

OLETF 쥐에서 식이제한이 간의 PGC-1 (PPAR γ -coactivator 1)과 PPARs (Peroxisome proliferator-activated receptors) mRNA 발현에 미치는 영향

조선대학교 의과대학 내과학교실, 생화학교실¹

김상용 · 김진화 · 배학연 · 이병래¹

Effects of Caloric Restriction on the Expression of PGC-1 and PPARs mRNA in Liver of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty Rats

Sang-Yong Kim, Jin-Hwa Kim, Hak-Yeon Bae, Byoung-Rai Lee¹

Division of Endocrinology, Department of Internal Medicine,
Department of Biochemistry¹, College of Medicine, Chosun University

- Abstract -

Background: Gluconeogenesis is strongly stimulated during fasting and is aberrantly activated in diabetes mellitus. PPAR γ -coactivator 1 (PGC-1) and Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) costimulate the expression of key enzymes of gluconeogenetic pathway. This study was performed to evaluate the response to dietary caloric restriction (CR) on the PPARs and PGC-1 expression in liver of diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats.

Methods: Diabetic OLETF rats (male, 24 weeks) and Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) rats (male, 24 weeks) were used in this study. Liver PPARs and PGC-1 mRNA, and blood glucose levels were investigated at 1, 2, and 3 weeks after the beginning of 30% CR. PPARs and PGC-1 mRNA were determined by RT-PCR and blood glucose levels were measured by spectrophotometric assay.

Results: The liver PGC-1 mRNA expressions were increased to 19% in non-diabetic LETO rats but significant change was not observed in diabetic OLETF rats by 30% CR. The liver PPAR γ mRNA expressions were not changed in non-diabetic LETO rats but increased to 23% in diabetic OLETF rats by 30% CR. The difference of PPAR α and PPAR β mRNA expressions in liver of OLETF and LETO rats were not observed.

Conclusion: The liver PPAR γ and PGC-1 expression response to CR are altered in OLETF rats compared to in LETO rats. These findings suggested that PPAR γ and PGC-1 expression control system altered in diabetic OLETF rat liver and altered PPAR γ and PGC-1 expression may some roles on the aberrantly activated gluconeogenesis in diabetes mellitus. (**J Kor Diabetes Assoc 30:161~169, 2006**)

Key Words: Caloric restriction, OLETF rats, PGC-1, PPAR γ

서 론

포도당 대사의 항상성 (homeostasis)은 인체의 건강을 유지하는 근본이며, 혈중 포도당 농도는 말초조직에서의 포도

당 흡수와 간에서의 포도당 합성을 통하여 균형을 유지하게 된다. 간에서 포도당이 합성되는 과정은 두 가지 다른 경로를 통하여 이루어진다. 첫 번째는 공복 기간이 짧을 때 일어나는 글리코겐분해이며 두 번째는 공복 기간이 길어

접수일자: 2006년 2월 6일, 통과일자: 2006년 5월 25일, 책임저자: 배학연, 조선대학교 의과대학 내과학교실

* 본 연구는 2003년도 조선대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

질 때 일어나는 포도당신합성 (gluconeogenesis)으로 유산 (lactate), 피루브산 (pyruvate), 글리세롤 (glycerol), 알라닌 (alanine) 등과 같은 전구체에서 de novo 당 합성이 일어난다.

제1형 당뇨병과 제2형 당뇨병 모두에서 간의 포도당신합성은 공복혈당의 증가 및 식후혈당의 증가에 있어서 많은 부분을 기여하는 것으로 알려져 있다. 이중 포도당신합성에 관여하는 인자로 최근 Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ coactivator-1 (PGC-1)에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. PGC-1은 처음에는 PPAR γ 의 보조활성인자로 알려졌다¹⁾ 현재는 PPAR α ²⁾, GR³⁾, RXR α ⁴⁾, ER⁵⁾, Liver X Receptor (LXR) α ⁶⁾를 포함하는 많은 다른 핵 수용체의 보조 활성인자로 알려져 있다. 당뇨병에서 PGC-1의 당섭취와 대사에 대한 효과는 미토콘드리아 산화의 비율이 당 섭취에 영향을 주기 때문에 중요하다⁷⁾. PGC-1은 골격근 세포에서 미토콘드리아 생합성에 영향을 줄 뿐만 아니라 인슐린에 민감한 당수송체 (GLUT-4)의 유전자 표현을 증가시켜 당 섭취를 증가시킨다⁸⁾. 여러 당뇨병 모델의 실험동물에서의 연구를 보면 스트랩토조토신을 주입한 제1형 당뇨병의 모형인 쥐의 간에서 PGC-1의 발현은 증가되어 있으며 인슐린 수치가 높고 심각한 인슐린 저항성을 보이는 제2형 당뇨병 모델인 ob/ob 쥐에서도 PGC-1의 발현은 증가되어 있다⁹⁾. 또한 인슐린 수용체에 대해 간 - 특이적인 돌이변이를 가진 LIPKO 쥐에서도 PGC-1의 발현은 증가되어 있다¹⁰⁾. 그러므로 인슐린은 간에서 PGC-1의 발현을 억제하는 역할을 하고 있다는 것을 알 수 있다.

식이제한 (caloric restriction)은 수명을 연장시키는 유일한 비유전적인 방법으로 알려져 있으며 자유기 (free radical)와 당화 (glycation)를 감소시키고 T 세포 매개성 면역기능을 향상시키는 것으로 보고되어 있다¹¹⁾. 또한 영양류에서 식이제한은 내장비만을 감소시키고 공복혈당, 인슐린, 콜레스테롤 등을 감소시키는 것으로 보고되었다¹²⁾. 당뇨병 치료에 있어서 식이제한은 혈당상태를 안정화시키고 제2형 당뇨병의 발생을 지연시키는 효과가 있다고 보고되었는데 이러한 효과는 식이제한이 인슐린 감수성을 증가시키고 췌장의 베타세포의 기능을 호전시키는 것에 기인하는 것으로 알려져 왔다¹³⁻¹⁵⁾. Park 등¹⁶⁾의 연구에 따르면 OLETF 쥐에서 식이제한에 따른 혈당상태와 인슐린 감수성의 개선은 지방조직 (adipose tissue)에서의 GLUT4 발현증가에 기인하며 골격근과 간에서의 GLUT4 발현에는 영향을 끼치지 않는 것으로 보고하였다. 또 다른 연구들에서는 식이제한이 간에서 여러 포도당 대사에 관여하는 해당성 효소 (glycolytic enzyme)와¹⁷⁾ 인슐린 전달체계의 유전자 발현 (insulin pathway gene expression)에 영향을 미치는 것으로 보고하였다¹⁸⁾.

이에 저자들은 비만형 제2형 당뇨병 모델인 OLETF 쥐에서 식이제한에 따른 간의 PPARs와 PGC-1의 발현을 측

정하여 식이제한을 통한 혈당개선과 인슐린감수성의 증가가 간의 PPARs와 PGC-1에 미치는 영향을 알아보고자 본 연구를 진행하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물

실험동물로는 생후 24주령의 LETO (Long Evans Tokushima Otsuka) 쥐와 제2형 당뇨병 모델인 OLETF (Otsuka Long Evans Tokushima fatty) 쥐를 각각 20마리씩 사용하였다. OLETF 쥐는 5주령에 일본 오츠카 제약회사 (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd, Tokushima, Japan)로부터 공급을 받았다.

2. 실험방법

OLETF 쥐는 생후 24주 경구당부하검사를 시행하여 최고 포도당 농도가 16.7 mmol/L 이상이고 2시간 포도당 농도가 11.1 mmol/L 이상인 경우 당뇨병의 발생을 확인하였다. 실험군은 LETO 쥐를 정상대조군으로, OLETF 쥐는 실험일까지 공복혈당이 8.3 mmol/L 이상으로 유지된 쥐를 당뇨군으로 정하였다. 실험 종료 시까지 온도 (22 \pm 2 $^{\circ}$ C)와 명암을 조절한 환경에서 사육되었으며 식이급여량을 30% 제한하여 공급하였다. 이후 시간경과에 따라 3일, 7일, 14일, 21일 후에 공복 시 체중과 혈당을 측정하고 각 군에서 5마리씩 희생시켜 간장을 적출하여 실험에 사용하였다.

3. RNA 분리

RNA 분리는 간조직에 TRI Regant (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 첨가하여 균질화하고, 0.2 mL chloroform을 첨가하여 잘 혼합한 후, 실온에서 15분간 방치한 후 4 $^{\circ}$ C에서 12,000 \times g로 15분간 원심분리하여 상층액을 수집하였다. 이후 수집액에 0.5 mL isopropanol을 첨가하여 혼합한 후, 실온에서 5~10분간 방치하고, 4 $^{\circ}$ C에서 12,000 \times g로 15분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 침전물에 1 mL 75% ethanol을 첨가하여 잘 혼합한 후 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 침전물을 건조시켜서 50 μ L의 0.1% DEPC 용액을 첨가하여 55~60 $^{\circ}$ C에서 용해시켜 RNA 시료로 사용하였다.

4. cDNA 합성 및 증합효소연쇄반응

역전사 반응은 random hexamer를 primer로 하여 역전사 효소 RAV-2 (TaKaRa Code No. 2610, Takara Bio Inc, Japan)을 이용하여 실시하였다. 즉 추출된 RNA 10 μ L에 primer 2 μ L를 넣어 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 방치한 후 5분 동

안 얼음에 보관하고 10,000 rpm에서 5초 동안 원심분리하여 반응액을 침전시켰다. 여기에 DEPC로 처리된 증류수 20 μ L, 5 \times PCR buffer 10 μ L, 0.1M dTT 5 μ L, 10 mM dNTP 2 μ L, RNAsin 1 μ L, reverse transcriptase 1 μ L를 넣고 37°C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 합성한 다음 이것을 4°C에 보관하였다.

PCR은 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 처리된 증류수 30.5 μ L, 10 \times PCR buffer 5 μ L, 25 mM MgCl₂ 6 μ L, 10 mM dNTPs 1 μ L, forward primer 1 μ L, reverse primer 1 μ L, cDNA template 5 μ L, Taq polymerase (5 U/ μ L) 0.5 μ L를 혼합하였다. PCR 조건은 denaturation과정으로 95°C에서 45초, annealing 과정으로 50°C에서 45초, 그리고 polymerization 과정으로 72°C에서 1분을 설정하여 30 cycle을 거친 다음 마지막으로 72°C에서 10분 동안 반응시킨 다음 -4°C에 보관하였다. PCR로 증폭된 산물을 확인하기 위하여 10 μ L의 PCR 산물을 2 μ L의 gel loading buffer (0.25% bromophenol blue tracking dye in 25% Ficoll)와 혼합하여 1.5% agarose gel에 loading한 후 100 V에서 30 분간 TAE buffer (0.04 M tris-acetate, 0.001 M EDTA)에서 mini-gel electrophoresis unit (MUPID-2)을 사용하여 전개하였다. 이상의 실험단계에서 얻어진 PCR 산물은 3% agarose gel에서 전기영동 한 후 ethidium bromide 용액으

로 염색하고 UV-transilluminator에서 나타난 DNA band를 사진 촬영하여 대조군과 실험군의 band의 밀도를 image analyzer (1D ver.2.1, pharmacia biotech, USA)로 측정하여 비교하였다.

실험에 사용되어진 PCR primer의 염기서열은 Table 1과 같다.

5. 혈당의 측정

혈당의 측정은 고형사료를 치우고 최소 8시간이 경과한 후 공복혈당을 오전 9시에 측정하였으며 hexokinase (HK)와 glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)를 사용하여 생화학 자동분석기 (Hitachi 717, Japan)를 이용하여 측정하였다.

6. 통계분석

결과는 평균 \pm 표준편차로 표기하였고, 통계분석은 Windows용 SPSS (Version 12.0; SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) 통계 프로그램을 이용하였다. 실험군 간 차이는 student's t-test와 ANOVA를 시행하여 검정하였다. 통계학적 유의성은 P값이 0.05 미만인 경우로 하였다.

Table 1. Primer Set

Genes	Sequence	
PGC-1	sense	5'-CACGCAGCCCTATTCATTGTTTCG-3'
	antisense	5'-GCTTCTCGTGCTCTTTGCGGTAT-3'
PPAR α	sense	5'-TTCGAAACTGCAGACCT-3'
	antisense	5'-TTAGGAAGTCTCGGGTGAT-3'
PPAR β	sense	5'-CAGACCTCTCCCAGAATT-3'
	antisense	5'-AAGCGGCAGTACTGACACTTG-3'
PPAR γ	sense	5'-TAGGTGTGATCTTAAGTGTTCG-3'
	antisense	5'-GCATGGTGTAGATGATCTCA-3'
GAPDH	sense	5'-CCCATCACCATCTTCCAGGAGCGAG-3'
	antisense	5'-TGCCAGTGAGCTTCCCGTTTCAGCTC-3'

Table 2. Blood Glucose Levels of Caloric-restricted LETO and OLETF Rats

Weeks	Blood glucose level (mg /100 mL)	
	LETO	OLETF
0	97.3 \pm 5.6	167.4 \pm 12.6
1	96.5 \pm 3.8	149.8 \pm 17.2
2	92.7 \pm 4.9	132.6 \pm 13.5*
3	94.6 \pm 6.2	126.8 \pm 16.2†

Data are means \pm SE, n = 5.

* : P < 0.05 vs. LETO group.

† : P < 0.01 vs. LETO group.

결 과

1. 식이제한에 따른 체중변화

체중은 에너지 섭취량과 에너지 소모량의 균형에 의해 유지되며 식이제한은 체중에 직접적인 영향을 미칠 수 있다. 본 실험에서 체중 512.50 ± 27.80 g인 LETO 쥐를 식이 급여량을 30% 제한하여 사육한 결과 21일 후 체중이 469.30 ± 19.70 g으로 실험시작 때의 체중에 비하여 8.4% 감소되었다 ($P < 0.01$) (Fig. 1). 또한 체중 562.80 ± 29.70 g인 OLETF 쥐는 식이 급여량을 30% 제한하여 사육한 결과 21일 후 체중이 501.40 ± 24.20 g으로 실험 시작 때의 체중에

비하여 10.9% 감소하였다 ($P < 0.01$) (Fig. 1).

2. 식이제한에 따른 혈당변화

LETO 쥐는 실험시작때 12시간 공복 후 혈당이 5.40 ± 0.31 mmol/L에서 21일 후 5.26 ± 0.34 mmol/L으로 식이 제한 전후의 차이는 없었으며 OLETF 쥐는 실험시작 때 12시간 공복 후 혈당이 9.30 ± 0.70 mmol/L에서 21일 후 7.04 ± 0.90 mmol/L로 38.2%의 감소를 보였다 ($P < 0.01$) (Table 2).

3. 식이제한이 PGC-1 mRNA 발현에 미치는 영향

식이제한을 시작하기 전의 PGC-1 mRNA 발현은

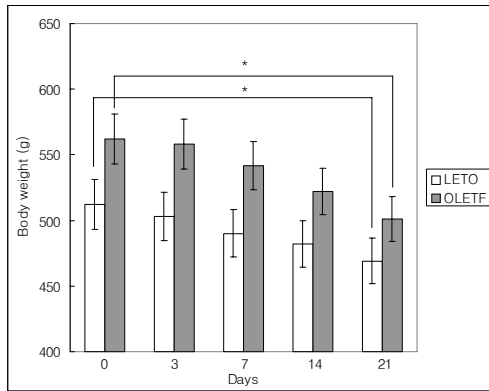


Fig. 1. Effects of caloric restriction on the body weight of LETO and OLETF rats.

Data are means \pm SEM.

* : $P < 0.01$.

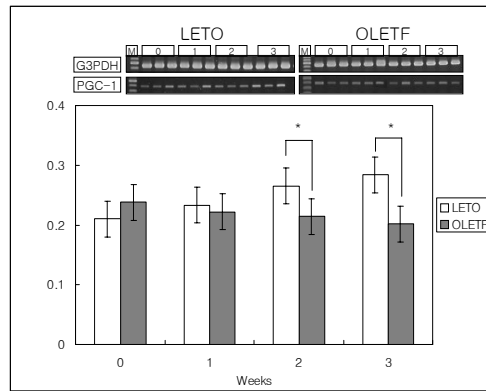


Fig. 2. mRNA levels of PGC-1 in whole liver homogenates from Caloric-restricted LETO and OLETF rats (FD). Data are the ratio of the target mRNA to PGC-1 mRNA. The top portion of each figure is a gel representative of $n = 3/\text{group}$.

Data are means \pm SEM.

* : $P < 0.01$.

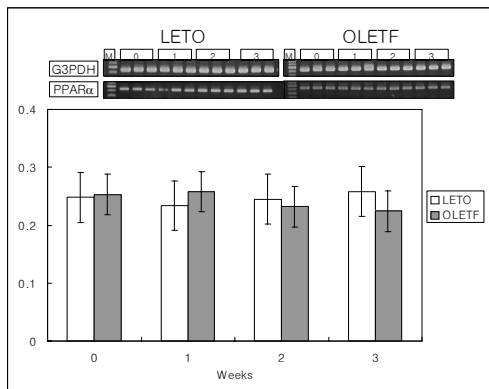


Fig. 3. mRNA levels of PPARα in whole liver homogenates from Caloric-restricted LETO and OLETF rats (FD). Data are the ratio of the target mRNA to PPARα mRNA. The top portion of each figure is a gel representative of $n = 3/\text{group}$.

Data are means \pm SEM.

* : $P < 0.05$.

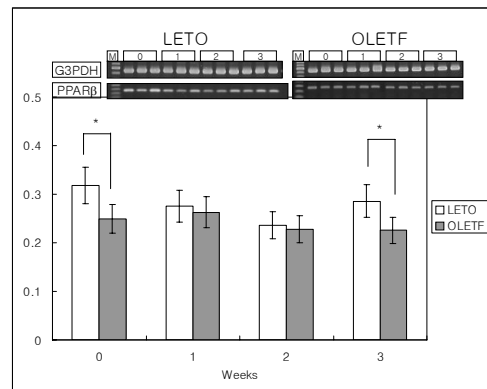


Fig. 4. mRNA levels of PPARβ in whole liver homogenates from Caloric-restricted LETO and OLETF rats (FD). Data are the ratio of the target mRNA to PPARβ mRNA. The top portion of each figure is a gel representative of $n = 3/\text{group}$.

Data are means \pm SEM.

* : $P < 0.05$.

OLETF군에서 LETO군에서보다 증가된 소견이 관찰되었으나 통계학적인 차이는 보이지 않았다. 식이제한 시행 3주 후 LETO군에서는 식이제한을 시작하기 전보다 간의 PGC-1 mRNA의 발현이 19% 증가되었으나 ($P < 0.01$), OLETF군에서는 식이제한을 시행하기 전과 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 2).

4. 식이제한이 PPAR α mRNA 발현에 미치는 영향

PPAR α mRNA 발현은 두 군 모두에서 식이제한에 따른 변화를 보이지 않았으며 양 군 간의 차이도 관찰되지 않았다 (Fig. 3).

5. 식이제한이 PPAR β mRNA 발현에 미치는 영향

식이제한을 시작하기 전의 PPAR β mRNA 발현은 LETO군에서 OLETF군에서보다 유의하게 증가된 소견이 관찰되었으나 ($P < 0.05$), 식이제한에 따른 변화는 관찰되지 않았으며, 식이제한 3주후에도 역시 LETO군에서 OLETF군에서보다 PPAR β mRNA 발현이 유의하게 증가된 소견이 관찰되었다 ($P < 0.05$) (Fig. 4).

6. 식이제한이 PPAR γ mRNA 발현에 미치는 영향

식이제한을 시작하기 전의 PPAR γ mRNA 발현은 LETO군에서 OLETF군에서보다 유의하게 증가된 소견이 관찰되었으나 ($P < 0.05$), LETO군에서는 식이제한에 따른 변화는 관찰되지 않았다. 반면에 OLETF군에서는 식이제한 시작 전 PPAR γ mRNA의 발현이 매우 감소되어 있는 소견을 보였으나 식이제한 3주째에는 23%의 증가를 보였다 ($P < 0.05$). 식이제한 3주째 측정된 PPAR γ mRNA의 발현은 두

군에서 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 5).

고 찰

식이섭취 제한은 비만한 당뇨병환자에서 체중 감소를 통하여 인슐린 감수성 및 혈당 조절을 향상시키며 여러 장기의 항산화효소의 활성도에 변화가 유발됨이 알려져 왔다. Rao 등¹⁹⁾은 생후 21개월 및 28개월 된 흰쥐에서 40%의 식이제한을 시행한 결과 간의 SOD, catalase 및 GSHPx 활성도가 증가되고 특히 catalase가 가장 큰 효소 활성도 증가를 나타낸다고 하였고, Xia 등²⁰⁾은 16개월 및 26개월된 흰쥐의 40% 식이제한 후 간 및 신장의 SOD, catalase 및 GSHPx 활성도가 모두 증가된다고 보고하였다. 당뇨병환자에서 체중 감소는 인슐린에 대한 반응성을 증가시켜 혈당 조절에 긍정적인 영향을 나타내는 것이 알려져 있다. Park 등의 연구에 따르면 흰쥐에서 100% 식이를 제한한 결과 체중이 2일 경과 후부터 감소하기 시작하여 7일째는 27%가 감소한다고 보고하였다²¹⁾. 영양결핍이 없는 30%의 식이제한이 제2형 당뇨병환자나 동물모델에서 insulin-stimulated glucose uptake를 증가시켜 혈당조절을 용이하게 한다는 것은 잘 알려진 사실이다. Park 등¹⁶⁾의 연구에 따르면 제2형 당뇨병 모델인 OLETF 쥐에서 30%의 식이제한이 지방조직의 GLUT4 발현을 증가시킨다고 보고하였고 반면 간이나 골격근의 GLUT4 발현에는 영향을 미치지 않는다고 보고하였다. 이러한 결과는 제2형 당뇨병환자와 정상인 사이에서 골격근의 GLUT4 발현 정도에는 차이가 없다는 이전의 보고들과 일치하는 것이다. 따라서 간이나 골격근의 GLUT4 발현은 IGT나 제2형 당뇨병의 발생에 필수적인 것은 아니라고 사료된다. 그러나 또 다른 연구들에서는 식이제한이 간에서 여러 해당 효소 (glycolytic enzyme)와¹⁷⁾ insulin pathway gene expression¹⁸⁾, 그리고 insulin receptor signaling²²⁾에 영향을 미치는 것으로 보고하였다. 이러한 간에서의 당대사에 관여를 하는 물질 중 최근 PGC-1에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ coactivator-1 (PGC-1)는 처음에는 PPAR γ 의 보조활성인자로 알려졌다¹⁾ 현재는 PPAR α ²⁾, GR³⁾, RXR α ⁴⁾, ER⁵⁾, Liver X Receptor (LXR) α ⁶⁾를 포함하는 많은 다른 핵 수용체의 보조 활성인자로 알려지고 있다. PGC-1은 에너지 항상성, 체중 조절, 당대사에 관련된 여러 가지 생리적인 반응들에 관여하는 것으로 알려져 있다. PGC-1은 저체온 처리 시 brown fat과 muscle에 대량으로 발현되어지고, UCP-2 (uncoupling protein-2)의 발현유도 및 NRF 활성조절을 통해 미토콘드리아 복제 (biogenesis)를 증가시킬 것으로 보고되었다²³⁾. Lehman 등²³⁾과 Wu 등²⁴⁾은 PGC-1를 과량 발현한 mouse에서 mtDNA (mitochondrial DNA)의 함량이 증가됨을

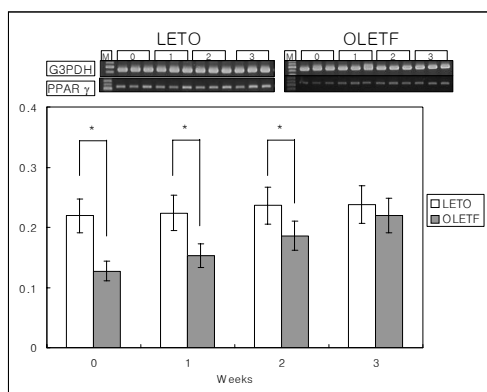


Fig. 5. mRNA levels of PPAR γ in whole liver homogenates from Caloric-restricted LETO and OLETF rats (FD). Data are the ratio of the target mRNA to PPAR γ mRNA. The top portion of each figure is a gel representative of $n = 3/\text{group}$.

Data are means \pm SEM.

* : $P < 0.05$.

보고하였다. 또한 인슐린저항성 치료제인 thiazolidinediones의 수용체이며 지방형성을 촉진시키는 PPAR- γ 와 결합하여 보조활성인자로 작용하여 PPAR- γ 의 전사활성을 증가시키며, 또한 미토콘드리아 내 지방산 베타산화 (fatty acid beta oxidation)에 관련된 유전자들의 전사활성을 조절하는 PPAR- α 의 보조활성인자이기도 하다. 이와 같이 PGC-1은 에너지항상성 유지에 중요한 역할을 할 뿐 아니라 근육에서는 GLUT4 (glucose transporter 4)의 발현을 조절하며²⁵⁾, 간에서는 포도당신합성에 관여하기도 한다⁹⁾. 공복 상태의 간에서 PGC-1의 발현은 증가한다^{9,26)}. PGC-1의 발현은 당 신생에 중요한 phosphoenolpyruvate carboxykinase, fructose-1, -6-bisphosphatase, glucose-6-phosphatase 유전자의 mRNA 발현을 유도하며 이들 유전자의 최대 유도는 공복 상태의 간에서 측정되는 PGC-1의 수준과 비슷하다⁹⁾. PGC-1은 당 신생의 전구체가 공급되었을 때 당을 분비하는 간세포의 능력을 3배 증가시킨다. ad libitum-fed 쥐에 PGC-1 아테노바 이러스를 투여하면 대조군의 공복 상태에서 보이는 정도의 PGC-1의 증가를 보이며 PEPCK와 glucose-6-phosphatase mRNA가 증가하고 혈당과 인슐린도 증가한다⁹⁾. 이런 결과들은 PGC-1이 생리적인 단백질 농도의 in vivo상에서 당 신생을 조절할 수 있다는 것을 시사한다.

여러 가지 동물모델들을 통한 연구에서도 PGC-1과 간의에서의 당대사와의 관계는 잘 나타나고 있다. 생쥐를 이용한 실험에서 금식을 시키면 간에서 PGC-1 유전자의 발현이 증가하고, 다시 음식 섭취를 시키면 발현이 감소하는 것으로 보아 당대사와 관련이 있음을 추측할 수 있다⁹⁾. Streptozotocin-induced mice나 ob/ob mice, liver-specific insulin-receptor KO mice같이 인슐린 작용이 결여되어 있거나^{9,10)} 또는 당 질코르티코이드 (glucocorticoid)나 cAMP와 같은 인슐린 길항호르몬의 자극에 의해서도 PGC-1 유전자의 발현이 증가하였다²⁷⁾. 또한 RNA interference를 이용하여 PGC-1 deficient mice를 만들었을 때에는 혈당이 감소하고 인슐린 감수성이 증가되는 것으로 보고되었다²⁸⁾.

본 연구에서는 제2형 당뇨병의 동물 모델인 OLETF 쥐에서 30%의 식이제한 후 간의 PPARs와 PGC-1 mRNA의 발현을 측정하여 식이제한에 따른 혈당개선과 인슐린감수성의 증가가 간의 PPARs와 PGC-1에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 그 결과 정상대조군인 LETO 쥐나 OLETF 쥐 모두에서 체중의 감소조건이 관찰되었으며 (8.4% vs. 10.9%), OLETF 쥐에서 실험시작 때의 혈당이 21일이 지난 후 38.2%의 감소를 보여 제2형 당뇨병모델인 OLETF 쥐에서 식이제한에 따른 혈당개선의 효과는 이전의 보고들과 일치하였다. 간에서의 PGC-1과 PPARs mRNA의 발현을 보면 공복시 PGC-1 mRNA 발현은 OLETF 쥐에서 LETO 쥐보다 증가되어 있는 조건을 보였으나 통계학적인 의미는 없었으며, 식이제한 3주 후 LETO 쥐에서는 실험시작 때와 비

교하여 19%의 발현 증가를 보였으나 OLETF 쥐에서는 식이제한에 따른 변화는 관찰되지 않았다. 또한 PPAR α 나 PPAR β mRNA의 발현도 역시 식이제한에 따른 변화는 보이지 않았다. PPAR γ mRNA의 발현은 실험시작 전 LETO 쥐에서 OLETF 쥐보다 유의하게 증가되어 있는 조건이 관찰되었으나 LETO 쥐에서는 식이제한에 따른 변화는 보이지 않았고 OLETF 쥐에서는 식이제한을 시행함에 따라 점차적으로 증가되어 식이제한 3주째는 LETO 쥐의 PPAR γ mRNA 발현정도와 거의 비슷한 정도에 이르렀다. LETO 쥐에서 식이제한에 따라 PGC-1 mRNA 발현이 점차 증가되는 이유는 다음과 같은 기전으로 추측해 볼 수 있겠다. 실험치류에서의 식이제한은 인슐린 신호체계 (insulin signaling)에 매우 극적인 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 식이제한은 인슐린과 인슐린양성장인자 (IGF-1)의 혈중농도를 감소시키고 이는 간에서 Akt의 인산화 저하와 근육에서 PI3K 발현의 저하, 그리고 FoxO (forkhead box "other")의 발현증가를 일으키고 이러한 증가된 FoxO의 발현이 PGC-1의 발현을 증가시키는 것으로 생각해 볼 수 있다^{29,30)}. 또한 공복시 증가된 글루카곤이 cAMP를 증가시켜 PKA (protein kinase A)의 활성화를 통하여 CREB (cAMP response element binding protein)를 활성화시킴으로써 PGC-1의 promoter의 CRE (cAMP response element)를 활성화 시킬 것으로 추측할 수 있다. 그러나 LETO 쥐에서와 달리 OLETF 쥐에서 PGC-1 mRNA의 발현이 혈당의 감소에도 불구하고 식이제한에 따른 변화를 보이지 않는 이유는 다른 여러 가지의 가능성을 생각해 볼 수 있겠다. 제2형 당뇨병 모델인 OLETF 쥐에서 식이제한에 따라 혈당이 감소하고 PPAR γ mRNA의 발현이 증가되는 것으로 보아 식이제한에 따른 인슐린 감수성의 개선이 PPAR γ 의 활동성을 증가시키며 제2형 당뇨병에서 보이는 비정상적인 혈당상태에 영향을 미친다고 생각해 볼 수 있다. 그러나 식이제한에 따른 PGC-1의 활성도는 큰 변화를 보이지 않아 식이제한에 따른 공복혈당의 감소가 간의 포도당신합성에 영향을 주는 것인가에 대하여서는 명확하지 않은 상태이다. Hagopian 등¹⁷⁾의 연구에 따르면 흰쥐에서 30% 정도의 식이제한이 혈당감소와 함께 여러 해당 작용 (glycolysis)에 관여하는 효소들인 glucokinase, pyruvate kinase, Phosphoglucose isomerase, Phosphoglycerate kinase, Phosphoglycerate mutase와 대사물질인 glucose-6-phosphate, pyruvate, lactate 등을 감소시킨다고 보고하였고 Zhu 등²²⁾은 흰쥐에서 40%의 식이제한이 간과 골격근에서 가령 (aging)에 따른 인슐린 수용체의 tyrosine phosphorylation의 감소를 극복할 수 있는 것으로 보고하였다. 그러나 Masternak 등¹⁸⁾의 연구에 따르면 정상 흰쥐에서 30%의 식이제한이 골격근에서는 insulin receptor와 insulin receptor substrate 1 (IRS1), IRS2, insulin like growth factor-1 (IGF-1)등의 mRNA 발현을 감소시키지만

간에서의 mRNA 발현에는 영향을 미치지 못한다고 보고하였다. Park 등¹⁶⁾의 연구에서도 제2형 당뇨병 모델인 OLETF 쥐에서 30%의 식이제한이 지방조직의 GLUT4 발현을 증가시킨다고 보고하였고 반면 간이나 골격근의 GLUT4 발현에는 영향을 미치지 않는다고 보고하였다. 이는 식이제한에 따른 여러 대사과정의 변화가 간과 골격근에서는 각각 다르게 작용하며 이를 통한 포도당의 대사도 각각 다르게 나타난다는 것을 시사한다. 그러나 이들 연구에서는 대부분 당뇨병 모델이 아닌 정상쥐를 이용한 연구로서 제2형 당뇨병이 발생한 이후에 이러한 식이제한에 따른 변화를 예측하기에는 어려움이 있다. 그에 비하여 본 연구에서는 제2형 비만형 당뇨병 모델인 OLETF 쥐에서 식이제한을 통한 PGC-1과 PPARs의 변화를 측정함으로써 이미 발생되어 있는 제2형 당뇨병에서 이러한 변화된 PGC-1과 PPAR γ mRNA의 발현이 비만형 제2형 당뇨병환자에서 비정상적으로 상승되어 있는 포도당신합성에 관여할 가능성을 제시하고 있다.

그러나 본 연구의 제한점으로 첫째 식이제한을 시행하지 않은 OLETF 쥐의 대조군이 없어 이러한 연구 결과가 단지 식이제한으로 인한 결과인지 가령 (aging) 등의 다른 인자가 관여된 것인지에 대해 명확하게 알 수 없으며, 둘째 연구기간이 비교적 짧은 3주간의 단기간으로 시행되어 장기간의 식이제한에 대한 영향을 판단하기 힘들며, 셋째 간 이외의 근육이나 지방조직에서의 PGC-1과 PPARs 활성화도 등을 측정하지 않아 식이제한에 따른 다른 장기에서의 변화를 관찰할 수가 없으며, 넷째 단면적인 연구의 특성상 혈당의 개선과 PGC-1과 PPARs 활성화도 등의 인자들 간의 인과관계를 설명할 수 없다는 점으로 사료된다.

결론적으로, 이상의 연구결과에 따르면 식이제한에 따른 PGC-1과 PPAR γ 의 mRNA 발현은 정상 대조군인 LETO 쥐와 당뇨병 모델군인 OLETF 쥐에서 서로 다르게 나타나며, 제2형 당뇨병모델인 OLETF 쥐에서의 PGC-1과 PPAR γ mRNA의 이상발현이 당뇨병의 병태생리 중의 하나인 증가된 포도당신합성에 관여할 것이라고 추측할 수 있겠다. 이러한 결과는 최근 사람에서도 PGC-1을 억제함으로써 이론적으로 당뇨병의 혈당 상태를 개선시킬 수 있을지에 대한 연구에 토대가 될 것으로 생각되며 추후 식이제한에 따른 골격근과 지방조직 등 간 이외의 장기에서의 PGC-1과 PPAR γ mRNA의 발현에 대한 연구와 식이제한에 따라 변화되는 인자들과 혈당개선 간의 인과관계에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 3주 이상의 장기간에 걸친 식이제한에 따른 변화에 대한 연구 등을 통하여 장기간의 식이제한이 이미 발생한 제2형 당뇨병에서 PGC-1과 PPARs의 발현에 어떠한 효과를 미치는지에 대한 연구가 시행되어야 할 것이다.

요 약

연구배경: 제1형 당뇨병과 제2형 당뇨병 모두에서 간의 포도당신합성은 공복혈당의 증가 및 식후혈당의 증가에 있어서 많은 부분을 기여하는 것으로 알려져 있다. 이중 포도당신합성에 관여하는 인자로 최근 Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ coactivator-1 (PGC-1)에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 저자들은 비만형 제2형 당뇨병 모델인 OLETF 쥐에서 식이제한에 따른 간의 PPARs와 PGC-1의 발현을 측정하여 식이제한을 통한 혈당 개선과 인슐린감수성의 증가가 간의 PPARs와 PGC-1에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

방법: LETO 쥐를 정상대조군으로, OLETF 쥐에서 경구 당부하검사를 시행하여 당뇨군으로 정하였으며 식이급여량을 30% 제한하여 3주간 공급하였다. 이후 매주 체중과 공복혈당을 측정하고 RT-PCR법을 이용하여 PGC-1 mRNA 발현과 PPARs mRNA 발현을 측정하였다.

결과: OLETF 쥐에서는 공복혈당이 21일 후 38.2%의 감소를 보여 제2형 당뇨병모델인 OLETF 쥐에서 식이제한에 따른 혈당개선의 효과가 현저하였다. 간에서의 PGC-1과 PPARs mRNA의 발현을 보면 공복시 PGC-1 mRNA 발현은 OLETF 쥐에서 LETO 쥐보다 증가되어 있는 소견을 보였으나 통계학적인 의의는 없었으며, 식이제한 3주 후에 LETO 쥐에서는 실험시작 때와 비교하여 19%의 발현 증가를 보였으나 OLETF 쥐에서는 식이제한에 따른 변화가 관찰되지 않았다. 또한 PPAR α 나 PPAR β mRNA의 발현도 역시 식이제한에 따른 변화는 보이지 않았다. PPAR γ mRNA의 발현은 실험시작 전 LETO 쥐에서 OLETF 쥐보다 유의하게 증가되어 있는 소견이 관찰되었으나 LETO 쥐에서는 식이제한에 따른 변화는 보이지 않았고 OLETF 쥐에서는 식이제한을 시행함에 따라 점차적으로 증가되어 식이제한 3주째는 LETO 쥐의 PPAR γ mRNA 발현정도와 거의 비슷한 정도에 이르렀다.

결론: 식이제한에 따른 PGC-1과 PPAR γ 의 mRNA 발현은 정상대조군인 LETO 쥐와 당뇨병모델군인 OLETF 쥐에서 서로 다르게 나타나며, 제2형 당뇨병모델인 OLETF 쥐에서의 이러한 변화된 PGC-1과 PPAR γ mRNA의 발현이 비만형 제2형 당뇨병환자에서 비정상적으로 상승되어 있는 포도당신합성에 관여할 가능성이 있는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM: A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell(Cambridge, Mass)* 92:829-39, 1998

2. Vega RB, huss JM, Kelly DP: *The coactivator PGC-1 cooperates with Peroxisome proliferator activated receptor α in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes.* *Mol Cell Biol* 20:1868-76, 2000
3. Knutti D, Kaul A, Kralli A: *A tissue-specific coactivator of steroid receptors, identified in a functional genetic screen.* *Mol Cell Biol* 20:2411-22, 2000
4. Delerive P, Wu Y, Burris TP, Chin WW, Suen CS: *PGC-1 function s as a transcriptional coactivator for the retinoid X receptors.* *J Biol Chem* 277:3913-7, 2000
5. Tcherepanova I, Puigserver P, Norris JD, Spiegelman BM, McDonnell DP: *Modulation of estrogen receptor- α transcriptional activity by the coactivator PGC-1.* *J Bilo Chem* 275:16302-8, 2000
6. Oberkofler H, Schraml E, Krempler F, Patsch W: *Potential of liver X receptpr transcriptional activity by peroxisome proliferatoractivated receptor γ coactivator-1 α .* *Biochem J* 371:89-96, 2003
7. Randle PJ, Priestman DA, Mistry SC, Halsall A: *Glucose fatty acid interactions and the regulation of glucose disposal.* *J Cell biochem* 55(Suppl):1-11, 1994
8. Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, Puigserver P, Adelmant G, Lehman JJ, Kelly Dp, Spiegelman BM: *Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscles by the transcriptional coactivator PGC-1.* *Proc Natl Acad Sci USA* 98:3820-5, 2001
9. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, Spiegelman BM: *Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1.* *Nature* 413:131-8, 2001
10. Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA, Kahn CR: *Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction.* *Mol Cell* 6(1):87-97, 2000
11. Feuers RJ, Casciano DA, Shaddock JG: *Modifications in regulation of intermediary metabolism by caloric restriction in rodents.* In Fishbein L, editors, *Biological effects of dietary restriction.* p. 198-206, Springer Verlag, Berlin. 1999
12. Hansen BC, Bodkin NL: *Primary prevention of diabetes mellitus by prevention of obesity in monkeys.* *Diabetes* 42:1809-14, 1993
13. 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
14. Kuwajima M, Kuroda I, Mizuno A, Murakami T, Shima K: *The preventive effect of caloric restriction and exercise training on the onset on NIDDM in a rat model.* *Nutr Res* 19:401-13, 1999
15. 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
16. Park SY, Choi GH, Choi HI, Ryu JW, 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
17. Hagopian K, Ramsey JJ, Weindruch R: *Influence of age and caloric restriction on liver glycolytic enzyme activities and metabolite concentrations in mice.* *Experiment Gerontol* 38:253-66, 2003
18. Masternak MM, Al-Regaiey KA, Rosario MM, Ortega VJ, Pacini JA, Bonkowski MS, Bartke A: *Effects of caloric restriction on insulin pathway gene expression in the skeletal muscle and liver of normal and long-lived GHR-KO mice.* *Experiment Gerontol* 40:679-84, 2005
19. Rao G, Xia E, Nadakavukaren MJ, Richardson A: *Effect of dietary restriction on the age dependant changes in the expression of antioxidant enzyme in rat liver.* *J Nutr* 120:602-9, 1990
20. Xia E, Rao G, Van RH, Heydari AR, Richardson A: *Activities of antioxidant enzymes in various tissues of male Fischer 344 rats are altered by food restriction.* *J Nutr* 125:195-201, 1995
21. Park PS, Koh CN, Park JY: *Effects of total dietary restriction on the contents of thiobarbituric acid -reactive substance and antioxidant enzymes in the liver and kidney of rats.* *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28:471-6, 1999
22. Zhu M, Cabo R, Anson RM, Ingram DK, Lane MA: *Caloric restriction modulates insulin receptor signaling in liver and skeletal muscle of rat.* *Nutrition* 21:378-88, 2005

23. Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP: *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. J Clin Invest* 106(7):847-56, 2000
24. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM: *Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1 Cell* 98(1):115-24, 1999
25. Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, Puigserver P, Adelmant G, Lehman JJ, Kelly DP, Spiegelman BM: *Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. Proc Natl Acad Sci USA* 98(7):3820-5, 2001
26. Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, Rudolph D, Schutz G, Yoon C, Puigserver P, Spiegelman BM, Montminy M: *CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. Nature* 413:179-83, 2001
27. Herzog B, Hall RK, Wang XL, Waltner-Law M, Granner DK: *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha, as a transcription amplifier, is not essential for basal and hormone-induced phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. Mol Endocrinol* 18:807-19, 2004
28. Koo SH, Satoh H, Herzig S, Lee CH, Hedrick S, Kulkarni R, Evans RM, Olefsky J, Montminy M: *PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR-alpha-dependent induction of TRB-3. Nat Med* 10:530-4, 2004
29. Al-Regaiey KA, Masternak MM, Bonkowski M, Sun L, Bartke A: *Long-lived growth hormone receptor knockout mice: interaction of reduced IGF-1/insulin signaling and caloric restriction. Endocrinology* 146:851-60, 2005
30. Tsuchiya T, Dhahbi JM, Cui X, Mote PL, Bartke A, Spindler SR: *Additive regulation of hepatic gene expression by dwarfism and caloric restriction. Physiol Genomics* 17:307-15, 2004