

고지방식으로 유도한 비만 쥐에서 레스베라트롤이 자가포식에 미치는 영향*

이희재 · 양수진[§]

전남대학교 식품영양학과/생활과학연구소

Effects of resveratrol on hepatic autophagy in high fat diet-induced obese mice*

Lee, Hee Jae · Yang, Soo Jin[§]

Department of Food and Nutrition and Human Ecology Research Institute, Chonnam National University,
Gwangju 500-757, Korea

ABSTRACT

Resveratrol (RSV) exerts several beneficial effects on metabolism and metaflammation-related diseases, including diabetes and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). The purpose of this study is to investigate whether RSV affects pathophysiology of diabetes and NAFLD as well as hepatic autophagy in a rodent model of diet induced obesity (DIO). DIO was induced in a subset of C57BL/6J mice fed a high fat (HF, 45% kcal fat) diet. After six weeks of HF diet treatment, RSV (8 mg/kg/day) was administered via an osmotic pump for a period of four weeks. Therefore, the experimental groups were as follows: 1) lean control (CON), 2) HF diet-induced obese control (HF), and 3) HF_RSV. Body weight and food intake were monitored daily. Fasting glucose, insulin, and adiponectin in serum and lipid profiles in serum and liver were analyzed. In addition, the autophagic process was investigated using transmission electron microscopy (TEM). Body weight and food intake were not affected by RSV treatment. Impaired glucose control accompanied by DIO was recovered with RSV as shown by lower levels of fasting serum glucose and insulin when compared with HF obese controls. In addition, RSV treatment resulted in increased levels of serum adiponectin, however, indices of lipid profile in serum and livers were reduced. Results of TEM analysis showed that a HF diet induced excessive autophagy with the presence of double-membrane autophagosomes, which was ameliorated by RSV. The regulatory effect of RSV on autophagy was confirmed by the altered LC3-II formation, which increased with a HF diet and was decreased by RSV treatment. These results suggest that RSV treatment improves glucose control and lipid profile and these beneficial effects may be mediated by an altered autophagic process. (J Nutr Health 2013; 46(4): 307 ~ 314)

KEY WORDS: autophagy, obesity, resveratrol, sirtuin.

서 론

비알코올성 지방간 질환은 초기에는 회복 가능한 지방간의 형태로 시작되나, 초기에 제대로 치료되지 않으면 회복 및 치료가 어려운 비알코올성 지방간염 (non-alcoholic steatohepatitis)으로 진전되고 간염, 간경화, 간암 등으로 진행된다.¹⁾ 당뇨병에 종종 수반되는 비알코올성 지방간 질환 및 지방간염의 경우 전신 염증 (systemic inflammation) 뿐만 아니라 간에서의 염증 반응이 과도하게 일어나고 이를 간에서의 대사성 염증

반응 (hepatic metaflammation)이라고 한다. 영양 요법, 운동 요법, 약물 요법 등을 통하여 이러한 hepatic metaflammation을 치료하는 것이 비알코올성 지방간 질환 및 당뇨병 치료에 기여할 것으로 제안된다. 기존의 연구 결과에 의하면, 장기적인 건강 유지를 위한 비알코올성 지방간 질환의 가장 효과적인 치료법은 영양 요법과 운동 요법을 통하여 적정 체중을 관리하는 것으로 제안되고 있다.²⁾ 비알코올성 지방간 질환 치료를 위한 영양 요법으로서 후보 식품 및 기능성 성분 등에 의한 연구들이 보고되어 있으나, 아직까지 그 세부 기전에 대한 연구는 제대로 이루어져 있지 않다.

Received: Jul 9, 2013 / Revised: Jul 31, 2013 / Accepted: Aug 19, 2013

*This research was supported by grants from Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (2012R1A1A1A004861) and Chonnam National University (2012) in Korea.

[§]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: sjyang89@chonnam.ac.kr

© 2013 The Korean Nutrition Society

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

자가포식은 세포 내 노폐물과 수명이 다하거나 변성 및 기능이 저하된 단백질과 세포 소기관들이 세포 스스로에 의해 분해 및 제거됨으로써 항상성을 조절하는 과정이다.³⁾ 자가포식은 노화, 미토콘드리아의 기능, 암의 진행, 인슐린 항상성, 염증 반응 등을 조절하는 것으로 알려져 있고, 비정상적인 자가포식은 노화와 비만, 인슐린 저항성, 당뇨병 등의 대사 관련 질환의 발병과 관계가 있다.⁴⁻⁷⁾ 지질 대사에 대해서는 자가포식이 지방 세포의 분화를 조절할 뿐만 아니라⁸⁾ 간에서의 지질 대사를 조절하여 비만과 지방간 발병에 관여한다는 연구 결과가 발표되어 주목을 받았고,⁹⁾ 이같은 선행 연구들을 바탕으로 세포내 지방구 (lipid droplet)의 자가포식을 명명하는 'lipophagy'의 개념이 소개되었다.¹⁰⁾ 특히, 간에서의 자가 포식은 간 조직 내 지방의 분해 (lipolysis)를 촉진시켜 간 내 지방 축적을 감소시키는 역할을 하고, 자가포식 조절 인자인 autophagy-related gene 5 (Atg5)의 유전적 발현 억제와 Atg7의 간세포 특이적인 유전적 결여에 의한 자가포식의 기능 부전은 지방간을 유도하게 됨을 보였다.⁹⁾ 반면, Wistar rat을 대상으로 고지방식이에 의한 지방간 유도과 자가포식과의 연관성을 연구한 또 다른 최근의 연구는 지방간 유도에 있어 고지방식이의 처리 기간과 지방간 유도 정도 등과 같은 특정 조건에 따라 간 내 지질 대사에 있어 자가포식의 작용방식이 달라질 수 있음을 제안했다.¹¹⁾

레스베라트롤은 포도, 오디, 뽕잎 등에 함유되어 있는 천연 물질로서, 심혈관 질환 예방, 항암 작용 등의 효과를 가지는 것으로 알려져 있다.¹²⁻¹⁴⁾ 또한, 당뇨병 환자를 대상으로 한 임상 실험 결과 레스베라트롤은 인슐린 저항성과 당뇨병을 예방 및 개선할 수 있다는 가능성을 보여주었고,¹⁵⁾ 이는 세포 모델과 동물 모델을 이용한 연구 결과들에 의해서도 뒷받침되었다.¹⁶⁻¹⁸⁾ 이와 같은 레스베라트롤의 긍정적 효과는 항산화 효과, 항염증 효과 등의 세부기전에 의한 것으로 제안된다.¹⁹⁾ 이외에도 레스베라트롤이 간에서의 sirtuin1 (Sirt1) 활성을 증가시켜 간의 지방 축적을 감소시킨다는 연구 결과가 보고되면서,²⁰⁾ 레스베라트롤이 비알코올성 지방간 질환에 긍정적 효과를 가질 것이라는 가능성을 보여주고 있다. 하지만, 아직까지는 그 세부 기전에 대한 연구가 미흡하고, 특히 레스베라트롤에 의한 지방간 질환 개선 효과에 대하여 자가포식 조절을 세부 기전으로 연구한 결과는 보고되어 있지 않다.

따라서, 본 연구의 목적은 레스베라트롤이 당뇨병 및 비알코올성 지방간 질환의 병리적 증상들을 개선시킬 수 있는지를 규명하는 것이다. 특히 레스베라트롤에 의한 당뇨병 및 비알코올성 지방간 질환 예방 효과의 주요 기전으로서 간에서의 자가포식 조절에 주목하고 이를 비알코올성 지방간 질환을 수반하는 고지방 식이 유도 비만 쥐 모델을 이용하여 알아보고자 한다.

재료 및 방법

실험동물 및 사육

6주령의 C57BL/6J 수컷 쥐를 중앙실험동물 (Seoul, Korea)에서 공급받아 처음 1주간 표준식이 (Research Diets, New Brunswick, NJ, USA; D12450B, 10% kcal fat)로 환경에 적응시켰다. 적응기간 후 1) 대조군 (control; CON), 2) 고지방식이군 (high fat diet; HF)으로 나누어 고지방식이군의 경우 총 열량대비 45% 지방 함유 고지방식이 (Research Diets; D12451)를 6주간 공급하여 비만을 유도하였고, 각각의 식이는 실험 종료 시까지 유지하였다. 6주간의 비만 유도 후 1) CON군, 2) HF군, 3) HF_RSV군과 같이 총 3군 (n = 6 per group)으로 나누고, vehicle (50% DMSO) 또는 레스베라트롤 (8 mg/kg/day)을 osmotic pump (Alzet Model 1004; Durect Corp., Palo Alto, CA, USA)를 사용하여 4주간 제공하였다. 물과 식이는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 동물사육실의 조건은 온도 20 ± 5℃, 상대습도 65 ± 5%를 유지하였으며 12시간 light-dark cycle로 조명을 조절하였다. 본 논문에서의 동물실험은 전남대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받고 그 규정에 따라 실행하였다.

시료수집

실험 종료 후 12시간 절식시키고 Zoletil (10 mg/kg)과 Rompun (5 mg/kg)을 2 : 1 비율로 혼합하여 복강 내 주사로 마취하였다. 마취 후 심장에서 혈액을 채취하고, 2시간 후 2,500 × g에서 20분간 원심분리 후 혈청을 -80℃에 다음 분석 시까지 보관하였다. 간 조직을 채취 및 정량 후 급속냉동시켜 -80℃에 보관하고, 간 조직의 일부는 2% glutaraldehyde와 2% paraformaldehyde로 고정시킨 후 transmission electron microscopy (TEM) 분석에 사용하였다.

생화학적 분석

혈당, 중성지방 농도는 효소법 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)에 의해 측정하였고, 총콜레스테롤 농도는 Wako사의 Cholesterol E test (Wako Pure Chemical Industries, Richmond, VA, USA)로 측정하였다. 인슐린 (Crystal Chem, Downers Grove, IL, USA)과 아디포넥틴 (AdipoGen, Incheon, South Korea)은 ELISA kit로 측정하였다. Aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT) 활성은 Abcam사의 분석 kit (Cambridge, UK)로 측정하였다.

미토콘드리아 DNA 분석

간 조직의 DNA는 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad,

CA, USA)를 사용해 추출하였고, 미토콘드리아 DNA 분석은 Real-Time PCR system (StepOnePlus; Life technologies, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 측정하였다.²¹⁾ 실험에 사용된 primer의 배열은 Table 1과 같고, 미토콘드리아 DNA 양은 beta-actin에 의해 보정하였다.

Western blot

간 조직을 RIPA lysis buffer (Amersco, Solon, OH, USA)에 넣어 균질화시켜 원심분리 후 상층액을 수집하였다. 50 µg 단백질을 4~15% gradient gel (Bio-rad, Hercules, CA, USA)에 SDS-PAGE로 분리하고 polyvinylidene difluoride membrane (Bio-rad)에 transfer한 후, 5% non-fat milk in Tris buffered saline/tween-20 (TBST; 140 mM sodium chloride, 3.0 mM potassium chloride, 25 mM Tris and 0.05% tween-20) 용액으로 실온에서 1시간 동안 blocking하였다. TBST 용액으로 membrane을 여러 번 씻어준 후 LC-3와 beta-actin (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)에 대한 일차 항체를 이용하여 4°C에서 밤새 membrane과 반응시켰다. 다음 날 membrane을 여러 차례 씻어 준 다음 일차항체에 특이적인 이차항체 (goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 실온에서 한 시간 동안 membrane과 반응시켰다. Membrane을 씻어준 다음 ECL reagent (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)와 반응시켜 ChemiDoc™ XRS + System (Bio-rad)으로 밴드를 확인하고 이미지를 획득하였다.

투과전자현미경 (TEM) 분석

간 조직은 2% glutaraldehyde와 2% paraformaldehyde로 1차 고정된 다음, 1% osmium tetroxide로 2차 고정하였다. 아세톤으로 탈수하고 Spurr's resin에 포매한 후, 초박절기를 사용하여 60~80 nm 두께의 초박절편을 만들었다. 준비된 초박절편을 nickel grids (300 mesh)에 올려놓고 투과전자현미경 (JEM-1400; JEOL, Tokyo, Japan)으로 관찰하고 이미지를 획득하였다. Autophagosome 개수의 분석을 위해서는 각 간 조직 당 3개의 이미지 (25,000 ×) 내 존재하는 autophagosome을 이미지 당 autophagosome의 개수로 나타내었다.

통계처리

본 실험에서 얻은 모든 결과는 SPSS Statistics 21 (Inter-

tional Business Machines, Armonk, NY, USA)을 이용하여 분석하였으며, 모든 실험 결과는 평균 ± 표준오차 (mean ± SEM)로 나타내었다. One-way ANOVA 분석 후 $p < 0.05$ 수준에서 각 실험군 간의 유의차를 표시하였다.

결 과

체중변화, 간 조직 중량,식이섭취량

4주간의 레스베라트롤 처리 후 쥐의 체중, 간 조직 중량, 식이섭취량은 Table 2와 같다. 비만 유도 전 체중은 군간 차이가 없었으나, 비만 유도기간 (6주)과 레스베라트롤 처리기간 (4주)을 합한 총 10주간의 고지방식이 섭취는 대조군 대비 26%의 유의적인 체중 증가를 가져왔다. 반면, 4주간의 레스베라트롤 처리는 체중 변화, 간 조직 중량, 식이섭취량에 영향을 미치지 않았다.

레스베라트롤이 생화학적 대사 지표에 미치는 영향

고지방식이 섭취와 레스베라트롤 처리가 간 기능에 미치는 영향을 알아보기 위해 AST와 ALT 활성을 측정한 결과, 고지방식이 섭취군에서 대조군과 비교하여 AST와 ALT 활성이 유의적으로 증가하였고, 고지방식이 섭취와 함께 제공한 레스베라트롤 처리는 고지방식이 섭취군과 비교하여 ALT 활성은 유의적으로 감소시켰으나 AST 활성은 변화가 없었다 (Table 3). 레스베라트롤이 혈당 조절에 미치는 영향을 분석한 결과 고지방식이 섭취는 혈청의 공복혈당과 인슐린 농도를 증가시켰고, 레스베라트롤 처리는 이를 유의적으로 감소시켜 레스베라트롤이 인슐린 저항성과 혈당조절 능력을 개선시킴을 보여주었다 (Table 3). 인슐린 작용을 조절하는 아디포카인인 아디포넥틴은 고지방식이 섭취 후 유의적으로 감소되었는데, 레스베라트롤 처리에 의해 대조군과 유사한 수준으로 증가되었다.

Table 2. The effect of resveratrol (RSV) on body weight change, liver weight, and food intake

	CON	HF	HF_RSV
Body weight_pre (g)	19.6 ± 0.4	20.0 ± 0.8	20.0 ± 0.5
Body weight_post (g)	30.4 ± 0.9 ^a	38.2 ± 1.7 ^b	37.8 ± 1.4 ^b
Liver weight (g)	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1
Food intake (g/day)	2.9 ± 0.1 ^a	2.7 ± 0.2 ^b	2.7 ± 0.1 ^b

Mean ± SEM (n = 6 per group). Different letters within a variable are significantly different at $p < 0.05$. CON: control, HF: high fat

Table 1. Primers sequences

Name of primers	Forward	Reverse
Actb	cccagccatgtacgttagcca	cgctccggagtcacatcac
mtDNA	gggtcttacttcagggccatca	tgattagaccggtaccatcga

Actb: beta-actin. mtDNA: mitochondrial DNA. Actb and mtDNA were analyzed via SYBR Green chemistry

Table 3. Serum metabolic parameters in lean control (CON) mice and high-fat (HF) fed mice treated with or without resveratrol (RSV)

	CON	HF	HF_RSV
Serum glucose (mg/dL)	81.2 ± 6.3 ^a	277.8 ± 24.0 ^b	150.9 ± 16.3 ^c
Serum insulin (pmol/L)	21.7 ± 5.1 ^a	93.4 ± 5.5 ^b	49.0 ± 10.3 ^c
Serum adiponectin (μg/mL)	14.9 ± 0.6 ^a	6.4 ± 0.8 ^b	11.0 ± 0.9 ^a
AST (U/L)	21.69 ± 1.09 ^a	27.63 ± 1.26 ^b	27.79 ± 1.36 ^b
ALT (U/L)	11.41 ± 2.04 ^a	28.18 ± 1.56 ^b	12.02 ± 1.31 ^a

Mean ± SEM (n = 6 per group). Different letters within a variable are significantly different at p < 0.05. AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase

Table 4. The effect of resveratrol (RSV) on lipid levels in serum and liver

	CON	HF	HF_RSV
Serum TG (mg/dL)	32.1 ± 1.7 ^a	39.9 ± 2.0 ^b	31.1 ± 1.4 ^a
Liver TG (μg TG/mg protein)	16.7 ± 0.8 ^a	27.2 ± 2.0 ^b	16.8 ± 1.7 ^a
Serum TC (mg/dL)	116.6 ± 5.4 ^a	146.8 ± 7.4 ^b	125.2 ± 5.3 ^a
Liver TC (μg TC/mg protein)	41.9 ± 5.8 ^a	59.8 ± 6.4 ^b	44.9 ± 2.7 ^a

Mean ± SEM (n = 6 per group). Different letters within a variable are significantly different at p < 0.05. CON: control, HF: high fat, TC: total cholesterol, TG: triglyceride

고지방식이 섭취에 의해 유의적으로 증가한 혈청 및 간 조직 내 중성지방 농도와 총콜레스테롤 농도는 레스베라트롤 처리에 의해 대조군과 유사한 수준으로 감소되어, 레스베라트롤의 지방간 개선 효과를 보였다 (Table 4).

고지방식으로 유도된 비만쥐에서 레스베라트롤이 간에서의 자가포식에 미치는 영향

레스베라트롤이 간에서의 자가포식에 미치는 영향을 알아보기 위해 TEM 이미지 분석에 의한 세포소기관의 형태학적 분석과 자가포식의 지표인 LC3-II 형성정도를 알아보았다. TEM 이미지 분석 결과 고지방식이 섭취군의 간은 이중막을 가진 autophagosome이 증가되었고 미토콘드리아 등의 세포내 소기관들의 형태가 불규칙적이고 조각난 양상을 보였다 (Fig. 1B and E). 레스베라트롤 처리군의 간은 autophagosome이 감소되어 고지방식이에 의해 과도하게 증가한 자가포식이 정상수준으로 감소되었음을 보였고 (Fig. 1C and F). 대조군 (Fig. 1A and D)과 비교하여 레스베라트롤 처리군의 간세포 내 미토콘드리아의 크기와 cristae의 양이 증가됨을 보였다. 각 TEM 이미지로부터 autophagosome의 개수를 분석한 결과 고지방식이 섭취군의 autophagosome 개수가 가장 많았고, 레스베라트롤 처리군의 간 조직 내 autophagosome 개수는 유의적으로 감소하였다 (Fig. 2A). 또한, 미토콘드리아 DNA 분석 결과 고지방식이 섭취시 간 조직의 미토콘드리아 DNA 양이 감소되었고, 레스베라트롤 투여는 이를 대조군과 유사한 수준으로 증가시켰다 (Fig. 2B). 자가포식의 지표인 LC3-II 형성 정도는 고지방식이군에서 증가하였고, 레스베라트롤 처리군에서 낮은 수준을 보였다 (Fig. 3).

고 찰

본 연구는 레스베라트롤 처리가 고지방식으로 유도한 비만쥐에서 혈당 조절과 혈액과 간의 지질 농도를 개선시키는지를 규명하고, 이에 대한 세부기전으로 간에서의 자가포식조절이 관여함을 알아보고자 하였다. 고지방식이와 함께 4주간의 레스베라트롤 처리 결과 혈당 조절 관련 인자들과 혈청과 간의 중성지방 농도가 개선되었고, 이러한 개선 효과에 있어 고지방식으로 과도하게 유도된 간에서의 자가포식을 레스베라트롤이 정상화시켰음을 확인하였다.

본 연구에서는 8 mg/kg/day의 레스베라트롤을 28일간 osmotic pump를 사용하여 투여하였다. 선행연구들은 0.1~100 mg/kg/day의 레스베라트롤을 동물 및 인체 실험에 적용하였고, 이 농도 범위에서는 독성이 보고되지 않았다.^{17,18,22,23} 4주간의 레스베라트롤 처리는 체중 변화, 간 조직 중량, 식이섭취량에 있어 유의적인 영향을 미치지 않았다. 또한, 레스베라트롤 투여를 위해 피하에 삽입한 osmotic pump 적용 역시 체중, 행동 양상, 삽입 부위 염증반응 관찰 결과 특이할 만한 부작용이 발견되지 않았다. Osmotic pump의 사용은 간단한 피하내 삽입으로 소량의 투여물질을 24시간 내내 일정 속도로 주입하는 특징을 가지므로, 저농도의 투여물질 제공으로 효과를 극대화시킬 수 있다는 장점을 가진다.

French paradox를 설명하기 위해 적포도주의 유효성분과 기능을 규명하려는 노력의 일환으로 레스베라트롤에 대한 초기의 연구들은 심혈관질환 예방 효과에 집중되어 있었으나,

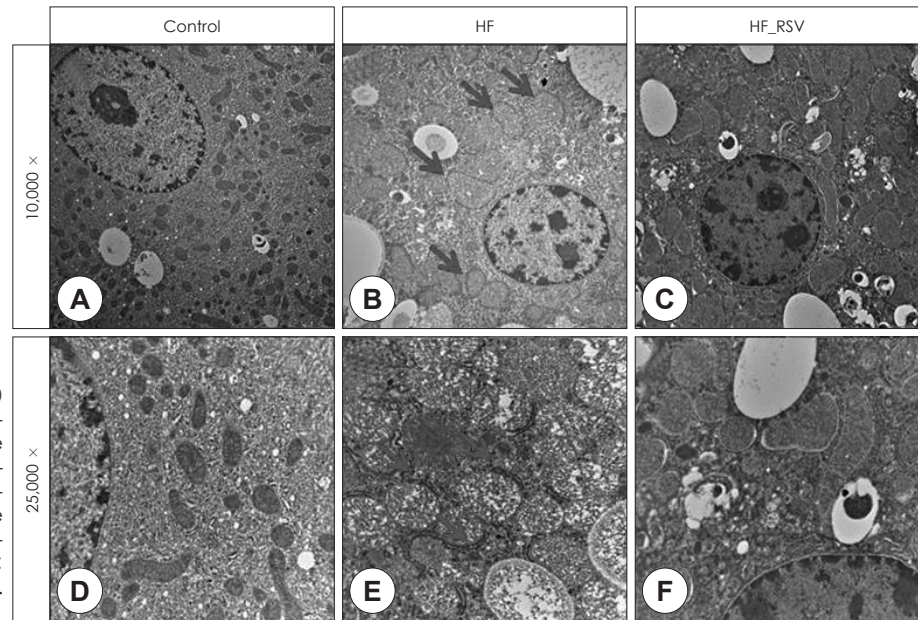


Fig. 1. The effect of resveratrol (RSV) on double-membrane autophagosome formation and cell organelle morphology. RSV reduces the formation of double-membrane autophagosomes (gray arrows), and increase mitochondrial size and cristae content in livers. Original magnification: 10,000 \times (A–C) and 25,000 \times (D–F). CON: control, HF: high fat.

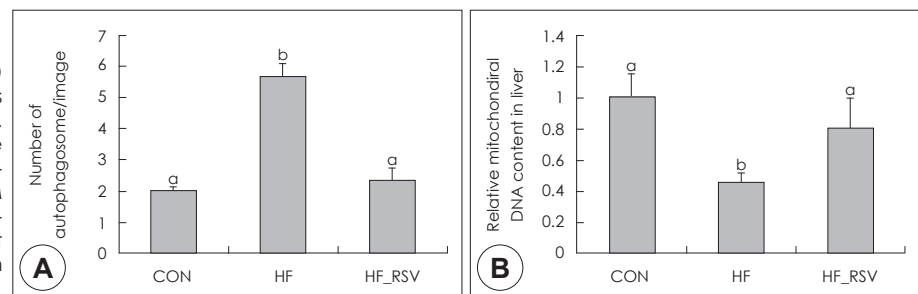


Fig. 2. The effect of resveratrol (RSV) on (A) number of autophagosomes and (B) mitochondrial DNA contents. Number of autophagosomes were analyzed from three separate images per each mouse liver. Mean \pm SEM (n = 6 per group). Different letters within a variable are significantly different at $p < 0.05$. CON: control, HF: high fat.

최근 들어 당뇨병 및 지방간 등의 다양한 대사 질환들에 있어 예방 및 치료 효과를 가지는지에 대한 관심이 높아지고 있다. Streptozotocin에 의해 유도된 당뇨 쥐 모델에서 0.1 mg/kg/day 및 1 mg/kg/day의 레스베라트롤을 7일간 처리한 결과 혈당, 혈중 인슐린 농도, 혈중 지질 농도 및 당뇨병성 신증 (diabetic nephropathy)으로 손상된 신장 기능을 개선시켰고, 이는 레스베라트롤에 의한 산화적 스트레스, 염증성 사이토카인, AMP-activated protein kinase 조절에 의한 것으로 제안되어 졌다.²³⁾ 이와 같은 레스베라트롤의 혈당 강하 효과는 2011년에 발표된 인체 실험에서도 확인되었다.¹⁵⁾ 제2형 당뇨병 환자를 대상으로 하루 10 mg의 레스베라트롤을 4주간 투여한 결과 인슐린 감수성이 개선되었고, 이에 대한 작용 기전으로 산화 스트레스의 감소와 Akt 활성화를 통한 인슐린 신호 전달 체계의 개선이 제시되었다. 레스베라트롤과 당뇨병에 대한 선행 연구 결과들과 유사하게, 본 연구에서도 레스베라트롤 투여는 공복 혈당과 인슐린 농도를 낮추었고 인슐린 작용을 조절하는 아디포넥틴의 농도를 높여 고지방식으로 유도된 인슐린 저항성을 개선시키는 긍정적인 효과를 가짐을 보였다.

반면, 레스베라트롤이 비알코올성 지방간 질환에 미치는 영

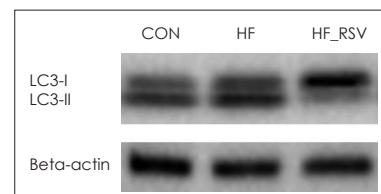


Fig. 3. Representative Western blot image of LC3. LC3-II formation was analyzed in livers of control (CON), high fat diet (HF), and HF with resveratrol (HF_RSV) treated-mice. Beta-actin as a loading control.

향에 대한 연구는 다른 대사 질환에 비해 상대적으로 제한적이고, 염증 반응 조절보다는 시르투인 활성 조절에 초점을 두고 있고 대부분의 연구가 세포 실험 모델에 국한되어 있다. HepG2 간세포 모델을 사용한 두 연구 결과에 의하면, 레스베라트롤은 HepG2 간세포에서의 지방 축적량을 감소시켰고, 이는 Sirt1 활성 조절에 의한 것으로 제안하였다.^{20,24)} 아직까지는 레스베라트롤의 비알코올성 지방간 질환을 포함한 대사 이상 개선에 대한 기전으로서 자가포식과 연관시킨 연구 결과는 보고 되지 않았다.

자가포식은 세포내 재활용 시스템으로 수명이 다하거나 기능이 저하된 단백질과 세포내 소기관들은 세포 내에서 자가

포식을 담당하는 일차적인 소기관인 autophagosome과 autolysosome에 의해 분해된다. 분해된 세포 내 물질들은 세포 생존에 필요한 에너지를 만들거나 새로운 세포소기관 생성에 이용되게 된다.³⁾ 자가포식의 지표는 여러 가지가 있는데 TEM 이미지 분석을 통한 이중막을 가지는 autophagosome 생성 증가와 Western blot 분석을 통한 LC3-II 형성 증가는 자가포식의 마커로 널리 사용된다.²⁵⁾ 자가포식은 세포내 항상성을 유지하는 중요한 역할을 담당하고 세포 생존을 위해 필수적인 과정이다. 하지만, 과도한 자가포식은 오히려 노화, 비만, 인슐린 저항성, 당뇨병 등의 대사적 문제를 일으키게 된다. 비만과 자가포식에 대한 최근의 연구는 자가포식이 비만을 유도하는 기전으로 과도한 자가포식에 의해 peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 (PPAR γ 2)의 안정성이 증가하고 지방세포 분화를 촉진하는 것을 보고하였고, 자가포식의 억제 고지방식이로 인한 비만과 2형 당뇨병의 발병 및 진행을 억제시킨다고 제안하였다.⁸⁾ 반면, 간 내 지질 대사에 대한 자가 포식의 조절 작용은 지방세포와는 다르고 보다 복잡한 양상을 보인다. 간에서의 자가 포식은 지방 분해 작용을 촉진시켜 간 내 지방 축적량을 감소시키고, 자가포식의 기능 부전은 지방간을 유도시킨다.⁹⁾ 하지만, Wistar rat을 대상으로 한 또 다른 연구는 2주간의 고지방식이는 유의적인 간 지방 축적 증가와 함께 자가포식을 증가시켰고, 10주간의 고지방식은 지방간 유도 와 함께 오히려 자가포식을 억제시킴으로써, 지방간 유도에 있어 고지방식이의 처리 기간과 지방간 유도 정도 등과 같은 특정 조건에 따라 간 내 지질 대사에 있어 자가포식의 작용방식이 달라질 수 있음을 제안했다.¹¹⁾ 이같은 선행 연구 결과들은 자가 포식이 지질 대사를 조절하는 방식은 조직 및 세포 특이적이고 특정 조건에 따라 작용방식이 달라질 수 있음을 제시한다.

본 논문의 연구 결과 고지방식이에 의해 과도한 자가포식과 지방간이 유도되었는데 이에 대한 세부 기전으로는 과도한 자가포식에 의해 간 내 지질 생성이 증가하였거나, 또는 PPAR α 리간드/PPAR α 의 활성 또는 발현 수준을 감소시켜 간에서의 지방산 산화를 억제시킴으로써 지방간을 유도한 것으로 제안해 볼 수 있다.²⁶⁾ 아디포넥틴은 PPAR α 의 수준을 증가시키는 것으로 알려져 있는데,²⁷⁾ 본 논문에서 고지방식이에 의한 혈중 아디포넥틴의 감소는 PPAR α 발현 정도를 낮추는데 기여할 것이라 제안한다. 고지방식이로 유도한 높은 수준의 혈중 및 간 조직 내 중성지방이 레스베라트롤에 의해 유의적으로 감소됨을 보여 레스베라트롤이 지방간 개선에 효과가 있을 것임을 제안하였다. 또한, 고지방식이에 의해 과도한 자가포식이 유도되고, 레스베라트롤이 이를 억제시킴을 레스베라트롤에 의한 autophagosome 감소와 LC3-II 형성 감소를 통해 보여주었다.

레스베라트롤이 자가포식을 조절하는 세부 기전을 밝히는 직접적인 연구 결과는 보고되지 않았으나, Sirt1과 연관시켜 다음과 같은 기전들이 제안되고 있다: 1) 레스베라트롤이 탈아세틸화효소인 Sirt1의 활성을 증가시켜 자가포식 조절 인자들을 탈아세틸화시키고, 2) 레스베라트롤이 Sirt1의 하부조절인자이자 전사인자인 forkhead box O1 (Foxo1)을 활성화시켜 자가포식 조절 인자들의 유전자 발현을 조절함으로써 자가포식을 조절한다는 것이다.²⁸⁾ 본 연구에서의 레스베라트롤에 의한 지방간 개선효과를 자가포식과 연결시켜 보면, 레스베라트롤에 의한 자가포식의 억제가 간 내 지질 생성을 억제시키고, 고지방식이와 과도한 자가포식에 의해 억제된 PPAR α 리간드/PPAR α 의 활성 또는 발현 수준을 높여 지방산 산화를 증가시킴으로써 지방간을 개선시킬 수 있다는 것을 세부기전으로 제안해 볼 수 있다. 앞에서 언급한 바와 같이 아디포넥틴은 PPAR α 의 수준을 증가시키는데,²⁷⁾ 본 연구에서 레스베라트롤에 의해 증가된 아디포넥틴은 PPAR α 의 발현 수준을 증가시킬 수 있을 것이라 제안한다. 본 연구에서는 레스베라트롤이 자가포식을 조절하는 기전을 명확하게 규명하지는 않았지만, 앞에서 제시된 세부 기전들을 통해 레스베라트롤이 자가 포식을 조절하고 간 내 지질 대사를 지방간을 완화시키는 방향으로 변화시킨다고 사료된다. 다수의 선행 연구 결과들은 레스베라트롤이 자가포식을 촉진시키는 것으로 보고하고 있는데,^{29,30)} 본 논문의 결과는 레스베라트롤이 과도한 자가포식을 억제시킨다는 것을 보여주었고, 따라서, 레스베라트롤이 자가포식을 조절하는 방식은 특정 자극이나 병리적 조건의 종류에 따라 달라진다는 것을 제안한다.

본 연구는 레스베라트롤이 당뇨병 및 비알코올성 지방간 질환 관련 인자들을 개선시킨다는 것을 확인하였고, 이에 레스베라트롤에 의한 간에서의 자가포식 조절이 수반됨을 보여주었다. 이 연구 결과는 레스베라트롤 및 레스베라트롤 함유 식품인 포도, 와인, 포도 가공식품 섭취가 자가포식 조절을 통해 당뇨병 및 지방간을 개선시킬 수 있다는 가능성에 대한 실험적 근거를 제공하고, 레스베라트롤을 당뇨병 및 관련 합병증 예방 및 치료의 실용적인 방법으로 적용하는데 활용할 수 있을 것으로 기대한다.

요 약

본 연구에서는 레스베라트롤이 당뇨병 및 비알코올성 지방간 질환 개선 효과를 가지는지를 규명하기 위해 고지방식이 유도 비만 쥐를 대상으로 레스베라트롤을 4주간 osmotic pump를 사용하여 공급한 후 정상대조군과 고지방식이 제공 비만군과 비교 분석하였고 그 결과는 다음과 같다.

1) 고지방식이 유도 비만 쥐를 대상으로 8 mg/kg/day의 레스베라트롤을 4주간 처리한 결과 체중 변화, 간 조직 중량, 식이 섭취량에 영향을 미치지 않았다.

2) 레스베라트롤은 공복 혈당, 혈청 내 인슐린, 중성지방, 총 콜레스테롤 농도를 낮추었고, 인슐린 작용을 촉진시키는 혈청 아디포넥틴 수준을 개선시켰다. 또한, 고지방식이에 의해 높아진 간 조직 내 중성지방과 총콜레스테롤 농도를 낮추어 레스베라트롤이 지방간 개선 효과를 가질 수 있음을 제안하였다.

3) 자가포식의 표지인자인 autophagosome 생성과 LC3-II 형성 분석 결과, 고지방식이에 의해 과도한 자가포식이 유도되었음을 확인하였다. 레스베라트롤 처리는 이중막을 가지는 autophagosome 생성과 LC3-II 형성을 감소시켜 고지방식에 의해 유도된 과도한 자가포식을 억제시킴을 보여주었다.

결론적으로 고지방식이와 함께 레스베라트롤을 제공하는 것은 당뇨병과 비알코올성 지방간 질환 관련 대사 인자들을 개선시키고, 이는 간에서의 자가포식 조절과 관련이 있다고 제안한다.

Literature cited

- 1) Rector RS, Thyfault JP, Wei Y, Ibdah JA. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: an update. *World J Gastroenterol* 2008; 14(2): 185-192
- 2) Torres DM, Harrison SA. Diagnosis and therapy of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2008; 134(6): 1682-1698
- 3) Rubinsztein DC, Mariño G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell* 2011; 146(5): 682-695
- 4) Madeo F, Tavernarakis N, Kroemer G. Can autophagy promote longevity? *Nat Cell Biol* 2010; 12(9): 842-846
- 5) Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, Bray K, Reddy A, Bhanot G, Gelinas C, Dipaola RS, Karantz-Wadsworth V, White E. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 2009; 137(6): 1062-1075
- 6) Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008; 132(1): 27-42
- 7) Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC, Englert JA, Rabinovitch M, Cernadas M, Kim HP, Fitzgerald KA, Ryter SW, Choi AM. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol* 2011; 12(3): 222-230
- 8) Zhang C, He Y, Okutsu M, Ong LC, Jin Y, Zheng L, Chow P, Yu S, Zhang M, Yan Z. Autophagy is involved in adipogenic differentiation by repressing proteasome-dependent PPAR γ 2 degradation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013; 305(4): E530-E539
- 9) Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, Cuervo AM, Czaja MJ. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 2009; 458(7242): 1131-1135
- 10) Singh R, Cuervo AM. Lipophagy: connecting autophagy and lipid metabolism. *Int J Cell Biol* 2012; 2012: 282041
- 11) Papáčeková Z, Daňková H, Páleníčková E, Kazdová L, Cahová M. Effect of short- and long-term high-fat feeding on autophagy flux and lysosomal activity in rat liver. *Physiol Res* 2012; 61 Suppl 2: S67-S76
- 12) Signorelli P, Ghidoni R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *J Nutr Biochem* 2005; 16(8): 449-466
- 13) Wu JM, Hsieh TC. Resveratrol: a cardioprotective substance. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1215: 16-21
- 14) Bertelli AA, Das DK. Grapes, wines, resveratrol, and heart health. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009; 54(6): 468-476
- 15) Brasnyó P, Molnár GA, Mohás M, Markó L, Laczy B, Cseh J, Mikolás E, Szijártó IA, Mérei A, Halmi R, Mészáros LG, Süme-gi B, Wittmann I. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *Br J Nutr* 2011; 106(3): 383-389
- 16) Park CE, Kim MJ, Lee JH, Min BI, Bae H, Choe W, Kim SS, Ha J. Resveratrol stimulates glucose transport in C2C12 myotubes by activating AMP-activated protein kinase. *Exp Mol Med* 2007; 39(2): 222-229
- 17) Sharma S, Misra CS, Arumugam S, Roy S, Shah V, Davis JA, Shirmalla RK, Ray A. Antidiabetic activity of resveratrol, a known SIRT1 activator in a genetic model for type-2 diabetes. *Phytother Res* 2011; 25(1): 67-73
- 18) Kang W, Hong HJ, Guan J, Kim DG, Yang EJ, Koh G, Park D, Han CH, Lee YJ, Lee DH. Resveratrol improves insulin signaling in a tissue-specific manner under insulin-resistant conditions only: in vitro and in vivo experiments in rodents. *Metabolism* 2012; 61(3): 424-433
- 19) Szkudelski T, Szkudelska K. Anti-diabetic effects of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1215: 34-39
- 20) Hou X, Xu S, Maitland-Toolan KA, Sato K, Jiang B, Ido Y, Lan F, Walsh K, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, Cohen RA, Zang M. SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2008; 283(29): 20015-20026
- 21) Picca A, Fracasso F, Pesce V, Cantatore P, Joseph AM, Leeuwenburgh C, Gadaleta MN, Lezza AM. Age- and calorie restriction-related changes in rat brain mitochondrial DNA and TFAM binding. *Age (Dordr)*. Forthcoming 2012
- 22) Yoshino J, Conte C, Fontana L, Mittendorfer B, Imai S, Schechtman KB, Gu C, Kunz I, Rossi Fanelli F, Patterson BW, Klein S. Resveratrol supplementation does not improve metabolic function in nonobese women with normal glucose tolerance. *Cell Metab* 2012; 16(5): 658-664
- 23) Chang CC, Chang CY, Wu YT, Huang JP, Yen TH, Hung LM. Resveratrol retards progression of diabetic nephropathy through modulations of oxidative stress, proinflammatory cytokines, and AMP-activated protein kinase. *J Biomed Sci* 2011; 18(1): 47
- 24) Wang GL, Fu YC, Xu WC, Feng YQ, Fang SR, Zhou XH. Resveratrol inhibits the expression of SREBP1 in cell model of steatosis via Sirt1-FOXO1 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 380(3): 644-649
- 25) Barth S, Glick D, Macleod KF. Autophagy: assays and artifacts. *J Pathol* 2010; 221(2): 117-124
- 26) Kallwitz ER, McLachlan A, Cotler SJ. Role of peroxisome proliferators-activated receptors in the pathogenesis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14(1): 22-28
- 27) Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, Yasuda T, Noguchi H, Seike M, Yoshimatsu H. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF- α in KK-Ay obese mice. *Hepatology* 2004; 40(1): 177-184
- 28) Ng F, Tang BL. Sirtuins' modulation of autophagy. *J Cell Physiol*. Forthcoming 2013
- 29) Morselli E, Mariño G, Bennetzen MV, Eisenberg T, Megalou E, Schroeder S, Cabrera S, Bénit P, Rustin P, Criollo A, Kepp O, Gal-

luzzi L, Shen S, Malik SA, Maiuri MC, Horio Y, López-Otín C, Andersen JS, Tavernarakis N, Madeo F, Kroemer G. Spermidine and resveratrol induce autophagy by distinct pathways converging on the acetylproteome. *J Cell Biol* 2011; 192(4): 615-629

30) Wu Y, Li X, Zhu JX, Xie W, Le W, Fan Z, Jankovic J, Pan T. Resveratrol-activated AMPK/SIRT1/autophagy in cellular models of Parkinson's disease. *Neurosignals* 2011; 19(3): 163-174