리하여 pellet을 만들었다. 이 pellet은 buffer A, 0.15 Mm P₁,P₅-di (adenosine) pentaphosphate, 1 mM malate, 1 mM pyruvate, buffer B, 0.1 mM ADP가 포함된 용액에 다시 균질화시켰다. 이 때, buffer B에는 0.8 mM luciferin (Promega, Madison, WI)과 20 mg/mL luciferase (Roche Biochemicals, Indianapolis, IN)가 포함되어 있었다. 미토콘드리아에서의 ATP 생성이 아닌값을 보정한 baseline luminescence를 읽기 위하여, 위 용액을 포함하는 동일한 튜브에 10 µg/mL oligomycin을 첨가한 것을 동시에 준비하였다. 루미노미터로 측정하고 수치를 기록하였다. 각각 기록에 대한 시간은 15초 간격을 두고 1초간 읽도록 조정하였으며, 총 5분간 기록하였다.

9. 통계분석

SPSS 9.0 version을 이용하였고, 모든 데이터를 평균치 ± 표준편차로 표기하였다. 군 간의 데이터 비교는 Mann-Whitney U test를 사용하며, 모든 통계학적 분석의 결과에서 P < 0.05 인 경우만 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

1. 체중의 변화

모든 실험 쥐 들의 체중은 주수가 늘면서 증가하였는데 특히 DD군의 체중이 DF군보다 유의하게 증가하였으며 Dd 군보다도 증가하였다 (Fig. 1). 46주에서 DF군의 체중 (496

± 8 g)은 DD 군 (642 ± 27 g)과 Dd 군 (671 ± 33 g)의 체중보다 각각 유의한 감소를 보였다. (각각 $P < 0.01$) (Table 2).

2. 공복 혈당의 변화

36주가 될 때까지 각 군의 평균 혈당은 비슷하였으며 고 혈당을 보이지는 않았다 (자료 미 제시). 그러나 그 이후부

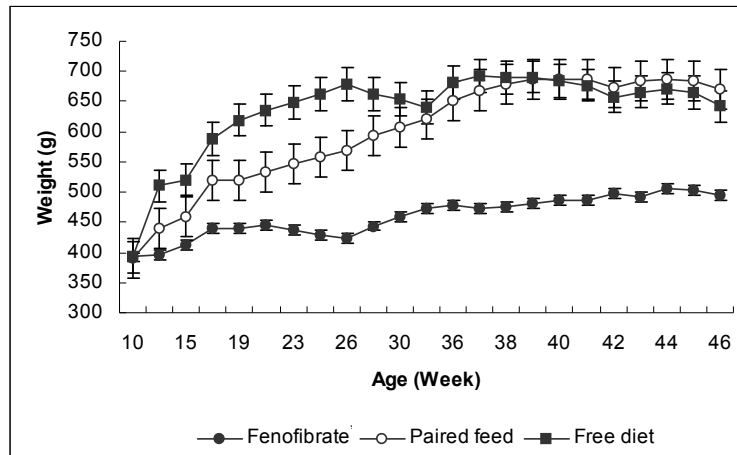


Fig 1. The changes of body weight during the entire experiment. All groups showed the increasing tendency of body weight. The weight gain of fenofibrate group is significantly decreased than that of paired feed group and free diet group. * $P < 0.0001$, versus paired feed group or free diet group, respectively.

Table 1. The Comparison of Blood Glucose, Insulin, β -ketone Body Levels and HOMA IR Index between Fenofibrate, Paired Feeding and Free Diet Groups

	Fenofibrate	Paired feed	Free diet	P value
Fasting Blood Glucose (mmol/L)	8.5 ± 0.9	22.4 ± 3.0	16.9 ± 3.7	$P < 0.01^{*†}$
Plasma insulin (ng/mL)	1.0 ± 0.9	1.6 ± 1.1	2.0 ± 1.0	$P < 0.05^{\dagger}$
HOMA _{IR}	5.5	22.0	22.0	$P < 0.05^{*†}$
Plasma β -ketone body (mol/L)	1.45 ± 0.21	0.63 ± 0.15	0.70 ± 0.14	$P < 0.01^{*†}$

The data represent the mean \pm SEM of 10 rats per group. Mann-Whitney U test.

* fenofibrate vs paired feed.

† fenofibrate vs free diet.

Table 2. The Comparison of Body Weight, Fat Tissue Areas, Adiponectin, Leptin and FFA Levels between Fenofibrate, Paired Feeding and Free Diet Groups

	Fenofibrate	Paired feed	Free diet	P value
Weight (g)	496 ± 8	671 ± 33	642 ± 27	$P < 0.01^{*†}$
VAT area (cm ²)	10.7 ± 0.8	20.6 ± 0.9	21.4 ± 0.7	$P < 0.05^{*†}$
SAT area (cm ²)	4.5 ± 0.4	8.2 ± 0.5	8.9 ± 0.7	$P < 0.05^{*†}$
Plasma leptin (ng/mL)	4.8 ± 3.5	14.3 ± 10.2	8.5 ± 5.9	$P < 0.05^{*}$
Plasma adiponectin (ng/mL)	3.53 ± 0.53	2.49 ± 0.33	2.61 ± 0.38	$P < 0.01^{*†}$
Plasma FFA (uEq/L)	51 ± 34	127 ± 39	198 ± 73	$P < 0.01^{*†}$

The data represent the mean \pm SD of 10 (4) rats per group. Mann-Whitney U test. (4): actual numbers of adipose tissue area measured rats.

* fenofibrate vs paired feed.

† fenofibrate vs free diet.

VAT, visceral adipose tissue; SAT, subcutaneous adipose tissue.

터 DD군과 Dd군의 혈당은 증가하였으나 DF 군의 혈당은 거의 같은 수준을 유지하였다.

46주에 측정된 혈당을 비교하였을 때 DD군의 혈당 (16.9 ± 3.7 mmol/L)과 Dd 군의 혈당 (22.4 ± 3.0 mmol/L)은 증가되어 있었으며 이는 정상 혈당을 보인 DF 군 (8.5 ± 0.9 mmol/L) 보다 유의하게 증가된 것 이었다 (각각 $P < 0.01$) (Table 1).

3. 인슐린과 HOMA_{IR}

DF 군의 혈장 인슐린의 농도 (1.0 ± 0.9 ng/mL)는 DD 군의 인슐린 농도에 비하여 (2.0 ± 1.0 ng/mL) 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$). 그러나 DF 군과 Dd (1.6 ± 1.1 ng/mL) 군 사이에는 유의한 차이가 없었다 (Table 1).

DF군의 HOMA_{IR}는 5.5이었고 이는 DD군의 22.0 과 Dd 군의 22.0보다 유의하게 감소되었다 (각각 $P < 0.05$) (Table 1).

4. 지방산과 케톤체

유리지방산의 농도는 일정치 않았지만 동일한 나이에서 세 군 들 사이에는 일정한 관계를 보여 주었다. DF 군의 FFA (51 ± 34 uEq/L)는 DD군(198 ± 73 uEq/L)과 Dd군 (127 ± 39 uEq/L)에 비하여 유의하게 감소되었다 (각각 $P < 0.01$) (Table 2).

46주에서 DF군의 케톤 농도는 (1.45 ± 0.21 mol/L) DD 군 (0.70 ± 0.14 mol/L)과 Dd군 (0.63 ± 0.15 mol/L)에 비하여 유의하게 증가되었다 (각각 $P < 0.01$) (Table 1).

5. 아디포넥틴과 렙틴

DF군의 혈장 렙틴 농도는 (4.8 ± 3.5 ng/mL) Dd군(14.3

± 10.2 ng/mL)에 비해서는 유의하게 감소하였으나 ($P < 0.05$) DD 군과는 (8.5 ± 5.9 ng/mL) 유의한 차이가 없었다 (Table 2).

DF군의 혈장 아디포넥틴의 농도는 (3.53 ± 0.53 ng/mL) DD군과 (2.61 ± 0.38 ng/mL) Dd군에 비하여 (2.49 ± 0.33 ng/mL) 유의하게 증가하였다 (각각 $P < 0.01$) (Table 2).

6. 자기공명영상에 의한 복부 지방

DF군의 내장지방면적 (VAT) (10.7 ± 0.8 cm²)은 DD군 (21.4 ± 0.7 cm²)과 Dd군 (20.6 ± 0.9 cm²)에 비하여 유의하게 감소되었다 (각각 $P < 0.05$). DF군의 피하지방면적 (SAT) (4.5 ± 0.4 cm²)은 DD군 (8.9 ± 0.7 cm²)과 Dd군 (8.2 ± 0.5 cm²)에 비하여 유의하게 감소되었다 (각각 $P < 0.05$) (Table 2).

7. 간의 광학현미경 소견

DF군의 간은 정상 소견을 보였다. 간세포는 풍부한 호산성의 세포질을 보였다. 그러나 모든 예에서 간염을 시사하는 소견을 보이지는 않았다 (Fig. 2A). Dd군의 간은 중앙정맥 주위에 있는 간세포들이 지방변화를 나타내었다 (Fig. 2B). DD군의 간은 심한 지방 변화를 보여 주었고 이러한 지방변화는 Dd군보다 더 악화되어 있었다 (Fig. 2C).

8. 간세포 미토콘드리아의 전자현미경소견

DD군의 간세포에서, 대부분의 미토콘드리아는 종창 (swelling)되어 있었다. 미토콘드리아 기질의 전자밀도 (electron density)는 감소되어 있었다. Cristae는 여러 방향으로 불규칙하게 배열되어 있었고 그 길이가 짧아져 있었으며 그 숫자도 감소되어 있었다. 세포 내에는 여러 개의 크기

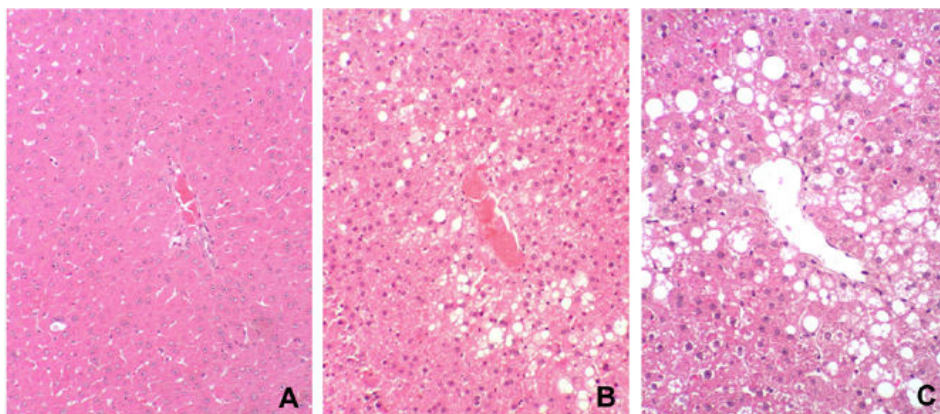


Fig 2. Light microscopic findings of the liver in fenofibrate treated group and control groups. H&E stain, original magnification $\times 200$.

A, The liver of DF group shows normal morphology. The hepatocytes have increased amount of eosinophilic cytoplasm. However, there is no evidence of hepatitis on entire sections of all cases; B, The liver of Dd group shows fatty change of the hepatocytes; C, The liver of DD group shows marked fatty change of the hepatocytes. This fatty change is severer than that of Dd group.

가 큰 지방방울들이 관찰되었으며 어떤 것들은 서로 응집되어 있었다. 지방 방울들과 미토콘드리아가 서로 밀접하게 붙어 있는 것이 특기할 만한 소견으로 보인다 (Fig. 3A).

이와는 달리 DF군의 간세포에서는 대부분의 미토콘드리아가 정상으로 보였고 아주 일부에서 작은 지방 방울이 세포질 안에 흩어져 있는 것이 관찰되었다 (Fig. 3B).

9. 산소 소비율과 ATP 생성

DF군의 3기 호흡률 (state-3 respiration rate)은 1416.5 ± 17.5 uL/hr이었고 이는 DD군의 225.0 ± 23.0 uL/hr와 Dd군의 239.5 ± 234.5 uL/hr에 비하여 유의하게 증가되어 있었다 (각각 $P < 0.01$) (Table 3).

DF군의 4기 호흡률 (state - 4 respiration rate) (391.5 ± 11.0 uL/hr)은 DD군 (186.5 ± 11.5 uL/hr)과 Dd군 (211.0 ± 4.5 uL/hr)에 비하여 유의하게 증가되었다 (각각 $P < 0.01$) (Table 3).

DF군의 호흡조절계수 (respiratory control ratio)는 3.6으로 이는 DD군의 1.2와 Dd군의 1.1에 비하여 유의하게 증가되었다 (각각 $P < 0.01$) (Table 3).

고 찰

이 연구는 장기간 페노피브레이트 투여가 OLETF쥐에서 제2형 당뇨병의 발병을 예방하는 것을 보여주었다. 이러한 페노피브레이트에 의한 제2형의 당뇨병의 예방은 체중 과 복부 지방 (내장지방 과 피하지방)의 증가를 억제한 것과 관련되어 있었다. 이러한 연구 결과들은 다른 연구자들의 결과와 일치하는 것이었다¹⁴⁾. 이러한 페노피브레이트의 체중 과 복부 지방증의 억제 작용은 같은 먹이량을 먹인 동등 먹이 (paired-feeding)군에서는 나타나지 않는 것으로 보아 섭취하는 먹이량과 연관이 없는 것으로 보인다. 또한 이러한 효과는 혈장 렙틴 농도와도 연관이 없는 것으로 보이는데, 그 이유는 페노피브레이트 투여군에서 혈장 렙틴의 농도가 대조군에 비하여 오히려 감소되어 있기 때문이다. 연구자들은 다른 논문에서 페노피브레이트의 항 비만 작용이 페노피브레이트가 간에서 지방산 산화를 증가시킨 것과 연관이 있다고 주장한 바 있으며 페노피브레이트의 이러한 작용은 페노피브레이트가 직접 carnitine palmitoyltransferase (CPT)-I의 작용을 활성화시킴으로 이루어 진 것임을 밝힌 바 있다¹³⁾.

Table 3. The Comparison of ATP Synthetic Activity, State-3,4 Respiration Rates and Respiratory Control Ratios between Fenofibrate Treated, Paired Feeding and Free Diet Groups

	Fenofibrate	Paired feed	Free diet	P value
ATP synthetic activity (nmol/min/mg)	86.3 ± 8.6	25.1 ± 19.9	27.9 ± 24.8	$P < 0.01^{*†}$
state-3 respiration rate (uL/hr)	1416.5 ± 17.5	239.5 ± 234.5	225.0 ± 23.0	$P < 0.01^{*†}$
state-4 respiration rate (uL/hr)	391.5 ± 11.0	211.0 ± 4.5	186.5 ± 11.5	$P < 0.01^{*†}$
respiratory control ratio	3.6	1.1	1.2	$P < 0.01^{*†}$

The data represent the mean \pm SEM of 5 rats per group. Mann-Whitney U test.

* fenofibrate vs paired feed.

† fenofibrate vs free diet.

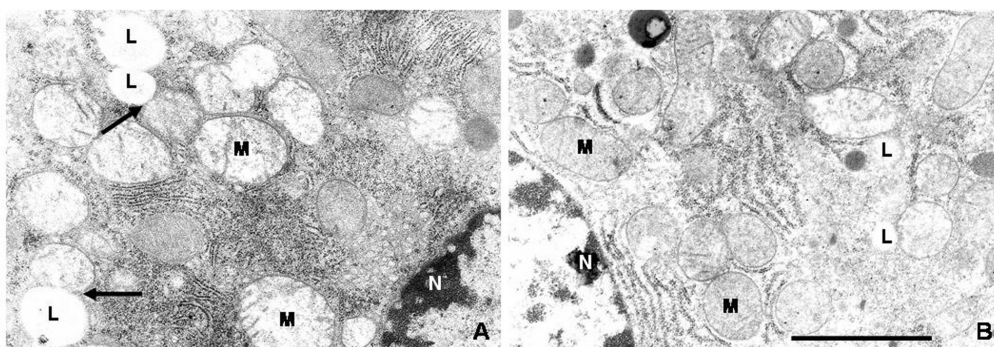


Fig 3. Electron microscopical findings of the hepatocyte in DD and DF groups.

A, DD group. Most mitochondria (M) are swollen. Their cristae show varying degrees of disorientation, shortening and reduction in numbers. Lipid droplets (L) are large, and sometimes aggregated (two lipid droplets in the upper left corner). A close contact between the lipid droplet and mitochondria is demonstrated (arrows); B, Fenofibrate group. Most mitochondria appeared normal and only few small lipid droplets were scattered in the cytoplasm. (Bar, 2 μ M. N: nucleus).

최근에 페노피브레이트에 의한 지방산 산화 작용의 증가의 기전으로서 CPT-I에 대한 직접적인 작용기전 외에 간접적인 다른 기전도 존재함이 밝혀졌다. Acetyl CoA carboxylase (ACC)는 acetyl CoA를 malonyl CoA로 전환시키는데 이 malonyl CoA는 CPT-I를 억제한다. 한편 아디포넥틴은 AMPK를 활성화 시키고 ACC를 억제하는데 이러한 ACC의 억제는 결국 근육조직에서 지방산의 산화를 증가시키는 결과를 가져 온다¹⁷⁾. 페노피브레이트가 바로 이 ACC를 억제하므로 지방산의 산화를 증가시키는 것으로 알려져 있다¹⁸⁾.

연구자들은 이 연구에서 페노피브레이트가 혈장 아디포넥틴의 농도를 증가시키는 것을 발견하였기에 연구자들은 페노피브레이트가 직접 CPT-I를 활성화 시킬 뿐 아니라 간접적으로는 혈장 아디포넥틴의 증가를 유도하고 그 결과로 ACC를 억제시키므로 지방산의 산화를 더욱 더 가속화시켰을 것으로 추정하였다.

페노피브레이트가 어떻게 혈장 아디포넥틴의 농도를 증가시키는지는 아직 알려져 있지 않다. 혈장 아디포넥틴의 농도는 내장 지방증에 반비례하며¹⁹⁾, 체중 감소를 유도하면 아디포넥틴의 농도가 증가한다²⁰⁾ 연구 결과들은 본 연구의 결과인 페노피브레이트 투여에 관련된 혈장 아디포넥틴의 증가가 페노피브레이트에 의한 내장지방증과 체중 감소에 따른 속발 현상임을 시사하나 이러한 추정과는 달리 아디포넥틴의 증가가 페노피브레이트의 직접적인 효과일 수도 있으므로 향후 이를 밝히는 실험이 필요하다.

지방산의 베타 산화를 지속적으로 유도하기 위해서는 지방산 산화의 최종 대사산물인 acetyl CoA의 적절한 소모가 아주 중요하다. acetyl CoA는 산화 인산화(커플링), uncoupling, 케톤 형성과 지방합성을 위하여 사용된다²¹⁾.

이 연구 결과에 의하면 페노피브레이트 투여는 ATP synthetic activity와 함께 산화 인산화의 활성도를 나타내는 3기 호흡률을 증가시켰다. 이러한 결과는 페노피브레이트 투여가 ATP synthase F0 complex와 ATP synthase F1 complex를 상향 조절하는 다른 연구 결과와 부합하는 것이다²¹⁾.

페노피브레이트 투여는 uncoupling activity를 의미하는 4기 호흡률도 증가시켰다. UCP-1을 제외한 UCP-2,3의 생리적인 기능은 아직 잘 밝혀져 있지 않다. UCP-3는 PPAR α 활성체의 목표 유전자로 추정되고 있고^{22,23)}, Wistar 쥐의 간 조직에서 발현된다고 알려져 있다¹⁵⁾. 연구자들의 선행 연구에 의하면 (심사 중), 페노피브레이트로 투여한 쥐들은 식도와 직장에서 측정된 심부 체온과 간에서 UCP-3 발현이 대조군의 그것들에 비하여 유의하게 증가되어 있었다. 이러한 결과는 페노피브레이트에 의하여 간에서 새로 발현된 UCP-3가 uncoupler 기능을 가지고 있음을 시사하는 것이다. 그러나 이 연구에서는 앞서 언급한 바와 같이 페노피브

레이트 투여가 산화 인산화를 증가시켰을 뿐 아니라 uncoupling도 함께 증가시키는 것으로 나타났다.

이 연구에서 연구자들은 페노피브레이트 투여가 혈장 케톤체의 농도를 증가시키는 것을 발견하였다. 다른 연구에서도 페노피브레이트는 케톤체는 물론이고 acetoacetate의 혈장 농도를 증가시키는 것으로 보고된 바 있으나 β -hydroxybutyrate의 농도는 증가시키지 못하는 것으로 보고되었다^{26,27)}. 페노피브레이트 투여에 의한 케톤 생성의 증가는 미토콘드리아의 효소인 3-hydroxy, 3-methylglutaryl CoA synthase (HMG CoA synthase)의 상향조절과 연관이 있는 것으로 알려져 있으며 이 효소는 acetyl CoA와 acetoacetyl CoA를 축합하는 촉매작용을 하여 HMG CoA를 생성시키는 작용을 하는데²⁸⁾ 이 HMG CoA는 결국 케톤체로 전환된다. 페노피브레이트 투여에 의하여 유도된 혈장 케톤체의 증가는 식욕저하를 초래하는 것으로 알려져 있으며²⁹⁾ 연구자들은 다른 연구보고에서 페노피브레이트 투여가 먹이량을 감소시키는 것을 보고한 바가 있다¹³⁾. 그러나 이 연구에서는 페노피브레이트 투여군이 동등먹이군보다 혈장케톤이 증가하였기에 페노피브레이트군에서의 혈장 케톤 증가의 의미는 페노피브레이트가 식욕저하를 유도하였기 보다는 혈액내 케톤체의 전구물질인 acetyl CoA의 소모를 증가시켰다고 생각된다.

앞에서 언급한 것을 정리하면 장기간 동안의 페노피브레이트 투여는 지방산 산화의 다음 과정들인 산화 인산화, uncoupling과 케톤의 생성 과정을 촉진시킨다. 이렇게 다방면에서 잘 조직된 지방산 산화 후속 과정의 촉진은 효율적인 지방산 산화를 유도하게 되는데 이러한 효율적인 지방산 산화가 지속적으로 진행되면서 내장 지방의 축적이 예방된 것으로 생각된다.

이 연구는 장기간의 페노피브레이트 투여는 지방산에 의하여 유도될 수 있는 간 손상으로부터 간을 보호하는 것을 보여주었다. 인간에서 발생할 수 있는 간 손상의 특징적인 소견에는 미토콘드리아 손상, 중심부괴사, 지방변화가 있다³⁰⁾. 이 연구에서 당뇨가 유발된 군 (Dd, DD군)의 미토콘드리아는 비정상적인 종창을 보였던 것에 비하여 페노피브레이트에 의하여 당뇨병이 예방된 군 (DF군)의 미토콘드리아는 정상이었다. 미토콘드리아의 비정상적인 종창 소견은 알록산으로 유도된 당뇨병 쥐의 간에서 발견된 바 있다³¹⁾. 이러한 미토콘드리아의 종창은 당뇨병과 연관된 특이한 소견은 아닌 것으로 생각되는데 이는 손상의 원인이 무엇이든 손상 받은 간에서는 다 나타날 수 있는 소견이기 때문이다. 비정상적인 미토콘드리아의 종창은 세포의 삼투압조절기능 실조와 연관된 것으로 보인다. 상해를 받은 미토콘드리아는 ATP 생산이 억제되는데 이로 인하여 세포표면에 위치하는 ATP-의존성 나트륨 펌프의 실조를 유도하게 되어 그 결과 세포의 미토콘드리아는 물로 채워지는 것으로 설명된다³²⁾.

그러므로 본 실험에서 페노피브레이트의 투여가 미토콘드리아의 손상을 의미하는 미토콘드리아의 종창을 예방하는데 이러한 예방의 기전으로는 연구자들은 페노피브레이트가 간세포에서 산화 인산화의 증가를 유도하여 ATP 생성을 증가시키는 작용이 관여하였을 것으로 생각한다.

앞에서 언급한 바와 같이 간지방증은 병리조직학적 관점에서 보면 간 손상의 특징적인 소견이기도 하지만 간지방증은 대사증후군의 구성 질환으로 주장되기도 하는데 이는 간지방증 형성 과정에 분명한 인슐린저항성의 관여가 밝혀진 바 있기 때문이다³³⁾. 대사증후군에서 간지방증의 발병기전으로서 에너지섭취 과잉 상태와 인슐린저항성으로 유도된 고인슐린혈증, 당뇨병으로 인한 고혈당이 발병에 관여하는 인자로 알려져 있다. 즉 에너지 과잉 상태에서 포도당으로

부터 지방산으로의 전환의 증가와, 고인슐린혈증에 의한 SREBP-1의 상향조절을 통한 지방합성의 증가와, 고혈당에 의한 ChREBP의 상향조절이 간사슬지방산의 합성과 축적을 초래하여 결국에는 간에서 중성지방이 축적된다고 설명된 바가 있다³⁴⁾. 또한 간지방증이 말초 인슐린저항성과 독립적으로 간에서 인슐린저항성을 유발한다는 간접적인 증거들이 있다³⁵⁻³⁷⁾. 이러한 것들로 미루어 볼 때 이 연구에서 관찰된 페노피브레이트 투여에 의한 간지방증의 예방은 페노피브레이트가 인슐린저항성을 개선시키는 효과와 있음을 시사한다. 연구자들은 페노피브레이트에 의한 간지방증의 예방의 기전으로서 페노피브레이트 투여가 내장지방증을 억제하고 그 결과 내장지방증으로 유도될 수 있는 인슐린저항성의 발병을 예방할 뿐 아니라 인슐린저항성과 동반하는 고인

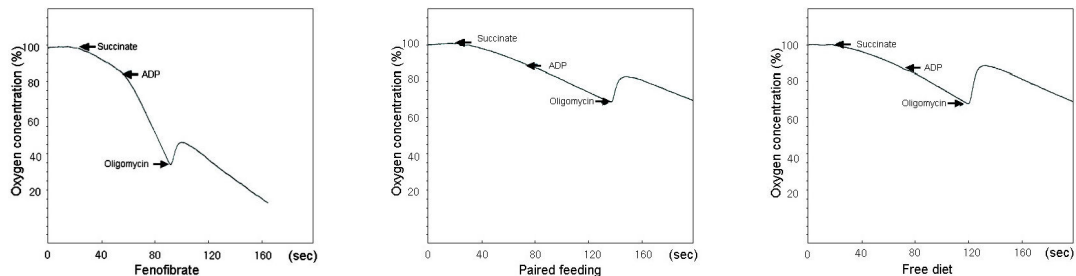


Fig. 4. Oxygram of isolated mitochondria from the liver in each group of OLETF rats. In fenofibrate group, the oxygen consumption was sharply increased after addition of ADP (state-3 respiration) but this change was not observed in paired feeding and free diet groups. This meant that both group had marked deteriorations of ADP phosphorylation in their mitochondria. The state-3 respiration was terminated when oligomycin, the inhibitor of oxidative phosphorylation, was added. After that uncoupling process (the state-4 respiration) was induced. The state-4 respiration also decreased in both groups than in fenofibrate treated group.

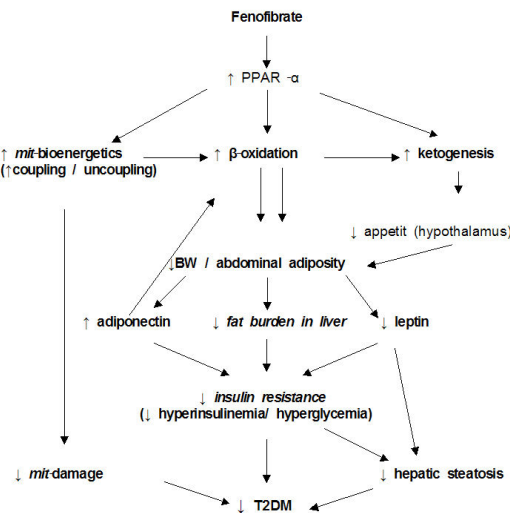


Fig 5. The summary of possible hepatic mechanisms for prevention of diabetes by fenofibrate in OLETF rat. Fenofibrate reduces fat burden on liver via increasing β -oxidation of fatty acid and promoting catabolism of its metabolites at multiple subsidiary sites, where oxidative phosphorylation, uncoupling and ketogenesis are increased. Fenofibrate also prevents hepatocyte injury, such as mitochondrial damage (ballooning) and steatosis. The changes of adipocytokines (adiponectin and leptin) induced by fenofibrate also do beneficial actions on fat burden and injury of the liver. (The findings in this study were presented as bold character) *mit*, mitochondria, BW, body weight

슐린혈증과 고혈당의 발병을 사전에 차단할 수 있게 되었기 때문일 것으로 추정된다.

한편 아디포사이토카인이 직접 혹은 간접적으로 인슐린 저항성을 유도하여 간지방증 형성에 관여하는 것으로 알려져 있다. 즉 혈장 내 아디포넥틴의 감소와 렙틴의 증가는 인슐린저항성과 연관되어 있고^{38,39)} 혈장 렙틴의 농도가 간지방증의 정도와 직접 연관된다는 보고가 있는 반면에 그렇지 않다는 보고도 있다^{40,41)}. 페노피브레이트는 내장지방증의 발생을 억제하고 체중 증가를 억제함으로써 혈장 아디포넥틴의 농도는 증가시키고 렙틴의 농도를 감소시켰는데 이러한 아디포사이토카인의 분비 조절도 간지방증을 예방하는데 기여하였을 것으로 추정한다.

이 실험에서 사용한 페노피브레이트의 하루 용량은 300 mg/kg인데 이 양은 일반적으로 실험에 사용하는 용량의 세 배 내지 네 배 되는 용량이다^{14,25)}. 연구자들은 이렇게 고용량을 택한 이유는 페노피브레이트 투여의 극대화된 효능을 얻기 위함이었다. 실험 대상 쥐를 희생시킨 다음 실험대에서 간을 관찰하였는데 실험군의 모든 쥐들의 간은 비대하였지만 대조군이 간은 그렇지 않았다. 그러나 실험쥐의 혈청 간 효소치는 모두 정상 범위 안에 있었다. 본 연구보다도 더 고용량을 투여한 (400 mg/kg/day) 실험의 결과에서도 페노피브레이트가 간 효소치는 증가시키지 않는 것으로 보고되었다²¹⁾.

비록 피브린산 유도제 중의 하나인 Gemfibrozil이 설치류에서는 간암을 유발시키는 것으로 알려져 있는 것에⁴²⁾ 반하여 인간에게서 간세포암을 유발하지 않는 것으로 알려져 있다⁴³⁾. 그러나 실제 고용량의 페노피브레이트가 당뇨병을 예방할 수 있는가를 밝히려는 임상 실험은 현실적으로 할 수 없을 것 같다. 이 연구를 통하여 연구자들은 지방산 산화를 충분히 유도할 수만 있다면 그것이 본 연구에서와 같이 PPAR α 를 활성화시키는 다른 보고에서와 같이 ACC-2를 억제하는 간에²⁵⁾ 비만과 연관된 제2형 당뇨병을 예방할 수 있을 것이라는 교훈을 얻었다.

결론적으로 장기간의 페노피브레이트 투여는 OLETF 쥐에서 체중의 증가와 복부 지방증의 증가를 억제시키므로 당뇨병의 발병을 예방하였다. 이는 페노피브레이트가 간에서 지방산 산화를 증가시킬 뿐 아니라 지방산 산화의 다음 과정인 산화 인산화, uncoupling과 케톤 형성을 증가시켜서 지방산의 효과적인 소모를 지속적으로 유도하였기 때문으로 생각한다. 또한 페노피브레이트는 간지방증의 발병도 예방하였다 (Fig. 5).

요 약

연구 배경: 페노피브레이트는 근육조직과 체도 베타 세포에 직접 작용을 하여 당뇨병을 예방한다. 연구자들은 이러

한 페노피브레이트의 직접적인 작용 외에도 간에서의 지방산 산화 증가를 유도하고 그 결과 내장지방증을 감소시키는 작용도 당뇨병을 예방하는데 관여하였을 것으로 가정하였다. 이 연구의 목적은 당뇨병 예방을 유도하는 효능을 가진 페노피브레이트의 주 작용 장기 (organ)가 되는 간에서의 작용기전을 밝히려고 제2형 당뇨병 실험 모델인 OLETF쥐를 대상으로 연구를 하였다.

방법: 10주된 OLETF쥐를 세 군으로 나누었다. 페노피브레이트 투여군 (DF, n = 10)은 하루에 체중 당 300 mg의 페노피브레이트를 먹이에 섞어 먹였고, 동등 먹이군 (Dd, n = 10)은 페노피브레이트 투여군이 먹은 먹이량과 같은 먹이량을 먹도록 유도하였으며 자유 먹이군 (DD, n = 10)은 자유롭게 먹이를 먹도록 하였다. 36주 동안 체중, 먹이량, 혈당을 관찰한 다음 혈액 검사 (인슐린, 케톤체, 렙틴, 아디포넥틴)와 간 조직 검사를 위하여 모든 쥐를 희생시켰다.

결과: 페노피브레이트 투여군은 대조군인 동등 먹이군과 자유 먹이군에 비하여 유의한 체중감소와 복부 지방의 감소를 보였으며 정상 혈당을 유지하였다 ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$). 페노피브레이트 투여군에서 산화 인산화 (state-3 respiration rate), ATP 합성 활동도, uncoupling activity (state-4 respiration rate)와 혈액 내 케톤체의 농도가 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다 (각각 $P < 0.01$). 페노피브레이트 투여군은 정상 간 세포 조직 소견을 보였으나 대조군은 간지방증의 조직소견과 함께 간세포의 미토콘드리아 손상 소견을 보였다.

결론: 페노피브레이트 투여는 OLETF 쥐에서 제2형 당뇨병의 발병을 예방하였는데 이는 체중 증가를 억제하고 복부 지방을 감소시키는 효능과 연관이 있었다. 이러한 효능을 초래한 페노피브레이트의 간에서의 기전은 페노피브레이트가 간에서 지방산 산화가 증가시킬 뿐 아니라 지방산 산화 다음 대사 단계인 산화 인산화, uncoupling과 케톤 형성 과정을 활성화 시켜서 지방산 산화 대사산물을 지속적으로 소모시킨 결과라고 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2002년 대한당뇨병학회 (MSD) 연구비를 지원 받아 연구되었음.

참 고 문 헌

1. Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI: *Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. J Clin Invest* 97:2859-65, 1996
2. Kelley DE, Goodpaster B, Wing RR, Simoneau JA:

- Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. Am J Physiol* 277:E1130-41, 1999
3. Boden G, Chen X, Ruiz J, White JV, Rossetti L: *Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. J Clin Invest* 93:2438-46, 1994
 4. Mirja Tiikkainen, Marjo Tamminen, Anna-Maija Hkkinen, Robert Bergholm, Satu Vehkavaara, Juha Halavaara, Kari Teramo, Aila Rissanen, Hannele Yki-Jrvinen: *Liver-Fat Accumulation and Insulin Resistance in Obese Women with Previous Gestational Diabetes Obesity Research* 10:859-67, 2002
 5. Chen MT, Kaufman LN, Spennetta T, Shrago E: *High fat-feeding to rats on the interrelationship of body weight, plasma insulin, and fatty acyl-coenzyme A esters in liver and skeletal muscle. Metabolism* 41: 564-9, 1992
 6. Lam TK, Yoshii H, Haber CA, Bogdanovic E, Lam L, Fantus IG, Giacca A: *Free fatty acid-induced hepatic insulin resistance: a potential role for protein kinase C-delta. Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E682-91, 2002
 7. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI: *Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. N Engl J Med* 350:664-71, 2004
 8. Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB: *Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. Diabetes* 51:2944-50, 2002
 9. Schrauwen P, Hesselink MK, Blaak EE, Borghouts LB, Schaart G, Saris WH, Keizer HA: *Uncoupling protein 3 content is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. Diabetes* 50:2870-3, 2001
 10. Schrauwen P, Xia J, Bogardus C, Pratley RE, Ravussin E: *Skeletal muscle uncoupling protein 3 expression is a determinant of energy expenditure in Pima Indians. Diabetes* 48:146-9, 1999
 11. Schrauwen P, Hesselink MK: *Oxidative capacity, lipotoxicity, and mitochondrial damage in type 2 diabetes. Diabetes* 53:1412-7, 2004
 12. Guerre-Millo M, Gervois P, Raspe E, Madsen L, Poulain P, Derudas B, Herbert JM, Winegar DA, Willson TM, Fruchart JC, Berge RK, Staels B: *Peroxisome Proliferator-activated Receptor Activators Improve Insulin Sensitivity and Reduce Adiposity. J Biol Chem* 275:16638-42, 2002
 13. Lee HJ, Choi SS, Park MK, An YJ, Seo SY, Kim MC, Hong SH, Hwang TH, Kang DY, Garber AJ, Kim DK: *Fenofibrate lowers abdominal and skeletal adiposity and improves insulin sensitivity in OLETF rats. Biochem Biophys Res Commun* 296:293-9, 2002
 14. Koh EH, Kim MS, Park JY, Kim HS, Youn JY, Park HS, Youn JH, Lee KU: *Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha activation prevents diabetes in OLETF rats: comparison with PPAR-gamma activation. Diabetes*, 2003
 15. Lanni A, Mancin IF, Sabatino L: *De novo expression of uncoupling protein 3 is associated to enhanced mitochondrial thioesterase expression and fatty acid metabolism in liver of fenofibrate-treated rats. FEBS Letters* 525:7-12, 2002
 16. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC: *Homeostasis model assessment: insulin resistance and cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia* 28:412-9, 1985
 17. Tomas E, Tsao TS, Saha AK, Murrey HE, Zhang Cc C, Itani SI, Lodish HF, Ruderman NB: *Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16309-13, 2002
 18. Guo Q, Wang PR, Milot DP, Ippolito MC, Hernandez M, Burton CA, Wright SD, Chao Y: *Regulation of lipid metabolism and gene expression by fenofibrate in hamsters. Biochim Biophys Acta* 1533:220-32, 2001
 19. Bacha F, Saad R, Gungor N, Arslanian SA: *Adiponectin in youth: relationship to visceral adiposity, insulin sensitivity, and beta-cell function. Diabetes Care* 27:547-52, 2004
 20. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y: *Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1595-9, 2000
 21. Cornwell PD, De Souza AT, Ulrich RG: *Profiling of hepatic gene expression in rats treated with fibric*

- acid analogs Mutat Res 549:131-45, 2004*
22. Acin A, Rodriguez M, Rique H, Canet E, Boutin JA, Galizzi JP: *Cloning and characterization of the 5' flanking region of the human uncoupling protein 3 (UCP3) gene. Biochem Biophys Res Commun 258:278-83, 1999*
23. Brun S, Carmona MC, Mampel T, Vinas O, Giralt M, Iglesias R, Villarroya F: *Activators of peroxisome proliferator-activated receptor- α induce the expression of the uncoupling protein-3 gene in skeletal muscle: a potential mechanism for the lipid intake-dependent activation of uncoupling protein-3 gene expression at birth. Diabetes: 48:1217-22, 1999*
24. Yamamoto K, Fukuda N, Zhang L, Sakai T: *Altered hepatic metabolism of fatty acids in rats fed a hypolipidaemic drug, fenofibrate. Pharmacological research 33:337-42, 1996*
25. Larsen PJ, Jensen PB, Sorensen RV, Larsen LK, Vrang N, Wulff EM, Wassermann K: *Differential Influences of Peroxisome Proliferator Activated Receptors gamma and alpha on food Intake and energy homeostasis. Diabetes 52:2249-59, 2003*
26. Kyosuke Y, Nobuhiro F, Zhang L, Takahiro S: *Altered hepatic metabolism of fatty acids in rats fed a hypolipidaemic drug, fenofibrate. Pharmacological research 33:337-42, 1996;*
27. Larsen P, Jensen P, Sorensen R, Larsen L, Vrang N, Wulff E, Wassermann K: *Differential Influences of Peroxisome Proliferator Activated Receptors γ and α on food Intake and energy homeostasis. Diabetes 52: 2249-59, 2003*
28. Meertens L, Miyata K, Cechetto J, Rachubinski R, Capone J A: *mitochondrial ketogenic enzyme regulates its gene expression by association with the nuclear hormone receptor PPAR α . The EMBO Journal 17:6972-8, 1998*
29. Arase K, Fisler JS, Shargill NS, York DA, Bray GA: *Intracerebroventricular infusions of 3-OHB and insulin in a rat model of dietary obesity. Am J Physiol 255:R974-81, 1988*
30. Sherlock S: *Patterns of hepatocyte injury in man. Lancet 1:782-6, 1982*
31. Hall JC, Sordahl LA, Steffen PL: *The effect of insulin on oxidative phosphorylation in normal and diabetic mitochondria. J Biol Chem 235:1536-9, 1960*
32. Ghadially FN: *Ultrastructural pathology of the cell and matrix. P 240-9 London, Butterworths, 1988*
33. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N: *Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. Diabetes 50:1844-50, 2001*
34. Browning JD, Horton JD: *Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. J Clin Invest 114:147-52, 2004*
35. Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Hakkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijarvi A, Halavaara J, Yki-Jarvinen H: *Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. J Clin Endocrinol Metab 87:3023-8, 2002*
36. Ryysy L, Hakkinen AM, Goto T, Vehkavaara S, Westerbacka J, Halavaara J, Yki-Jarvinen H: *Hepatic fat content and insulin action on free fatty acids and glucose metabolism rather than insulin absorption are associated with insulin requirements during insulin therapy in type 2 diabetic patients. Diabetes 49:749-58, 2002*
37. Bhargava R, Senior PA, Ackerman TE, Ryan EA, Paty BW, Lakey JR, Shapiro AM: *Prevalence of hepatic steatosis after islet transplantation and its relation to graft function. Diabetes 53:1311-7, 2004*
38. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA: *Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. J Clin Endocrinol Metab 86:1930-5, 2001*
39. Silha JV, Krsek M, Skrha JV, Sucharda P, Nyomba BL, Murphy LJ: *Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance. Eur J Endocrinol 149:331-5, 2003*
40. Chitturi S, Farrell G, Frost L, Kriketos A, Lin R, Fung C, Liddle C, Samarasinghe D, George J: *Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity? Hepatol 36:403-9, 2002*
41. Chalasani N, Crabb DW, Cummings OW, Kwo PY, Asghar A, Pandya PK, Considine RV: *Does leptin play a role in the pathogenesis of human*

- nonalcoholic steatohepatitis? Am J Gastroenterol* 98:2771-6, 2003
42. Hays T, Rusyn I, Burns A, Kennett M, Ward J, Gonzalez F, Peters J: *Role of peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α) in bezafibrate-induced hepatocarcinogenesis and cholestasis. Carcinogenesis* 26:219-27, 2005
43. Chevalier S, Roberts R: *Perturbation of rodent hepatocyte growth control by nongenotoxic hepatocarcinogens: mechanisms and lack of relevance for human health. Oncol Rep* 5:1319-27, 1988