

식이제한이 TALLYHO/JngJ 생쥐의 표현형에 미치는 영향

한국화학연구원, 충남대학교 수의과대학¹

정원훈 · 김희연 · 구승진 · 천혜경 · 조성환¹ · 이상달

Effects of Food Restriction on Phenotypes of TALLYHO/JngJ Mouse

Won Hoon Jung, Hee Youn Kim, Seung Jin Koo, Hyae Gyeong Cheon, Sung-whan Cho¹, Sang Dal Rhee

Korea Research Institute of Chemical Technology; and College of Veterinary Medicine¹, Chungnam National University

Abstract

Background: Food restriction has been reported to ameliorate diabetes and obesity. In this study, we examined the effects of the food restriction on phenotypes of TALLYHO/JngJ (TH) mouse, a recently developed diabetic model animal.

Methods: 3 week-old TH mice were divided into 2 groups (n = 20 each for food-restricted (THR) and free-fed (THF)) and THR mice were fed the same amount of food as normal control mice (C57BL/6, n = 20). Body weight was weekly monitored till 14 weeks of age. The half of animals were sacrificed at 8 weeks of age, and liver, kidney, and fat weight were measured. The histopathology of liver and brown fat tissues and mRNA expression of leptin in adipose tissue were analyzed. The oral glucose tolerance test and insulin resistance test was done at 14 weeks of age. The plasma concentrations of glucose, free fatty acid, triglyceride, cholesterol and leptin were analyzed.

Results: The THR mice had lower body weights than the THF mice, similar to C57BL/6 mice, with reduced fat deposition in liver and brown fat tissue. The plasma levels of glucose, triglyceride and free fatty acid were decreased in the THR group. The THR mice, however, carried more fat than normal mice, with increased plasma leptin concentration and leptin mRNA expression in fats and no alteration in plasma cholesterol levels. Furthermore, the THR mice revealed glucose intolerance with impaired after-meal insulin secretion and slight insulin resistance.

Conclusion: The food restriction apparently ameliorated the obesity and diabetic phenotypes of TH mice. However, plasma concentration of cholesterol were not improved in THR mice with increased adiposity index and glucose intolerance, suggesting the genetically prone tendency of obesity and diabetes development in TH mice possibly with an impairment in cholesterol metabolism. (KOREAN DIABETES J 32:304-316, 2008)

Key Words: Diabetes mellitus, Food restriction, Model animal, Obesity

접수일자: 2008년 5월 13일, 통과일자: 2008년 7월 16일, 책임저자: 이상달, 한국화학연구원

* 본 연구는 과학기술부 지원 21세기프론티어연구사업 '생체기능조절물질개발사업단 (CBM32-B3001-01-00-00)'과 한국화학연구원 기본연구사업의 지원으로 수행됨.

서 론

비만은 유전적인 요소들과 행동양식과 같은 여러 가지 환경요소들의 복합적인 상호작용에 의하여 발생된다고 알려져 있는데, 궁극적으로는 체내로 섭취하는 음식물의 총량에 해당되는 에너지흡수량이 체내에서의 기초대사량과 활동량 및 생체의 발열량 등의 총합인 에너지소모량보다 많은 경우에 형성된다^{1,2)}. 에너지흡수량의 증가 또는 소모량의 감소가 비만의 형성에 미치는 영향은 여러 가지 비만동물모델들을 이용하여 많은 연구가 진행되어 왔다. *ob/ob* 또는 *db/db* 생쥐 등의 설치류 동물모델을 이용한 이제까지의 연구에 의하면 섭식량의 증가가 비만의 가장 큰 원인으로 밝혀졌으나 사료 섭취를 제한하는 경우에도 비만이 완전히 억제되지 않는 것으로 보아 에너지소모량의 감소도 비만 발현에 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 생각되고 있다³⁻⁵⁾. 이렇게 형성된 비만은 당뇨병, 고혈압, 이상지질혈증, 협심증, 뇌졸중 등과 같은 대사증후군의 발병 위험을 높이며⁶⁾, 특히 과잉 축적된 내장지방은 인슐린저항성 증가 및 인슐린의 분비 감소와 관련이 깊다고 알려져 있다⁷⁾.

식이제한은 생체에 에너지 흡수량을 제한하는 것으로 생명체에 여러 가지 긍정적인 영향을 끼친다고 보고되어 왔다. 식이제한이 흰쥐의 수명을 연장시킨다고 보고된 이래⁸⁾, 식이제한은 비만을 억제하고 췌도베타세포의 기능을 호전시키며, 인슐린감수성 및 혈당조절능력을 향상시킨다고 하였다^{9,10)}. 설치류에 식이제한을 한 경우 포도당, 중성지방 및 콜레스테롤 등의 혈중농도가 감소되며^{11,12)}, 영양류에서도 내장지방의 감소와 공복혈당 및 혈중 콜레스테롤 농도가 감소되는 것으로 알려져 있다^{13,14)}. 또한 사람에서 식이제한을 할 경우 피하지방 및 복부지방은 물론 혈중 저밀도지단백콜레스테롤 (low density lipoprotein (LDL)-Cholesterol) 농도는 감소되고 고밀도지단백콜레스테롤 (high density lipoprotein (HDL)-Cholesterol) 농도는 증가된다고 보고되어 있다¹⁵⁻¹⁸⁾. 이러한 보고들은 식이제한이 당뇨병과 비만을 예방하거나 치료하는 효과가 있다는 것을 말해준다.

본 연구에 사용한 TALLYHO/JngJ (TH) 생쥐는 최근 Jackson 연구소에서 소개한 당뇨병모델동물로 다뇨와 당뇨를 나타내는 변이동물로부터 선택육종에 의하여 개발되어 몇 가지 원 인유전자에 대한 분석과 함께 2001년에 처음 보고되었다¹⁹⁾. 이 동물모델은 비만 정도는 심하지 않으나 피하지방보다 복부지방의 양이 더 많은 전형적인 복부비만을 나타내며 수컷에서만 10에서 14주령 사이에 당뇨병이 발병된다고 알려져 있다^{19,20)}. Kim 등²¹⁾의 연구에 의하면 이 당뇨병동물모델은

인슐린저항성이 주령이 증가함에 따라 증가하고 인슐린분비 기능에는 이상이 없는 것으로 발표하였으나, 본 연구팀의 연구에서는 4주령의 어릴 때에는 인슐린저항성의 증가가 아닌 인슐린분비의 억제가 당불내성의 원인이었다²²⁾. 그리고 최근의 보고에 의하면 TH생쥐는 혈관의 수축기능장애도 가지고 있는 것으로 밝혀졌다²³⁾.

본 연구에서는 TH생쥐에게 사료섭취량의 제한을 통해 비만을 억제하였을 때 비만과 당뇨병에 관련한 여러 생리 및 생화학적 지표와 병리조직학적 소견들을 관찰함으로써 식이제한이 TH생쥐의 당뇨병 및 비만과 관련된 표현형에 미치는 영향에 대해 연구하였다.

재료 및 방법

1. 동물

본 실험에 사용된 TH 및 C57BL/6생쥐는 미국 Jackson 연구소에서 도입하여 한국화학연구원 대사증후군치료제연구센터에서 봉쇄방식으로 육종, 번식시킨 동물을 사용하였다. 사육실 환경조건은 온도 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 소음 60 db 이하, 암모니아가스 20 ppm 이하, 조명 150~300 Lux, 조명시간 12시간 명암주기, 환기횟수 13~15 회/시간 등의 환경 범위 내에서 실험하였다. 폴리카아보네이트로 만들어진 사육상자에서 동물을 사육할 때 방사선 멸균된 생쥐용 일반고형사료(퓨리나, 군포, 한국 - 조지방 4.5%, 조단백 20.12%, 섬유소 3.5% 등)와 실험동물 전용 깔짚(성진그린, 서울, 한국)을 사용하였다. 동물 사육상자 교환은 주 2회 실시하였고 동물실 내에서 사용되는 모든 기자재 및 깔짚의 멸균은 고압증기멸균기(삼공사, 군포, 한국)를 이용하였으며 음수는 상수도를 여과한 후, 자외선 유수 멸균기를 통과시킨 물을 자유롭게 섭취하도록 공급하였다.

2. 실험방법

3주령에 이윅시킨 TH생쥐 수컷 40마리를 체중을 기준으로 자유식이군 (THF)과 식이제한이군 (THR)으로 각각 20마리씩 나누었고, 대조군으로 사용되는 C57BL/6생쥐 역시 3주령의 수컷 20마리를 사용하였다. 각 군의 동물들은 사육상자 당 1마리씩 관리하고, 대조군과 자유식이군은 사료를 정상급여하였고, 식이제한군의 경우 대조군인 C57BL/6생쥐들의 일일사료섭취량을 측정하여 그 평균량을 그 다음날 매일 1회 급여하면서 체중은 매주 1회 측정하였다. THR군에 급여된 사료량은 THF군에 급여된 사료량의 평균 약 70%에

해당되는 양이었다. 8주령에는 동물들 중 군당 10마리를 CO₂ 가스를 사용하여 희생시킨 다음 간과 신장 등의 장기의 중량을 측정하였다. 이때 비만도 (Adiposity index)는 전체 몸무게에서 총 지방량을 뺀 후 다시 지방의 중량으로 나누어서 계산하였다 [비만도 = 지방중량/(체중-지방중량)]¹⁹⁾. 간과 지방조직에서의 병리조직학적인 관찰을 실시하였으며, 8주령과 14주령에 혈중 생리생화학적인 지표들을 분석하였다.

3. 병리조직학적 관찰

8주령에 각 군의 생쥐들을 16시간 절식하고 이산화탄소 가스로 희생시킨 다음 간과 갈색지방을 채취하여 10% 중성 포르말린에 고정한 후 통상방법에 따라 Hematoxylin-Eosin (H-E) 염색하였으며, 지방염색을 위해서 채취된 간 조직을 즉시 동결절편을 만들어 Oil red O로 염색하여 광학현미경으로 400배에서 관찰하였다.

4. 혈액의 생화학 및 면역학적 검사

8주령 및 14주령에 경구당부하검사 시 채취한 보관된 혈장시료를 이용하여 공복혈당, 중성지방 (Triglyceride, TG), 유리지방산 (Free fatty acid, FFA), 고밀도지단백콜레스테롤, 저밀도지단백콜레스테롤, 및 총 콜레스테롤 (Total-Cholesterol, Total-C)의 농도는 비색계시스템을 사용하는 Selectra2 생화학분석기 (Vital Scientific사, Netherlands)를 이용하여 측정하였다. 혈중 인슐린농도는 Shibayagi사 (Japan)의 Ultra sensitive mouse insulin ELISA Kit를 사용하여 면역학적인 방법으로 측정하였으며, 혈중 랩틴농도는 Crystal Chem사 (USA)의 ELISA kit을 사용하여 측정하였다.

5. 지방조직에서의 렙틴 발현 분석

8주령에 각 군 10마리로부터 각각 서혜부 (Inguinal)의 피하지방과 정소주위의 복부지방조직 (Reproductive fat)을 채취하여 다음과 같이 분석하였다.

1) RNA 분리와 cDNA합성

동물들을 16시간 금식하여 이산화탄소가스로 희생시킨 후 조직시료를 액화질소에 즉시 동결하여 -80°C에 저장하여 보관하였다. 총 RNA는 RNA Extraction Kit (인트론사, 한국)를 사용하여 얻었고 RNA 시료는 분광광도계로 정량하고 총 RNA 1 µg을 사용하여 최종 부피 20 µL로 42°C에서 1시간동안 역전사반응을 시켜 cDNA를 얻었다.

2) RT-PCR 분석

랩틴유전자의 발현량 변화는 Real time PCR machine (Rotor-gene 3000, Corbett Research, Australia)으로 CyberGreen 법을 이용하여 분석되었다. 반응용액에는 cDNA 3 µL, primer (10 pM), MgCl₂ (25 mM), dNTP (2.5 mM), Taq polymerase (5 U/µL), 10 × buffer)이 포함되었고, 반응조건은 초기변성 (94°C) 반응을 10분 동안 진행시킨 후, 변성반응 (94°C) 20초, 결합 반응 (62°C) 20초, 연장반응 (72°C), 30초로 40회 반복하였다. 대조유전자로는 Glyceraldehyde-3-phosphate (GAPDH)를 사용하였고 mRNA는 각각의 산출된 threshold cycle (Ct)값 중 GAPDH에서 Leptin 유전자의 Ct 값을 뺀 Ct 값차 (ΔCt)에서 C57BL/6의 발현값을 기준으로 ΔΔCt 값을 구한 후 2^(-ΔΔCt)의 수치로 발현량을 계산하였다. GAPDH (396 bp)와 Leptin (300 bp)은 GenBank의 유전자 서열 정보를 통한 Primer 3.0 프로그램을 이용하여 디자인 하였다. Primer들의 유전자서열은 다음과 같다.

GAPDH (GenBank No. XM_132897), GTTTCCTACCCCC AATGTGT (forward) 및 TGTGAGGGAGATGCTCAGTG (reverse); Leptin (GenBank No. NM_008493), TTCACACACGCGAGTC GGTAT (forward) 및 CTCAAAGCCACCACCTCTGT (reverse)

6. 경구당부하검사 (Oral Glucose Tolerance Test, OGTT)

각 군당 10마리씩 8주령 및 14주령에 각 각 16시간 금식시킨 후 오전 10시에 안구하정맥에서 헤파린으로 코팅된 미세관을 이용하여 채혈한 뒤 생리식염수에 용해시킨 포도당 용액을 2 g/kg의 용량으로 경구투여한 후 15, 30, 60 및 120분에 다시 채혈하였다. 혈액시료는 1200 ×g로 4°C에서 10분간 원심분리한 후 혈장을 분리하여 혈중포도당농도를 분석하였다.

7. 인슐린 내성 검사 (Insulin Tolerance Test, ITT)

14주령에 동물들을 16시간 동안 금식시킨 후 오전 10시에 채혈한 뒤 0.54 IU/kg의 인슐린 (Sigma Aldrich)을 복강 투여한 후 15, 30, 60, 120분에 안구하정맥에서 채혈하고 혈장을 분리하여 혈중포도당농도를 분석하였다.

8. 통계학적 분석

시험결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었고 Origin 6.0 프로그램을 이용하여 Student's t test로써 각 군들 간의 유의성검정을 하여 P < 0.05 이하일 때 유의성 있는 것으로 판단하였다.

결 과

1. 식이제한이 TH 생쥐의 체중에 미치는 효과

TH식이제한군에는 대조군인 C57BL/6의 하루사료섭취량만큼의 사료를 공급하였다. TH자유식이군의 일일사료섭취량은 평균 5.0 ± 0.6 g/day이었고 대조군의 일일사료섭취량은 3.5 ± 0.1 g/day로서 (Fig. 1B), TH식이제한군에는 자유식이군 일일사료섭취량의 약 70%가 실험기간동안 공급되었다. TH식이제한군의 체중을 대조군인 C57BL/6와 비교한 결과, 14주령에서의 체중은 TH식이제한군이 27.1 ± 0.8 g이고 C57BL/6군이 27.3 ± 1.0 g으로 아주 유사하였다 (Fig. 1A). 하지만 4주에서 8주 사이에서는 오히려 TH식이제한군의 체중이 대조군보다 낮은 경향성을 보였는데 특히 5주령에서는 각각 TH식이제한군이 17.0 ± 1.2 g이고 대조군이 21.0 ± 1.0 g으로 유의성있는 차이를 보였다 ($P < 0.01$). 그래서 주령에 따른 체중증가의 양상은 대조군의 체

중에 TH식이제한군이 서서히 근접하는 형태로 나타났다.

2. 식이제한이 장기에 미치는 영향

식이제한이 장기에 미치는 영향을 조사하기 위하여 8주령에 동물들을 희생시킨 다음 간, 신장, 및 여러 가지 지방 조직들의 무게를 측정하고 병리조직학적인 관찰을 하였다. TH자유식이군의 지방 중량은 대조군에 비하여 현저하게 높았다 ($P < 0.005$). 식이제한을 할 경우 지방조직의 무게와 체중에 대한 비율 모두 자유식이군에 비하여 유의성있게 감소하였으나 대조군에 비해서는 높았다 ($P < 0.005$) (Table 1). 지방을 복부지방과 피하지방으로 나누어 살펴보았을 때 두 지방조직 모두 중량과 비율은 모두 TH자유식이군에 비해 적으나 대조군보다는 높았다. 지방조직과 비지방조직간의 중량비율을 나타내는 비만도에서도 같은 결과를 보였다 (Table. 1). 이는 C57BL/6군과 TH식이제한이군 간에 체중 차이는 없는 상황에서 나온 결과이므로 TH식이제한군은

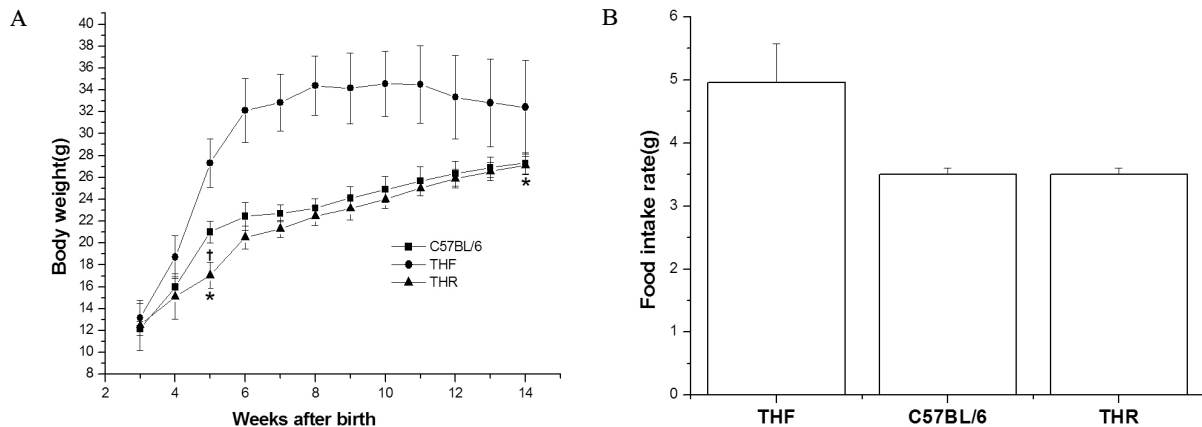


Fig. 1. Effect of food restriction on body weight in TH mice. A. Body weight changes of free-fed TH (THF), food-restricted TH (THR) and C57BL/6 mice from 3 to 14 weeks of age ($n = 10$ each). B. Average food intake rate. * indicate $P < 0.01$, vs THF and † $P < 0.01$, vs C57BL/6, respectively.

Table. 1. Effect of food restriction on organ weight and ratio to body weight in mice at 8 weeks of age ($n = 10$ /group)

Tissue	Weight (g)			Ratio to body weight (g/100g body weight)		
	C57BL/6	THF	THR	C57BL/6	THF	THR
Liver	0.99 ± 0.08	$1.42 \pm 0.14^{\dagger}$	$1.13 \pm 0.03^*$	4.84 ± 0.42	4.82 ± 0.33	4.69 ± 0.17
Kidney	0.31 ± 0.04	$0.55 \pm 0.04^{\dagger}$	$0.33 \pm 0.03^*$	1.54 ± 0.22	$1.86 \pm 0.17^{\dagger}$	$1.36 \pm 0.14^*$
Fat						
Abdominal	0.31 ± 0.04	$1.72 \pm 0.12^{\dagger}$	$0.80 \pm 0.03^{**}$	1.50 ± 0.13	$5.85 \pm 0.38^{\dagger}$	$3.32 \pm 0.09^{**}$
Subcutaneous	0.30 ± 0.05	$1.20 \pm 0.10^{\dagger}$	$0.50 \pm 0.01^{**}$	1.44 ± 0.20	$4.07 \pm 0.16^{\dagger}$	$2.07 \pm 0.04^{**}$
Total fat	0.60 ± 0.07	$2.92 \pm 0.20^{\dagger}$	$1.30 \pm 0.04^{**}$	2.94 ± 0.23	$9.92 \pm 0.49^{\dagger}$	$5.39 \pm 0.09^{**}$
Adiposity index	0.03 ± 0.00	$0.11 \pm 0.01^{\dagger}$	$0.06 \pm 0.00^{**}$			

THF, free-fed TallyHo mice; THR, food-restricted TallyHo mice. Data are expressed as the mean \pm S.D. * $P < 0.05$, vs THF; † $P < 0.01$, † $P < 0.005$, vs C57BL/6.

‘마른 비만’의 형태가 나타난 것이라 할 수 있을 것이다.

간과 신장의 중량은 C57BL/6대조군에 비하여 TH자유식이군에서 높은 것으로 나타났으며 신장의 경우 체중에 대한 장기중량의 비율도 높았다 ($P < 0.01$). TH식이제한군의 장기중량은 신장의 경우 중량과 비율 모두 대조군과 비슷하게 감소하였고 ($P < 0.005$), 간의 경우 중량은 대조군정도로 감소하였으나 ($P < 0.005$), 체중에 대한 비율은 세 가지 군에서 모두 비슷하였다 (Table 1).

희생된 동물들의 간과 지방세포에서 병리조직학적인 분석을 수행하였다. 그 결과 H-E 염색한 TH자유식이군의 간 조직에서 심한 공포변성이 관찰되었고 (Fig. 2B), 식이제한군은 자유식이군에 비해 경감된 소견을 나타내었다 (Fig. 2C). 관찰된 공포변성이 지방인지 아닌지 확인하기 위해 Oil red O 염색한 결과 자유식이군의 간에서는 적색으로 염색된 지방구가 간소엽 전체에 걸쳐 심하게 축적되어 있지만 (Fig. 2E), 식이제한군은 자유식이군에 비해 지방의 축적이 경감된 양상을 나타내었다 (Fig. 2F). 갈색지방조직의 H-E 염색에서는 자유식이군 (Fig. 2H)에서 많은 지방의 축적이 관찰되었고, 식이제한군 (Fig. 2I)은 자유식이군에 비해 경감된 중등도의 공포가 다수 흩어져 있는 것을 볼 수 있었다.

3. 식이제한이 혈중 생화학적인 지표에 미치는 영향

이유 후 식이제한에 들어가기 직전인 3주령일 때 수컷

C57BL/6와 TallyHo 생쥐의 당뇨병 또는 비만과 관련된 생화학적인 지표의 공복혈중농도를 분석한 결과, 포도당 (C57BL/6, 115 ± 20 mg/dL vs TallyHo, 141 ± 25 mg/dL, $P < 0.01$), 중성지방 (C57BL/6, 100 ± 33 mg/dL vs TallyHo, 134 ± 17 mg/dL, $P < 0.01$), 유리지방산 (C57BL/6, 1221 ± 352 μ Eq/dL vs TallyHo, $1,085 \pm 161$ μ Eq/dL), 총 콜레스테롤 (C57BL/6, 89 ± 8 mg/dL vs TallyHo, 101 ± 6 mg/dL, $P < 0.01$), 고밀도지단백콜레스테롤 (C57BL/6, 61 ± 9 mg/dL vs TallyHo, 70 ± 6 mg/dL, $P < 0.05$), 저밀도지단백콜레스테롤 (C57BL/6, 38 ± 4 mg/dL vs TallyHo, 40 ± 4 mg/dL)로서 유리지방산과 저밀도지단백콜레스테롤을 제외한 모든 생화학적인 지표의 혈중농도가 정상동물보다 TallyHo에서 높은 것으로 나타났다. 식이제한을 실시하고 난후 8주령과 14주령에서 이들 생화학적 지표를 다시 측정 한 결과 자유식이군에서 대조군에 비하여 모든 생화학적인 지표들이 8주령과 14주령에서 모두 높은 것으로 나타났다. 식이제한군에서의 생화학적인 지표들의 혈중농도는 공복혈당, 중성지방 및 유리지방산은 대조군 수준으로 떨어졌는데 체중과 관련이 깊었다. 하지만 총 콜레스테롤과 고밀도지단백콜레스테롤 및 저밀도지단백콜레스테롤들의 혈중농도는 조금 낮아지기는 하였으나 자유식이군에 비하여 개선되지 않은 결과를 나타내었다 (Table. 2). 이러한 결과는 8주령과 14주령에서 공통적으로 나타났다.

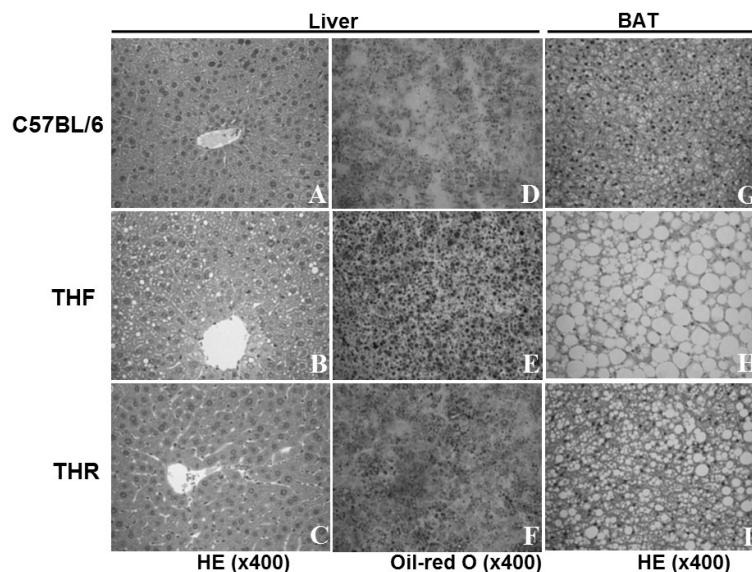


Fig. 2. Effect of food restriction on fat deposition in liver and brown adipose tissues. Microscopic appearance of liver with H-E (left panel) and Oil red O staining (middle panel) and of brown fat with HE staining (right panel) at 8 weeks of age. A, D, and G: C57BL/6. B, E and H: free-fed TH (THF). C, F and I: food-restricted TH mice (THR). BAT, Brown adipose tissue.

Table. 2. Effect of food restriction on plasma biochemical parameters at 8 and 14 weeks of age (n = 10/group)

Parameters	8 weeks			14 weeks		
	C57BL/6	THF	THR	C57BL/6	THF	THR
Glucose (mg/dL)	88 ± 7 (3.8) ^a	136 ± 10 [†] (4.0)	91 ± 11 [*] (4.1)	97 ± 13 (3.6)	167 ± 22 [†] (5.2)	113 ± 15 [*] (4.2)
TG (mg/dL)	111 ± 27 (4.8)	394 ± 55 [†] (11.5)	114 ± 23 [*] (5.1)	134 ± 22 (4.9)	464 ± 121 [†] (14.3)	172 ± 47 [*] (6.3)
FFA (μEq/dL)	1,136 ± 180 (49.0)	1,738 ± 171 [†] (50.1)	1,169 ± 105 [*] (52.0)	1,031 ± 206 (37.8)	1,608 ± 381 [†] (49.6)	1,089 ± 107 [*] (40.1)
Total-C (mg/dL)	108 ± 4 (4.7)	152 ± 14 [†] (4.4)	136 ± 10 [†] (6.1)	117 ± 10 (4.3)	175 ± 21 [†] (5.4)	161 ± 9 [†] (5.9)
HDL-C (mg/dL)	76 ± 7 (3.3)	108 ± 1 [†] (3.1)	92 ± 14 [†] (4.1)	81 ± 6 (3.0)	107 ± 11 [†] (3.3)	92 ± 10 [†] (3.4)
LDL-C (mg/dL)	25 ± 4 (1.1)	35 ± 5 [†] (1.0)	29 ± 3 [†] (1.3)	24 ± 3 (0.9)	33 ± 8 [†] (1.0)	30 ± 6 [†] (1.1)

FFA, free fatty acid; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; TG, triglyceride; Total-C, total cholesterol; THF, free-fed TallyHo mice; THR, food-restricted TallyHo mice. Data are expressed as the mean ± S.D, * $P < 0.005$, vs THF; $^{\dagger} P < 0.005$, vs C57BL/6. ^a is the value corrected with its body weight (/g).

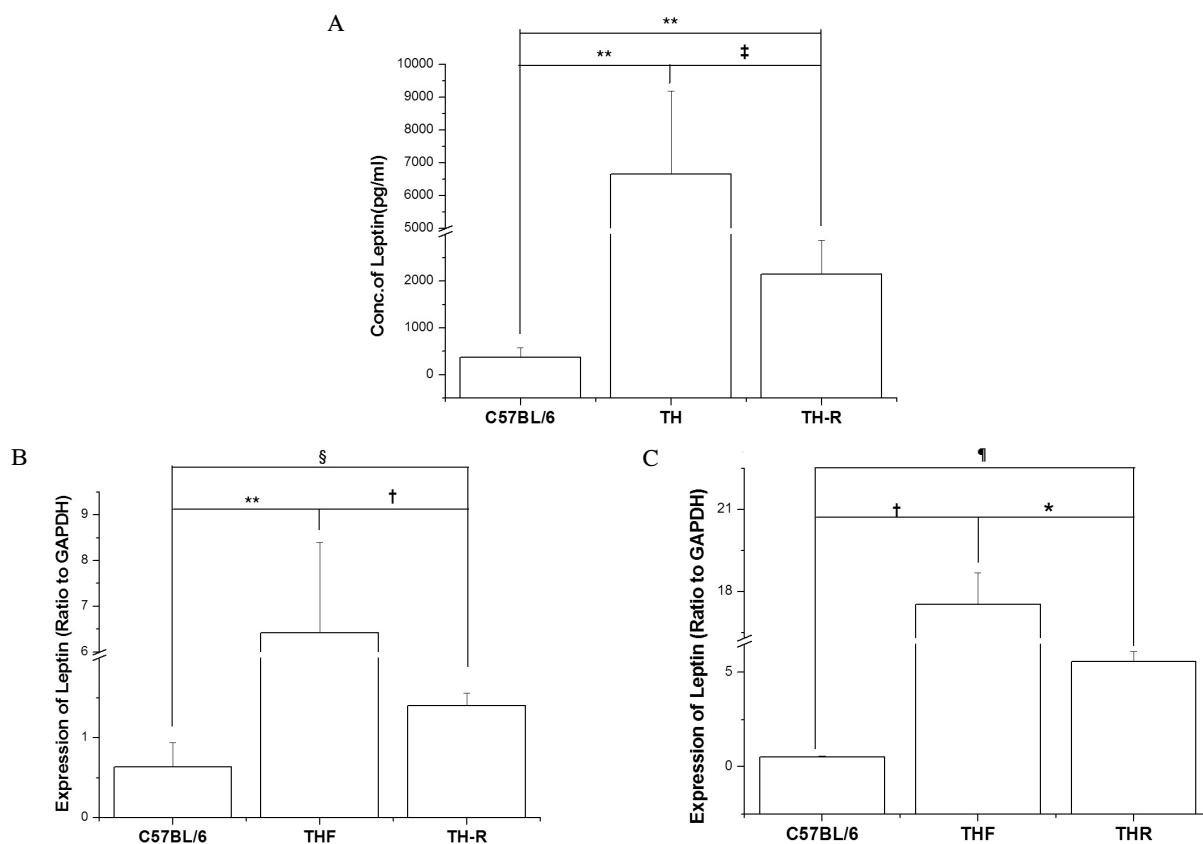


Fig. 3. Effect of food restriction on plasma leptin concentration and mRNA expression in adipose tissues at 8 weeks of age. A. Plasma leptin concentration (n = 10 each). B. mRNA expression of leptin in subcutaneous fat tissue (n = 4 each). C. mRNA expression of leptin in reproductive fat tissue (n = 4 each). *, † , and ‡ indicate $P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.005$, vs THF, respectively and § , ¶ , and ** , indicate $P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.005$, vs C57BL/6, respectively. THF, free-fed TallyHo mice; THR, food-restricted TallyHo mice.

4. 식이제한이 혈중 렙틴농도와 발현에 미치는 영향

비만 정도에 따라 높아진다고 알려져 있는 식욕을 조절하는 호르몬인 렙틴의 혈중농도를 측정하였다. 렙틴의 혈중농도는 8주령일 때 자유식이군의 경우 $6,660 \pm 2,540$

pg/mL로서 380 ± 200 pg/mL인 대조군에 비하여 13배 정도 높았고 식이제한군에서는 $2,150 \pm 720$ pg/mL로서 대조군에 비하여 약 5배 정도 높은 결과를 보여서 식이제한에 의하여 혈중 렙틴농도가 낮아지기는 하였으나 대조군만큼 낮아지지 않았다 (Fig. 3A). 14주령에서도 8주령과 비슷한

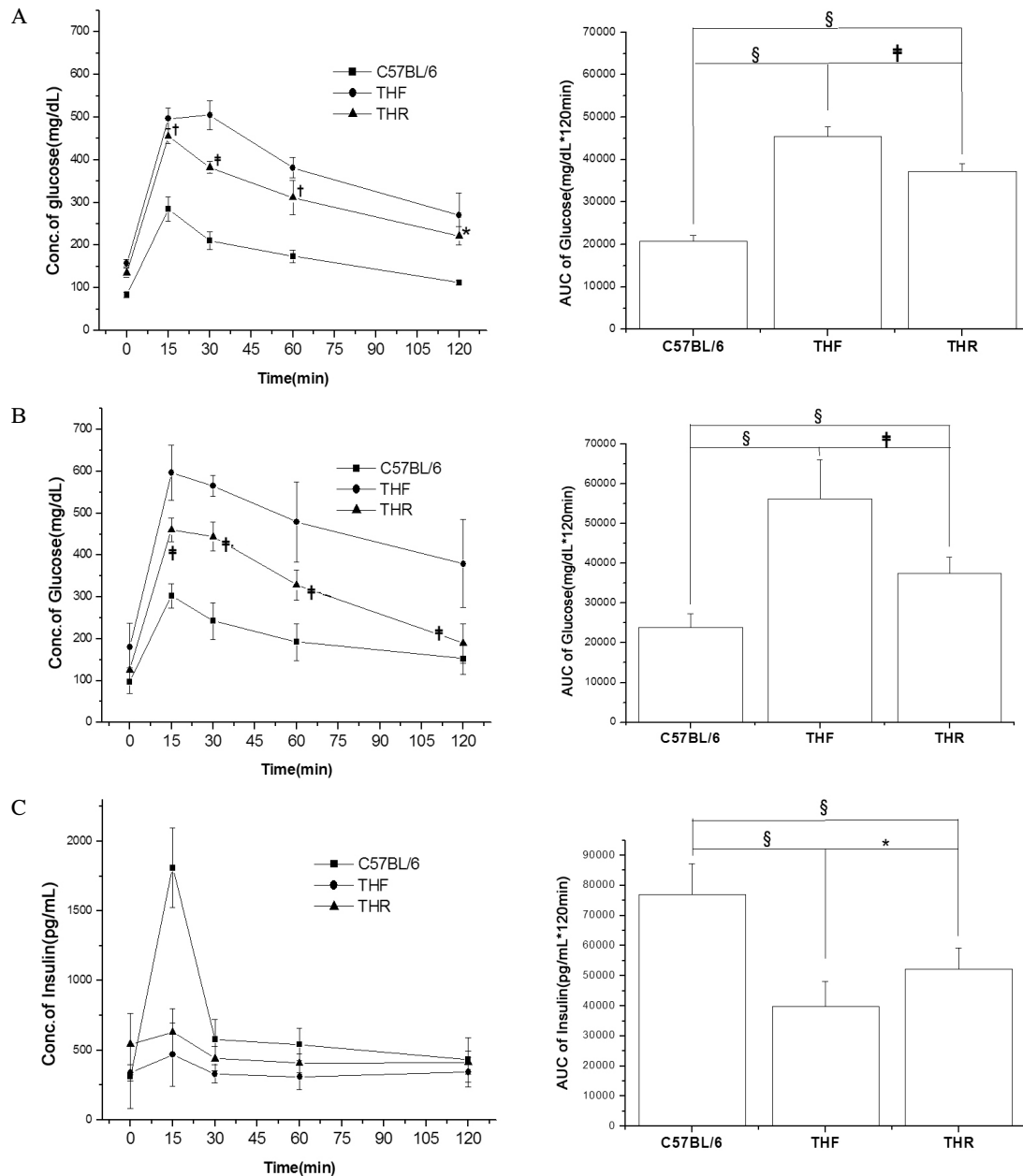


Fig. 4. Effect of food restriction on glucose intolerance and insulin secretion. A. Oral glucose tolerance test (OGTT) at 8 weeks of age ($n = 10/\text{group}$) (left) and. Area under the curve of glucose (right) at 8 weeks of age. B. OGTT at 14 weeks of age ($n = 10/\text{group}$) (left) and Area under the curve of glucose (right) at 14 weeks. C. Insulin secretion during the OGTT at 14 weeks of age (left) and Area under the curve of insulin (right). *, † and ‡ indicate $P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.005$, vs THF and § $P < 0.005$ vs C57BL/6, respectively.

경향성을 보였다(data not shown).

렙틴을 발현하는 지방조직의 렙틴발현의 변화양상을 측정한 결과 피하지방에서의 렙틴발현은 대조군에 비하여 자유식이군에서 10배 정도 높아졌으나 식이제한군에서는 2배 높은 정도로 자유식이군에 비하여 감소하였으며(Fig. 3B), 복부지방에서의 렙틴발현도 자유식이군에서는 30배 정도 높아져 있었지만 식이제한군에서는 그 정도가 10배 높은 정도로 자유식이군에 비하여 발현량이 감소하였다는 것을 알 수 있었다(Fig. 3C).

5. 식이제한이 당불내성에 미치는 영향

식이제한이 당불내성에 미치는 영향을 측정하기 위하여 경구당부하시험(Oral glucose tolerance test; OGTT)를 8주령과 14주령에 실시하였다. 경구당부하시험결과, 8주령과 14주령 모두에서 TH식이제한군의 혈중포도당농도가 TH자유식이군에 비해 관찰한 모든 시간대에서 낮을 뿐만 아니라(Fig. 4A and 4B, 왼쪽 그래프), 120분간의 총포도당농도 변화량(Area Under the Curve; AUC)도 유의성 있게 낮은

것으로 나타났다(Fig. 4A and 4B, 오른쪽 그래프). 하지만 C57BL/6에 비해서는 여전히 내당능장애가 있는 결과를 보여 주었다. 이때 인슐린농도를 측정한 결과 포도당투여에 의해 유도되는 인슐린분비 반응도 대조군 수준으로는 항상되지 않았다(Fig. 4C).

6. 식이제한이 인슐린저항성에 미치는 영향

식이제한이 인슐린저항성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 TH식이제한군의 체중이 대조군과 비슷한 14주령에 인슐린저항성시험을 실시하였다. 인슐린을 0.54 U/kg의 용량으로 복강투여한 후 2시간 동안의 혈중포도당 농도를 측정해 본 결과 식이제한군의 혈중포도당농도가 자유식이군에 비하여 현저하게 감소되어 있는 것을 알 수 있었다(Fig. 5A). 식이제한군의 혈중포도당농도변화가 대조군의 변화양상에 아주 근접하는 결과를 얻었으나 여전히 대조군에 비하여 약간의 인슐린저항성이 있다는 것을 총 포도당변화량으로 알 수 있었다(Fig. 5B).

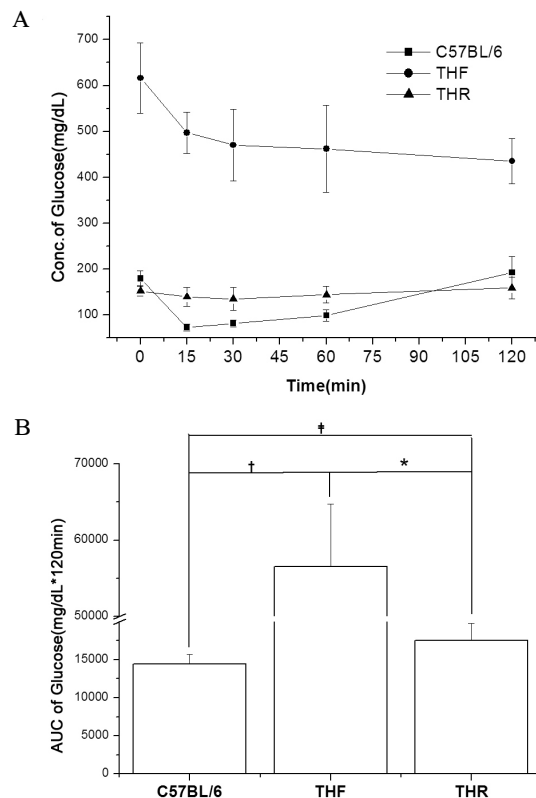


Fig. 5. Effects of food restriction on insulin tolerance. A. Changes in plasma glucose concentration during insulin tolerance test (ITT) at 14 weeks of age (n = 10/group). B. Area under the curve of glucose during ITT. * indicate $P < 0.005$ vs THF and † and ‡ $P < 0.05$ and $P < 0.005$, vs C57BL/6, respectively.

고 찰

본 연구는 비교적 최근에 개발된 당뇨병 동물모델인 TALLYHO/JngJ (TH) 생쥐에 사료섭취량을 제한한 후 체중과 지방의 무게를 측정하고 여러 가지 혈액 중의 생리생화학적인 지표와 조직의 병리조직학적 소견을 관찰함으로써 식이제한이 TH 생쥐의 당뇨병과 비만에 미치는 영향에 대해 알아보고자 하였다.

TH 식이제한군의 경우 대조군으로 사용된 C57BL/6 생쥐가 섭취하는 양만큼 TH 생쥐에 제공하였다. 이 경우 TH 식이제한군은 TH 자유식이군에 비하여 약 70%의 사료를 공급받았다. 이러한 식이제한의 결과 TH 식이제한군의 체중은 대조군과 비슷한 정도로 증가하였다 (Fig. 1A). 이전의 C57BL/6J-*ob/ob* (*ob/ob*)와, C57BL/6J-*db/db* (*db/db*) 생쥐를 이용한 여러 연구에 의하면 이들 비만동물모델의 경우 렙틴에 의한 식욕조절기전이 파괴된 원인으로 인한 과식이 비만의 중요한 원인이라고 생각되고 있으나, 본 연구와 같이 대조군의 사료섭취량만큼 비만동물모델에게 먹이는 Pair fed 실험을 통한 결과에서는 식이제한을 하더라도 여전히 비만은 나타났다고 보고되었다³⁾. 이는 과식뿐만 아니라 기초대사량의 감소도 이 동물모델들의 비만발달에 중요한 역할을 하고 있음을 말해준다. 하지만, 식이제한이 체중에 미치는 영향은 동물모델에 따라 다르게 나타난다. Martins 등이 6종의 비만 및 당뇨병동물모델에서 실시한 6주간의 pair-fed 실험의 결과 *ob/ob*, *db/db*, C57BL/6J-agouty (A^y), 및 gold-thioglucose (CTG) 처리한 CBA (CTG-CBA) 생쥐에서는 식이제한에 의한 체중감소량이 크지 않았고 New Zealand Obese (NZO)와 C57BL/6J-*fat/fat* (*fat/fat*) 생쥐에서는 거의 대조군 수준으로 체중이 감소하였으나 대조군보다는 높은 경향을 나타내었다²⁴⁾. 이러한 이전의 결과와 비교하였을 때 TH 생쥐의 체중증가 기전은 에너지소모량이 감소되었을 것으로 예측되는 이러한 동물들과는 달리 에너지소모량의 감소는 없이 에너지흡수량의 증가에 의해서만 나타난다는 것을 시사한다. 이는 왜 TH 생쥐의 체중이 비슷한 사료섭취량을 나타내는 *ob/ob* 생쥐에 비하여 낮은지를 설명하는 하나의 단서가 될 수 있다.

식이제한군은 자유식이군에 비하여 지방의 중량이 감소하였는데 복부지방과 피하지방의 중량이 비슷한 정도로 감소하였다 (Table 1). 이것은 식이제한이 특정지방을 선택적으로 줄이는 것이 아니라 모든 부위에 비슷한 정도로 영향을 주었다는 것을 시사한다. 그리고 식이제한을 통한 체중증가의 둔화는 TH 자유식이군에 비해 간, 신장 및 지방의

중량이 낮은 것과 연관성을 보였고 간과 갈색지방조직에서의 지방분포를 경감시키는 효과가 관찰되었다 (Fig. 2). 이는 이제까지 알려진 식이제한이 생체에 미치는 긍정적인 효과가 TH 생쥐에서도 그대로 나타난 결과이다. 하지만 대조군과 체중이 유사함에도 불구하고 TH 식이제한군의 총 지방량과 비만도는 여전히 대조군보다 높은 결과를 보였다 (Table 1). 이 결과는 TH 식이제한군에서 비지방조직에 대한 지방조직의 비율이 대조군보다 높다는 것을 의미하는데 이는 비지방조직의 중량이 감소되었다는 것을 의미한다. 이는 TH 생쥐가 비만으로 가는 유전적인 경향성을 가지고 있다는 것을 말해주고 있다. 그리고 이러한 TH 식이제한군의 표현형은 사람들에게 알려진 “마른 비만”과 유사한 형태의 비만이라고 할 수 있을 것이므로 좀 더 자세한 연구가 필요하다고 사료된다.

이제까지의 여러 연구에 의하면 혈중 렙틴농도는 사람 및 동물에서 비만과 밀접한 연관성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다²⁵⁾. 본 연구팀은 이전 연구에서 TH 생쥐의 혈중 렙틴농도가 본 연구에서 대조군으로 사용된 C57BL/6 생쥐에 비하여 10배 이상 높아져 있다는 보고를 한 바 있다²²⁾. 이렇게 높은 혈중 렙틴농도는 식이제한하게 되면 현저히 감소하는 효과를 보였으나 여전히 대조군보다 5배 정도 높은 결과를 나타내었다 (Fig. 3A). 이러한 혈중농도는 지방조직에서 렙틴의 mRNA 발현량과 관계가 있었다. 그리고 렙틴유전자의 발현을 피하지방과 복부지방에서 각각 측정된 결과 식이제한군에서의 발현량이 대조군에 비하여 피하지방에서는 2배, 복부지방에서는 10배 이상의 발현증가가 관찰되었다. 이는 TH 식이제한군에서의 높은 혈중 렙틴농도는 피하지방에서의 렙틴발현 보다 복부지방에서의 렙틴발현증가에 기인할 것이라는 가능성을 제시한다. 이 결과는 다른 모델 동물들에서의 혈중 렙틴농도의 증가가 피하지방보다 복부지방에서 유래한 것이라는 다른 보고^{26,27)}와 합치하는 것이다.

당뇨병 및 비만과 관련된 혈중 생화학적 지표들을 분석한 결과 TH 자유식이군에서 현저히 높아져 있던 공복혈당과 중성지방 및 유리지방산은 TH 식이제한군에서 유의성 있게 낮아져서 대조군과 비슷한 농도를 나타내었다. 하지만 총 콜레스테롤, 고밀도지단백콜레스테롤 및 저밀도지단백콜레스테롤 등 콜레스테롤과 관련되어있는 지표들의 농도는 TH 자유식이군에 비하여 전혀 낮아지지 않았다 (Table. 2). 이제까지의 연구에 의하면 식이제한이 혈중 생화학적 지표에 미치는 영향은 품종에 따라 다양하게 나타난다. 앞서 인용된 Martins 등의 연구논문에 의하면, 6주간의 식이제한실험 후 NZO, *fat/fat*, *ob/ob*, A^y , CBA-GTG 및 *db/db* 생쥐들에

서 혈중생화학적 지표들의 농도를 측정해 본 결과 혈중포도당농도는 *db/db* 생쥐를 제외한 모든 품종에서 정상으로 회복되었고, 혈중중성지방의 농도는 모든 모델동물에서 각각의 대조군 수준으로 감소되었다²⁴⁾. 이는 중성지방의 농도가 체중 및 내장지방과 연관되어 있다는 보고²⁸⁾와 일치한다. 또한 대조군 수준의 유리지방산농도는 간에서 포도당신생을 억제하여 혈중공복혈당을 대조군 수준으로 낮추는데 기여했을 것으로 생각된다. 혈중콜레스테롤 농도의 경우, 5종의 동물모델에서는 거의 정상동물 수준으로 감소가 되었으나 NZO 생쥐의 경우 감소는 하였으나 정상동물과 비만모델동물의 중간 수준이었다. 식이제한군에서 중성지방은 낮아지고 콜레스테롤은 낮아지지 않는 이러한 결과는 또 다른 당뇨병동물모델 흰쥐인 OLETF에서도 보고된 바 있다²⁹⁾.

TH식이제한군에서 혈중의 다른 생화학적 지표들에 비하여 콜레스테롤과 관련된 지표들의 혈중 농도가 전혀 변화가 없다는 것은 TH 마우스가 선천적으로 콜레스테롤대사이상을 갖고 있을 가능성이 있음을 시사한다. Kawashiri와 Rader의 리뷰³⁰⁾에 의하면 콜레스테롤의 대사이상에는 다양한 유전자들이 관여하고 있는데, LDL receptor 유전자나 lipoprotein lipase 유전자 또는 ApoE 유전자에 결핍이 생기면 총 콜레스테롤이 증가하는 원인이 되며, Lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) 유전자나 ABCA1 유전자 또는 ApoA-1 유전자에 문제가 생길 경우는 혈중고밀도지단백콜레스테롤의 농도가 현저히 낮아지는 표현형이 나타나는 것으로 알려져 있다. 이밖에 Lysosomal acid lipase (LAL)과 microsomal transfer protein (MTP) 유전자가 결핍될 경우에도 혈중 지단백의 농도가 증가한다고 한다. 이외에도 핵 호르몬 수용체인 Farnesoid X receptor (FXR)의 활성이 콜레스테롤의 배출을 늦추어 지방세포에 콜레스테롤을 증가 시키며³¹⁾, liver x receptor (LXR)도 그 하위에 ABCA1이 있어 지방생성을 일으키는데 관여되어 있다고 보고되었다³²⁾. TH 생쥐의 콜레스테롤 대사이상이 이러한 유전자들의 기능 이상에 기인하는지는 추후 연구가 필요하다.

당뇨병과 관련한 경구당부하시험 결과 TH식이제한군에서 8주령과 14주령 모두 대조군에 비해 여전히 내당능 장애를 보이며 인슐린분비 또한 개선되지 않았다 (Fig. 4). 이처럼 개선되지 않은 당불내성은 여러 가지 원인과 연관되어 있을 가능성이 높다. 그 첫 번째는 인슐린 비결핍에 의한 당불내성의 증가이다. 본 연구팀의 이전 연구에서 TH 생쥐는 대조군인 C57BL/6에 비해 인슐린분비가 감소되어 있는 것을 확인한 바 있으며 이러한 인슐린분비의 감소는 TH 생쥐가 가지는 높은 혈중렙틴농도와 TH 생쥐의 췌장섬에서 렙틴

에 대한 감수성 증가와 관련이 있을 가능성이 있음을 확인한 바 있다²²⁾. 또한 다른 연구에서도 설치류에서 식이제한으로 인한 체중의 감소는 혈중렙틴농도를 낮추어 인슐린분비의 증가를 가져온다고 보고한 바 있다³³⁾. 따라서 본 연구의 식이제한을 통해 TH자유식이군의 렙틴농도를 낮춤으로써 감소되어있는 인슐린분비의 회복을 기대하였으나 대조군 수준으로 되돌리지 못하였다. 이것은 혈중렙틴농도가 여전히 대조군 수준보다 높고 TH 생쥐의 췌장섬에서의 렙틴에 대한 감수성이 높기 때문에 췌장섬에서의 인슐린분비가 정상으로 회복되지 않았을 가능성을 시사한다. 두 번째의 원인으로, 인슐린에 대한 높은 내성이다. 본 연구결과에서의 인슐린내성검사에 따르면 TH식이제한군은 자유식이군에 비하여 인슐린에 대한 감수성이 정상수준에 상당히 근접하였으나 대조군 수준으로 완전히 개선되지 않아 여전히 인슐린저항성을 가지고 있었다 (Fig. 5). 이러한 본 연구에서의 두 가지 결과를 종합해보면 TH식이제한군에서의 당불내성에는 인슐린분비결핍이 인슐린저항성의 증가보다 많은 영향을 주고 있다고 판단할 수 있었다.

TH식이제한군에서 나타나는 인슐린저항성의 원인으로서는 체중이 대조군과 비슷한 정도로 감소하였음에도 불구하고 TH 생쥐가 여전히 가지고 있는 비만이 원인일 가능성이 높다. 지방의 축적은 인슐린저항성을 포함한 대사증후군과 밀접한 상관관계가 있음이 많은 논문에서 보고되어 있다.

Pi-Sunyer 등³⁴⁾은 복부에 축적된 지방은 피하지방과 달리 인슐린감수성 및 피하지방과 독립적인 구성요소로써 대사적으로 중요하며, 복부지방세포는 피하지방세포에 비해 기초지방분해율이 더 높고 인슐린의 지방분해억제작용에 덜 민감한 것으로 알려져 있어 복부지방의 증가가 인슐린감수성을 감소시킬 수 있다고 하였다. 또한 Ruderman 등은 내당능장애와 고중성지방, 복부비만 및 인슐린저항성 등을 동반하는 비비만형 당뇨병환자에서 복부지방과 인슐린감수성의 상관관계는 지방량이 많을수록 낮은 인슐린감수성을 보이고 근육의 당수송분자인 Glut4가 감소되어 있는 것을 확인하였다³⁵⁾. 그러나 축적된 복부지방이 인슐린저항성의 직접적인 원인으로 작용하는지 인슐린저항성의 결과인지는 명확하지 않다. 복부비만과 인슐린저항성에 있어 부신피질에서 분비되는 호르몬 중 당질대사와 관계하는 스테로이드호르몬인 글루코코르티코이드는 근육, 간 및 지방조직의 세포 내 수용체 (glucocorticoid receptor)를 통해 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 (11 β -HSD1)에 활성화되는데 이 활성화된 과잉의 글루코코르티코이드는 제2형 당뇨병에서 인슐린저항성을 일으킨다고 보고되어 있으며, 특히 복부지방

조직에서 높은 발현을 보인다고 하였다^{36,37)}. 따라서 추후 이 호르몬에 대한 연구도 TH생쥐의 연구에 중요한 자료가 될 것으로 생각된다.

이 연구에서 당뇨병동물모델인 TH생쥐에 식이제한을 하면 대조군 수준의 체중증가와 함께 혈중 포도당, 중성지방, 유리지방산 농도를 감소시키는 결과를 가져왔다. 병리조직학적 관찰에서도 자유식이인 TH생쥐에 비해 간과 갈색지방 조직에서 지방축적의 감소가 확인되었다. 이들의 결과로서 식이제한이 당뇨병과 비만에 관련한 표현형을 개선시킨다는 것과 TH생쥐의 비만은 사료섭취량의 증가에 의한 것임을 알 수 있었다. 하지만 식이제한에도 불구하고 TH생쥐는 여전히 높은 지방조직비율을 나타내었고 혈중렙틴농도와 지방 조직에서의 렙틴발현이 증가되었으며, 또한 당불내성과 인슐린저항성을 보이고 있었고 콜레스테롤 대사와 관련한 지표들이 개선되지 않았다. 비록 이연구가 10주간의 비교적 짧은 연구기간에 이루어져 장기간 식이제한 후의 결과를 예측하기는 쉽지 않지만 이 보고에서의 연구결과는 TH생쥐가 그 고유의 유전적인 요인에 의해 비만으로 발전할 경향성이 있음을 말해주며, 식이제한한 TH생쥐는 정상체중에도 불구하고 비만지표는 높은 이른바 ‘마른 비만’의 연구에 좋은 동물모델이 될 수 있다고 생각된다.

요 약

연구배경: 식이제한은 당뇨병이나 비만에 관련된 여러 가지 증상들을 개선시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 최근에 보고된 당뇨병동물모델 중의 하나인 TallyHo/JngJ (TH)생쥐에 식이제한을 하여 당뇨병 및 비만과 관련된 표현형이 어떻게 변화하는지를 관찰하였다.

방법: 3주령의 TH생쥐를 20마리씩 두 군으로 나누고 한 군은 자유식이를 다른 한 군은 대조군인 C57BL/6 생쥐의 일일하루섭취량만큼 먹이를 공급하면서 체중을 매주 측정하였다. 8주령에 군당 10마리씩 동물들을 희생시켜 간, 신장, 및 지방조직의 무게를 측정하였고 지방조직에서의 렙틴발현과 함께 간과 갈색지방조직의 병리조직학적인 분석을 진행하였다. 경구당부하시험을 8주령과 14주령에 인슐린저항성 시험을 14주령에 실시하였으며 8주령과 14주령에 동물들의 혈액의 생화학적 면역학적 분석을 통하여 혈중 포도당, 중성지방, 유리지방산 및 콜레스테롤과 함께 렙틴의 농도를 측정하였다.

결과: TH생쥐의 식이제한군은 자유식이군에 비하여 체중이 감소하여 대조군인 C57BL/6생쥐와 비슷하였고 간과

갈색지방에서의 지방침착도 감소하였다. 혈중 생화학적인 지표들 중 포도당, 유리지방산, 중성지방의 농도는 감소하여 대조군과 비슷한 정도를 나타내었으나 혈중 콜레스테롤 농도는 전혀 감소되지 않았다. 체중이 대조군과 유사한 정도를 나타내면서도 불구하고 비만도는 대조군에 비하여 TH식이 제한군에서 높았고 혈중렙틴농도와 지방조직에서의 렙틴의 발현정도도 높았다. 그리고 TH식이제한군에서 여전히 당불내성을 나타내었으며 인슐린저항성은 많이 개선되었으나 정상수준은 아니었다.

결론: 본 연구결과를 보아 식이제한은 확실히 TH생쥐의 당뇨병과 비만에 관련된 여러 가지 지표들을 개선시켰다. 하지만 비만도 또는 당불내성 및 혈중콜레스테롤농도와 같은 몇 가지 표현형은 개선되는 효과가 낮았는데 이는 TH생쥐가 선천적으로 비만과 당뇨병이 발병하는 경향성을 가지고 있다는 것을 의미하며 특히 콜레스테롤대사에 이상이 있을 가능성을 시사한다.

참 고 문 헌

1. Ravussin E, Bogardus C: *Energy balance and weight regulation: genetics versus environment. Br J Nutr* 83(suppl 1):S17-20, 2000
2. Stein CJ, Colditz GA: *The epidemic of obesity. J Clin Endocrinol Metab* 89:2522-5, 2004
3. Bray GA, York DA: *Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. Physiol Rev* 59:719-809, 1979
4. Levin N, Nelson C, Gurney A, Vandlen R, de Sauvage F: *Decreased food intake does not completely account for adiposity reduction after ob protein infusion. Proc Natl Acad Sci USA* 93:1726-30, 1996
5. Lowell BB, Spiegelman BM: *Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. Nature* 404:652-60, 2000
6. Kopelman PG: *Obesity as a medical problem Nature* 404:635-43, 2000
7. Kissebah AH, Vydellingum N, Murray R, Evans DJ, Hartz AJ, Kalkhoff RK, Adams PW: *Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. J Clin Endocrinol Metab* 54:254-60, 1982
8. McCay CM: *Nutrition in relation to aging. Gastroenterologia* 80:193-203, 1953

9. Simonen P, Gylling H, Miettinen TA: *Acute effects of weight reduction on cholesterol metabolism in obese type 2 diabetes. Clin Chim Acta* 316:55-61, 2002
10. Williams KV, Mullen ML, Kelley DE, Wing RR: *The effect of short periods of caloric restriction on weight loss and glycemic control in type 2 diabetes. Diabetes Care* 21:2-8, 1998
11. Mahoney LB, Denny CA, Seyfried TN: *Caloric restriction in C57BL/6J mice mimics therapeutic fasting in humans. Lipids Health Dis* 5:13, 2006
12. Park SY, Choi GH, Choi HI, Ryu J, Jung CY, Lee W: *Calorie restriction improves whole-body glucose disposal and insulin resistance in association with the increased adipocyte-specific GLUT4 expression in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. Arch Biochem Biophys* 436:276-84, 2005
13. Hansen BC, Bodkin NL: *Primary prevention of diabetes mellitus by prevention of obesity in monkeys. Diabetes* 42:1809-14, 1993
14. Kemnitz JW, Roecker EB, Weindruch R, Elson DF, Baum ST, Bergman RN: *Dietary restriction increases insulin sensitivity and lowers blood glucose in rhesus monkeys. Am J Physiol* 266:E540-7, 1994
15. Walford RL, Harris SB, Gunion MW: *The calorically restricted low-fat nutrient-dense diet in Biosphere 2 significantly lowers blood glucose, total leukocyte count, cholesterol, and blood pressure in humans. Proc Natl Acad Sci USA* 89:11533-37, 1992
16. Kriketos AD, Gan SK, Poynten AM, Furler SM, Chisholm DJ, Campbell LV: *Exercise increases adiponectin levels and insulin sensitivity in humans. Diabetes Care* 27:629-30, 2004
17. Shoji T, Nishizawa Y, Koyama H, Hagiwara S, Aratani H, Sasao K, Kishimoto H, Tanishita H, Morii H: *High-density-lipoprotein metabolism during a very-low-calorie diet. Am J Clin Nutr* 56(suppl 1):S297-8, 1992
18. Shimokawa I, Higami Y, Tsuchiya T, Otani H, Komatsu T, Chiba T, Yamaza H: *Life span extension by reduction of the growth hormone-insulin-like growth factor-1 axis: relation to caloric restriction. FASEB J* 17:1108-9, 2003
19. Kim JH, Sen S, Avery CS, Simpson E, Chandler P, Nishina PM, Churchill GA, Naggert JK: *Genetic analysis of a new mouse model for non-insulin-dependent diabetes. Genomics* 74:273-86, 2001
20. 이상달 정원훈, 성운영, 이혜성, 이근복, 김희연, 양승돈: 새로운 당뇨병모델동물인 TallyHo 마우스의 생리적인 특성. *당뇨병* 28:177-86, 2004
21. Kim JH, Stewart TP, Soltani-Bejnood M, Wang L, Fortuna JM, Mostafa OA, Moustaid-Moussa N, Shoieb AM, McEntee MF, Wang Y, Bechtel L, Naggert JK: *Phenotypic characterization of polygenic type 2 diabetes in TALLYHO/JngJ mice. J Endocrinol* 191:437-46, 2006
22. Sung YY, Lee YS, Jung WH, Kim HY, Cheon HG, Yang SD, Rhee SD: *Glucose intolerance in young TallyHo mice is induced by leptin-mediated inhibition of insulin secretion. Biochem Biophys Res Commun* 338:1779-87, 2005
23. Didion SP, Lynch CM, Faraci FM: *Cerebral vascular dysfunction in TallyHo mice: a new model of Type II diabetes. Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H1579-83, 2007
24. Martins IJ, Tran JM, Redgrave TG: *Food restriction normalizes chylomicron remnant metabolism in murine models of obesity as assessed by a novel stable isotope breath test. J Nut.* 132:176-81, 2002
25. Ahima RS, Flier JS: *Leptin. Annu Rev Physiol* 62:413-37, 2000
26. Zhang Y, Guo KY, Diaz PA, Heo M, Leibel RL: *Determinants of leptin gene expression in fat depots of lean mice. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282:R226-34, 2002
27. Villafuerte BC, Fine JB, Bai Y, Zhao W, Fleming S, DiGirolamo M: *Expressions of leptin and insulin-like growth factor-I are highly correlated and region-specific in adipose tissue of growing rats. Obes Res* 8:646-55, 2000
28. Brochu M, Tchernof A, Turner AN, Ades PA, Poehlman ET: *Is there a threshold of visceral fat loss that improves the metabolic profile in obese postmenopausal women? Metabolism* 52:599-604, 2003

29. Okauchi N, Mizuno A, Yoshimoto S, Zhu M, Sano T, Shima K: *Is caloric restriction effective in preventing diabetes mellitus in the Otsuka Long Evans Tokushima fatty rat, a model of spontaneous non-insulin-dependent diabetes mellitus?* *Diabetes Res Clin Pract* 27:97-106, 1995
30. Kawashiri MA, Rader DJ: *Gene therapy for lipid disorders.* *Curr Control Trials Cardiovasc Med* 1:120-7, 2000
31. Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC, Forman BM: *Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR.* *Mol Cell* 3:543-55, 1999
32. Chisholm JW, Hong J, Mills SA, Lawn RM: *The LXR ligand T0901317 induces severe lipogenesis in the db/db diabetic mouse.* *J Lipid Res* 44:2039-48, 2006
33. Zeinoaldini S, Swarts JJ, Van de Heijning BJ: *Chronic leptin infusion advances, and immuno-neutralization of leptin postpones puberty onset in normally fed and feed restricted female rats.* *Peptides* 27:1652-58, 2006
34. Pi-Sunyer FX: *Weight and non-insulin-dependent diabetes mellitus.* *Am J Clin Nutr* 63(suppl 3):S426-9, 1996
35. Ruderman N, Chisholm D, Pi-Sunyer X, Schneider S: *The metabolically obese, normal-weight individual revisited.* *Diabetes* 47:699-713, 1998
36. Morton NM, Holmes MC, Fievet C, Staels B, Tailleux A, Mullins JJ, Seckl JR: *Improved lipid and lipoprotein profile, hepatic insulin sensitivity, and glucose tolerance in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 null mice.* *J Biol Chem* 276: 41293-300, 2001
37. Peeke PM, Chrousos GP: *Hypercortisolism and obesity.* *Ann N Y Acad Sci* 771:665-76, 1995