

알파-리포산이 HepG2 간세포에서 SREBP-1c 발현에 미치는 효과

계명대학교 의과대학 내과학교실, 경북대학교 의과대학 내과학교실¹

윤태승 · 민애경 · 김남경 · 김미경 · 조호찬 · 김혜순 · 황재석 · 류성열 · 박근규 · 이인규¹

Effects of Alpha-lipoic Acid on SREBP-1c Expression in HepG2 Cells

Tae Sung Yun, Ae Kyung Min, Nam Kyung Kim, Mi-Kyung Kim, Ho Chan Cho,
Hye Soon Kim, Jae-Seok Hwang, Seong-Yeol Ryu, Keun-Gyu Park, In-Kyu Lee¹

*Department of Internal Medicine, Keimyung University School of Medicine; and
Department of Internal Medicine, Kyungpook National University School of Medicine¹*

ABSTRACT

Background: Non-alcoholic fatty liver disease is common in patients with insulin resistance. Sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) is a member of a family of transcription factors that have been recognized as key regulators for lipid accumulation in the liver that activate enzymes involved in the fatty acid biosynthetic pathway. This study was designed to evaluate whether alpha-lipoic acid (ALA) inhibits insulin-stimulated SREBP-1c expression.

Methods: We investigated the effects of ALA on insulin-stimulated SREBP-1c expression in a human hepatoma cell line (HepG2 cells) using Northern and Western blot analysis. We also examined the effect of ALA on the promoter activity of the SREBP-1c gene to examine whether ALA can affect SREBP-1c expression at the transcriptional level. To discern the mechanism by which ALA inhibits SREBP-1c expression, we examined the role of AMP-activated protein kinase (AMPK).

Results: Insulin increased the expression of SREBP-1c mRNA and protein in HepG2 cells in a dose depended manner. Co-treatment with ALA inhibited the insulin increased SREBP-1c expression in a dose-dependent manner. ALA also inhibited insulin-stimulated activation of the SREBP-1c promoter activity, indicating that ALA inhibited SREBP-1c expression at the transcriptional level. ALA increased phosphorylation of AMPK in HepG2 cells. Inhibition of the AMPK activity by compound C markedly reversed the inhibitory effects of ALA for insulin-stimulated SREBP-1c expression. These results suggest that ALA-induced suppression of SREBP-1c expression is at least in part mediated via AMPK activation.

Conclusion: The present study suggests that ALA has an inhibitory effect on insulin-stimulated SREBP-1c expression. Therefore, further studies on the effects of ALA on hepatic steatosis in an animal model need to be performed. (J Kor Endocr Soc 23:27~34, 2008)

Key Words: alpha-lipoic acid, insulin resistance, non-alcoholic fatty liver disease, SREBP-1c

접수일자: 2007년 8월 2일

통과일자: 2007년 11월 13일

책임저자: 박근규, 계명대학교 의과대학 내과학교실

* 본 연구는 대한내분비학회 연구지원(2006년)으로 수행되었고 2006년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2006-003-E00133)

서 론

비알콜성 지방간질환은 알코올 섭취력은 거의 없지만 알코올성 지방간과 유사한 간조직 소견을 가지는 질환으로[1] 지방간에서부터 지방간염, 간경변증에 이르기까지 다양한 병변을 통칭하는 표현이다[2]. 비알콜성 지방간질환은 최근 여러 연구를 통하여 비만, 당뇨병, 고혈압, 지질대사이상 등을 포함하는 대사증후군과 관련이 있음이 입증되었고, 그 중에서도 비만이 중요한 원인 인자로 알려져 있다[3]. 비만으로 인한 고인슐린혈증은 비알콜성 지방간질환의 병태생리학적 발생기전의 원인으로 생각되고 비알콜성 지방간질환을 간에서 일어나는 대사증후군의 한 형태로 보는 견해가 우세하다[4,5]. 비알콜성 지방간질환의 발병시작은 중성지방 합성의 증가로 인해 세포 내 중성지방이 증가하는 것이 특징으로 인슐린은 간의 지방 생합성에 중요한 호르몬 중의 하나다. 고인슐린혈증으로 인한 간의 지방산합성은 지방산 생합성 경로에 중요한 효소인, acetyl-CoA carboxylase (ACC)와 fatty acid synthase (FAS) 유전자의 전사활성이 증가하여 일어나며[6] 이 과정에 sterol regulatory element binding protein (SREBPs)가 인슐린의 역할을 매개하는 중요한 전사 인자로 알려져 있다[7,8].

SREBPs는 지방산과 콜레스테롤의 생합성 경로에 관련되는 효소를 활성화하여 간에서 지방산과 콜레스테롤 합성을 조절하는 중요한 전사활성인자이다. SREBP에는 1a, 1c 및 2의 세 가지 종류가 있으며, SREBP-1a와 SREBP-1c는 주로 지방산 및 중성지방의 합성에 관여하고 SREBP-2는 콜레스테롤 대사에 관여하는 것으로 알려져 있다[9]. 간조직에서는 SREBP-1c의 발현이 우세하며[10] 간세포에서의 중성지방 합성과 관련된 FAS, ACC, stearyl-CoA desaturase, ATP citrate lyase, malic enzyme과 같은 유전자의 발현을 조절한다[11]. 인슐린저항성으로 인한 고인슐린혈증은 간의 SREBP-1c의 발현을 증가시킴으로써 지방산의 생합성을 증가시키고 결과적으로 간조직에 중성지방의 축적을 유발한다[12,13]. 이러한 인슐린 저항성과 간에서 중성지방의 축적에 대한 SREBP-1c의 역할은 동물실험을 통해서 증명되었다. 고도 비만과 인슐린 저항성의 특징인 ob/ob mice에서 지방간 병변이 관찰되고[14] ob/ob mice의 Srebp-1 유전자를 비활성화시켰을 때 간조직에 중성지방의 축적이 약 50% 정도 감소함을 보고한 연구를[15] 통해 SREBP-1c가 인슐린 저항성 동물 모델에서 지방간의 발생에 중요한 역할을 담당함을 알 수 있다.

알파-리포산(alpha-lipoic acid, ALA)은 metal chelating, 활성산소 제거, 내인성 항산화제 재생, 산화적 손상 복구의 기능을 가지고 있는 강력한 항산화 물질로서[16] 미토콘드리아 내에서 호흡 효소의 보조 인자로서 작용 한다[17]. 최근 Lee 등의 연구에서 알파-리포산이 Otuska Long Evans

Tokushima Fatty (OLETF) 쥐의 골격근에서 AMP-activated protein kinase (AMPK)를 활성화하여 인슐린 감수성을 증가시켰고 중성지방 축적을 감소시켰다고 보고하였다[18]. 따라서, 본 연구자들은 알파-리포산이 간조직에서도 AMPK를 활성화시키는지, 그리고 알파-리포산이 지방세포에서 SREBP-1c의 발현과 활성화에 어떠한 미치는지 영향을 살펴보고자 본 연구를 수행하였다.

대상 및 방법

1. 재료

SREBP-1c 항체는 BD Bioscience (San Jose, CA)에서 구입하였고 phospho-AMPK 항체는 Cell signaling Technology (Danvers, MA), actin 항체는 Sigma (Saint Louis, MD)에서 구입하였다. [α - 32 P]dCTP는 Amersham Biosciences (Little Chalfont, UK)에서 구입하였다. 실험에 사용된 인슐린은 Novo nordisk (Bagsvrd, Denmark)로부터, 알파-리포산은 Viatrix GmbH & Co. KG (Frankfurt, Germany)로부터 제공 받았다.

2. 세포 배양

사람 간암 세포주(human hepatoma cell line)인 HepG2 세포는 minimum essential medium (MEM) 배지에 항생제(antibiotics)와 fetal bovine serum (FBS)을 첨가하여 배양하였다. 세포는 일정한 습도를 유지하는 37°C 항온기에서 공기(95%)와 CO₂ (5%)의 혼합기체를 공급하면서 배양하고, 3~4일 마다 계대 배양하였다. HepG2 세포는 인슐린 처리하기 전 0.5% FBS가 첨가된 MEM 배지에서 24시간 동안 배양하여 세포들을 휴지기에 들어가게 하였다. 그리고 인슐린은 6시간 동안 농도 별로 처리하였고, 인슐린을 처리하기 18시간 전에 알파-리포산을 농도 별로 처리하고 각 실험에 필요한 조건을 주어 SREBP-1c의 발현을 확인하였다. 알파-리포산에 의한 p-AMPK의 발현은 농도 별로 확인하기 위해서 알파-리포산을 0.5, 1, 2 mmol/L로 24시간 동안 처리하였다.

3. 노던 블롯(Northern Blot) 분석

노던 블롯에 사용된 SREBP-1c에 대한 방사선 표지 소식은 [α - 32 P]2'-deoxycytidine 5'-triphosphate (dCTP)를 이용한 임의 프라이머 라벨링법(random primer DNA labelling kit system, Amersham, Arlington Heights, IL)으로 제작하였다. 방사선 표지 소식자는 NAP-5 Column (Pharmacia, Uppsala, Sweden)으로 정제하였다. 이후, 20 μ g의 RNA를 1% 포름알데하이드-아가로스 겔에 전기영동을 시행한 후 나일론 막으로 이동 시켰다. RNA가 이동된 나일론 막은 UV cross-linker를 사용하여 RNA를 나일론 막에 고정하였다. 이후 나일론 막을 방사선 표지 소식자와 함께 Express

Hyb™ 용액에서 24시간 동안 65°C에서 보합결합(hybridization)시킨 후 여러 차례 정해진 규척에 따라 세정을 시행하였다. 세정이 끝난 나일론 막은 -70°C에서 24~48시간 동안 X-ray 필름에 노출시킨 후 mRNA 발현을 밀도계측기(densitometer)를 이용하여 분석하였다.

4. 웨스턴 블롯(Western Blot) 분석

Hep G2 세포에 IPH 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 100 μM PMSF), 1 μg/mL 단백질 분해효소 억제제(Luepetin, Aprotinin), 1 mM DTT를 처리하여 단백질을 추출 하였다. 각 시료를 시료 완충액과 섞어 5분간 끓인 후 얼음 위에서 식혔다. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide 겔에서 전기영동 하여 단백질은 크기 별로 분리한 후 Immobilon-P transfermembrane (Milipore, Billerica)으로 이동시켰다. 차단 완충액(blocking buffer)으로 차단하고 SREBP-1c 항체 및 phospho-AMPK 항체로 4°C에서 16시간 반응시킨 후, horseradish peroxidase 가 표지된 이차 항체로 상온에서 2시간 반응시켰다. ECL plus (Amersham Biosciences)를 사용하여 단백질 발현을 확인하였다. Membrane을 actin 항체와 다시 반응시켜 일정한 양의 단백질을 사용하였는지 확인하였다.

5. Luciferase 활성 측정

인슐린과 알파-리포산이 SREBP-1c 전사 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Lipofectamin (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 HepG2 세포에 SREBP-1c promoter construct (300 ng/well)를 과발현시켰고 형질도입의 효율을 보정하기 위하여 pCMV-β-gal plasmid (200 ng/well)를 co-transfection 하였다. Human SREBP-1c promoter (-780+62)는 Dr. Tarling으로부터 제공 받아 사용하였다[19]. 형질도입 5시간 후에 0.5% FBS가 들어있는 배지로 교체를 해 준 후, 24시간 더 배양하였다. 이 후 세포를 PBS로 두 번 세척하고 100 μL의 reporter lysis buffer (Promega, WI, USA)를 이용하여 분해하였다. 4°C, 1200 rpm에서 10분 동

안 원심분리 후 20 uL의 상등액을 발광분석기(SIRUS Luminometer; Berthold, Pforzheim, Germany)를 사용하여 전사 활성을 측정하였다. β-galactosidase 활성은 상등 액 20 uL를 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 420 nM에서 측정하고 이 값을 luciferase 활성 수치를 보정하는데 사용하였다.

5. 통계학적인 처리

결과들은 평균 ± 표준오차로 표시하고, 변수의 분석들은 Duncan's test를 사용하였다. P값이 0.05 미만인 경우에 통계적으로 유의하다는 판정을 하였으며, 모든 실험은 독립적으로 3회 이상 실시하여 통계 처리를 하였다.

결 과

1. 인슐린이 SREBP-1c 발현에 미치는 영향

인슐린이 SREBP-1c mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 HepG2 세포에 인슐린을 용량 별로 처리하고 노던 블롯을 시행하였다. SREBP-1c mRNA의 발현은 인슐린의 용량을 50 nmol/L에서 200 nmol/L로 증가 시킴에 따라 현저히 증가하였다(Fig. 1A). 인슐린 투여가 SREBP-1c 단백질 발현과 활성형 SREBP-1c로 전환에 미치는 효과를 알아보기 위해 인슐린을 용량 별로 처리하고 SREBP 전구형과 활성형의 양을 웨스턴 블롯을 이용하여 측정하였다. 인슐린은 HepG2세포에서 전구형 및 활성형 SREBP-1c 단백질 발현을 용량-의존적으로 증가시켰다(Fig. 1B).

2. 알파-리포산이 SREBP-1c 발현에 미치는 효과

알파-리포산이 인슐린에 의해 증가된 SREBP-1c의 발현에 미치는 효과를 알아보기 위해 HepG2 세포에 알파-리포산을 농도 별로 18시간 전처리 후 100 nM 인슐린을 처리하고 SREBP-1c 단백질 발현 변화를 웨스턴 블롯을 통해 확인하였다. 알파-리포산을 0.5, 1, 2 및 4 mmol/L의 농도로 처리하였을 경우 인슐린에 의해 증가된 전구형 SREBP-1c의 단백질 발현이 용량-의존적으로 감소하였고, 활성형 SREBP-1c

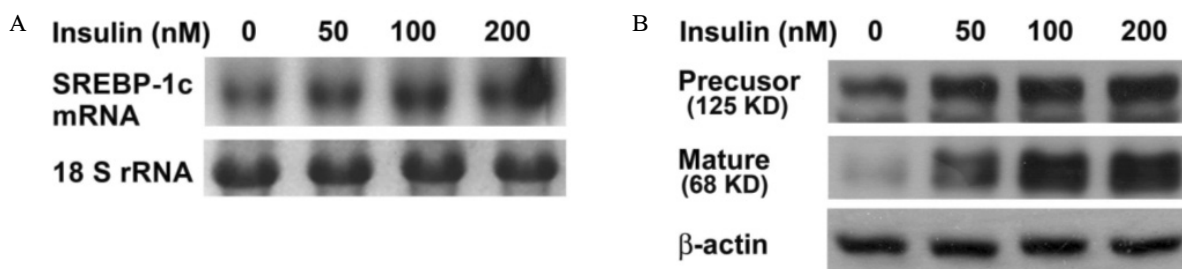


Fig. 1. Effects of insulin on SREBP-1c mRNA and protein expressions in HepG2 cells. A. Northern blot analysis of the effect of insulin on SREBP-1c mRNA expression in HepG2 cell. B. Western blot analysis of the effect of insulin on SREBP-1c protein expression in HepG2 cells. Cells were treated for 24 hours with 50, 100, 200 nmol/L of insulin. The protein levels were normalized by β-actin levels.

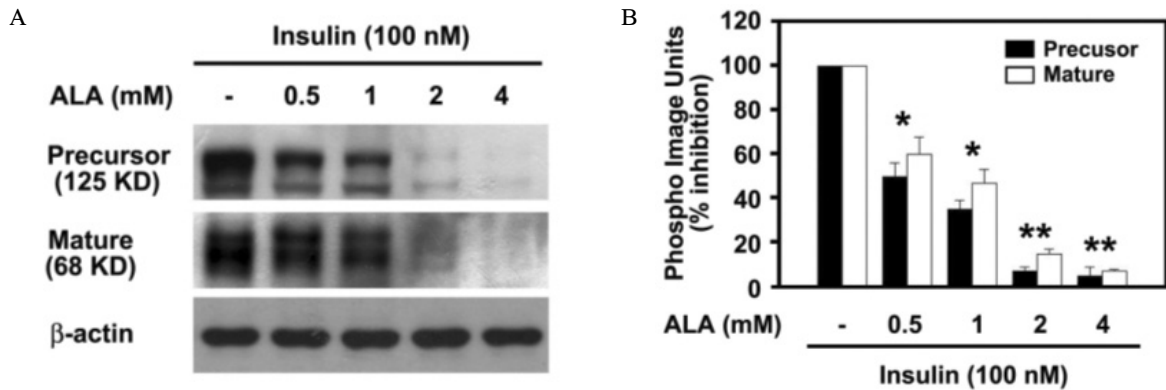


Fig. 2. Effect of ALA on insulin-stimulated SREBP-1c protein expression in HepG2 cells. A. Western blot analysis of the effect of ALA on insulin-stimulated SREBP-1c protein expression. HepG2 cells were treated with 100 nmol/L insulin for 6 h, with or without pretreatment with the indicated dosages of ALA for 24 h. The protein levels were normalized by β -actin levels. B. Quantification of data expressed as mean \pm SEM of three separate measurements. Statistical significance was determined as * P < 0.01, and ** P < 0.001 compared with insulin alone.

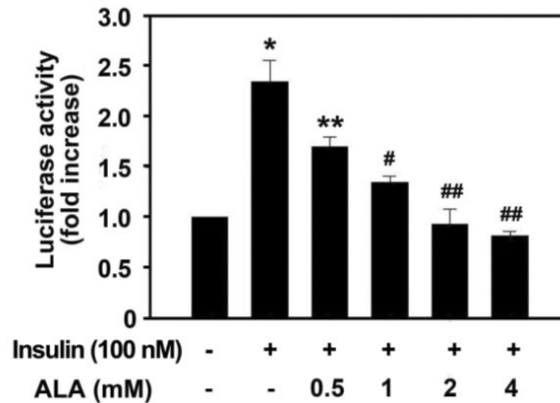


Fig. 3. Effect of ALA on insulin-stimulated SREBP-1c promoter activity. HepG2 cells were transfected with a SREBP-1c-promoter-luciferase construct (300 ng/well) and then stimulated with 100 nmol/L insulin for 6 h, with or without pretreatment with the indicated dosages of ALA for 24 h. Data are presented as the mean \pm SEM of three separate measurements. Statistical significance was determined as * P < 0.001 compared with control, ** P < 0.05, # P < 0.01, ## P < 0.001 compared with insulin alone.

단백질의 발현도 알파-리포산에 의해 용량의존적으로 감소하였다(Fig. 2).

3. 알파-리포산이 SREBP-1c 전사 활성에 미치는 효과

알파-리포산이 SREBP-1c의 발현을 억제하는 효과가 전사 수준에서 일어나는지를 알아보기 위하여 luciferase assay를 통해 HepG2세포에 human SREBP-1c 전사조절부위(promoter)를 발현시키고 인슐린 단독 혹은 인슐린과 알파-리포산의 동시 처리가 SREBP-1c촉진자의 활성도에 미치는 효과를 측정 하였다. 인슐린(100 nmol/L)은 SREBP-1c 촉진자의 활성을 현저히 증가시켰고, 알파-리포산을 0.5, 1, 2, 및 4 mmol/L로 처리할 경우 인슐린에 의하여 증가된 SREBP-1c 전사 활성이 용량의존적으로 억제되었다(Fig. 3).

4. 알파-리포산이 AMPK 활성화에 미치는 효과

다음으로 알파-리포산이 간세포에서 AMPK를 활성화시키는지를 알아보기 위하여 HepG2 세포에 알파-리포산을 용량 별로 처리하고 AMPK의 인산화를 측정하였다. 알파-리포산 처리에 의해 전체 AMPK 발현은 변화가 없었으나, AMPK의 인산화는 용량의존적으로 증가하였다(Fig. 4).

5. AMPK 억제제가 알파-리포산에 의한 SREBP-1c 억제효과에 미치는 효과

마지막으로 인슐린에 의해 증가된 SREBP-1c 단백질 발현을 억제하는 알파-리포산에 대한 효과가 AMPK를 통해 이루어지는 지를 알아보기 위해 AMPK 억제제인 compound C를 처리하여 SREBP-1c 단백질 발현의 변화를 웨스턴 블롯으로 측정하였다. 알파-리포산은 인슐린에 의해 증가된

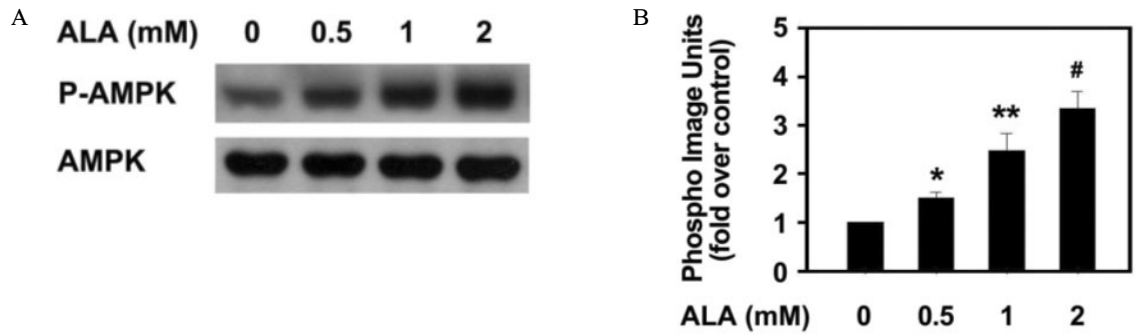


Fig. 4. Effect of ALA on phosphorylation of AMPK in HepG2 cells. A. Western blot analysis of the effect of ALA on AMPK phosphorylation. HepG2 cells were treated with 0.5, 1, 2 mmol/L ALA. The levels of AMPK phosphorylation were normalized by total AMPK protein levels. B. Quantification of data expressed as mean \pm SEM of three separate measurements. Statistical significance was determined as * P < 0.05, ** P < 0.01 and # P < 0.001 compared with basal expression.

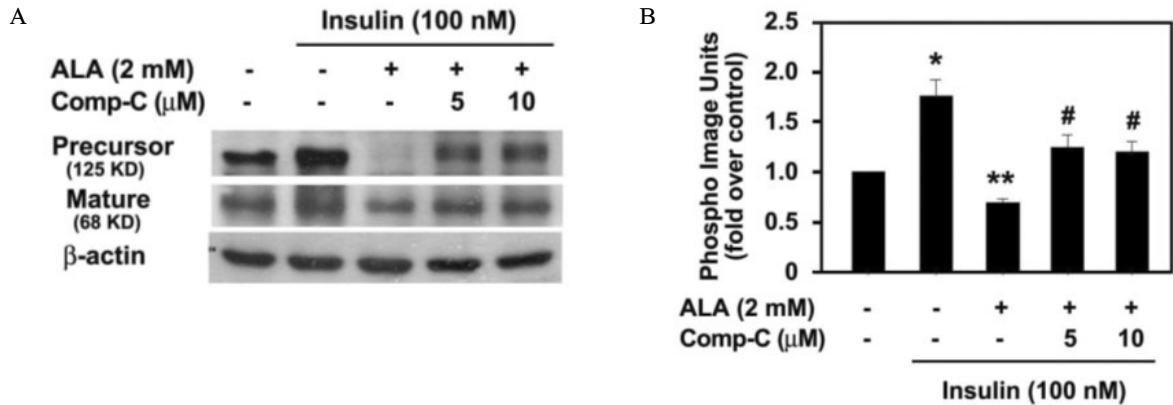


Fig 5. Effect of Compound C on ALA inhibition of insulin-stimulated SREBP-1c protein expression. A. Western blot analysis of the effect of compound C on ALA inhibition of insulin-stimulated SREBP-1c protein expression. HepG2 cells were treated with 100 nmol/L insulin for 6 h, without or with 5, 10 uM of compound C. B. Quantification of data expressed as mean \pm SEM of three separate measurements. Statistical significance was determined as * P < 0.001 compared with control, ** P < 0.001, # P < 0.01 compared with insulin alone.

SREBP-1c 단백질 발현을 억제하였고 compound C를 5, 10 uM 처리하였을 때 알파-리포산에 의해 억제된 SREBP-1c 단백질 발현이 약 50% 정도 회복되었다(Fig. 5).

고 찰

비알코올성 지방간질환은 간에서 발현되는 대사증후군의 한 형태이다[3]. 인슐린 저항성에 의한 고인슐린혈증은 간조직에서 SREBP-1c를 활성화시키고 지방 합성에 중요 효소인 FAS, ACC 및 SCD 등의 발현을 증가시켜 지방 축적을 유발한다[11]. 최근 여러 연구에서 세포 내 에너지 항상성을 조절하는 AMPK가 간조직에서의 지방대사에 중요한 역할을 수행 함이 보고되었다[20]. AMPK는 세포의 에너지 수준을 감지하는 역할을 하는 이질이합체로 세포 내 AMP가 증가되면 활성화되어 지방산의 β -산화를 자극하고 지방생성을 억제한다[21]. AMPK가 인산화되면 지방합성기전에 관

여하는 ACC와 같은 효소들이 비 활성화되어 간의 지방산합성이 감소하게 된다. 또한 인산화된 AMPK는 SREBP-1c의 발현을 억제하여 SREBP-1c의 표적 유전자로 알려진 FAS, L-type pyruvate kinase (LPK) 등의 발현을 감소시킨다. 경구용 혈당강화제인 metformin과 thiazolidinedione 계열의 약물인 pioglitazone과 rosiglitazone이 간세포에서 AMPK를 활성화시켜 SREBP-1c 발현을 감소시킬 뿐만 아니라, SREBP-1c의 표적 유전자를 감소시켜 간에서의 지방합성을 억제함이 보고되었다[22~25]. 따라서 본 연구자들은 간세포에서 알파-리포산이 AMPK를 활성화시키는지와 AMPK 활성을 통해 SREBP-1c의 발현을 억제시키는지를 알아 보았다.

알파-리포산은 자연적으로 발생하는 short-chain 지방산으로 두 개의 sulfur 분자를 가지고 있으며 강력한 항산화 효과가 있다. 또한, 알파-리포산은 미토콘드리아의 호흡 효소의 중요한 보조인자로 작용함으로써 미토콘드리아의 기능을 향상시킨다[16,17]. 최근 Lee 등은 비만 쥐의 혈관 내피

세포에서 AMPK 활성의 감소가 혈관내피 세포의 기능 이상을 발생시키는데 중요한 역할을 하며 알파-리포산을 처리하였을 때 혈관내피 세포의 AMPK를 활성화시킴으로써 혈관 기능 이상을 개선시킬 수 있다고 보고하였다[26]. 또한 근육 세포에서 알파-리포산이 AMPK를 활성화시켜 인슐린 감수성을 개선시키고, 중성지방 축적을 감소시킨다고 보고하였다[18]. 본 연구결과 사람의 간암세포주인 HepG2 세포에 알파-리포산을 처리할 경우 용량의존적으로 AMPK의 인산화가 증가됨을 확인함으로써 알파-리포산이 간조직에서도 AMPK의 활성화시킬 수 있음을 알 수 있었다. 또한 compound C로 AMPK의 활성을 억제하였을 경우 알파-리포산에 의해 억제된 SREBP-1c의 발현이 의미 있게 회복되어 알파-리포산이 인슐린에 의해 증가된 SREBP-1c 발현을 억제하는 기전에 AMPK의 활성화가 관여함을 알 수 있었다.

SREBP family는 구조적으로 basic helix-loop-helix (bHLH) 형태를 가진 지방 분화에 관여하는 전사인자로서, 이들 중 SREBP-1c 단백질은 소포체(endoplasmic reticulum)의 막에 비활성화된 상태로 결합되어 있다가 콜레스테롤의 결핍이나 인슐린에 의해 SREBP cleavage-activation protein (SCAP)이 활성화되면 SREBP-1c는 골지체로 이동하게 되며, 이후에 Site 1 Protease (S1P)와 Site 2 Protease (S2P)에 의해 분해되어 활성형이 핵으로 이동하여 SREBP-1c의 표적 유전자의 발현을 유도한다[11]. 스트렙토조토신(streptozotocin)으로 당뇨병을 유발한 쥐 모델에서 SREBP-1c mRNA가 감소하고 인슐린을 주입하였을 때 증가한다고 보고되었고[27] 이러한 생리학적 변화는 일차 배양한 쥐의 간세포에서 인슐린이 SREBP-1c의 유전자의 전사 활성의 증가를 통하여 일어남이 증명되었다[13,28,29]. 본 연구자는 HepG2 세포에 인슐린을 처리한 후 SREBP-1c의 발현을 관찰하였는데, 인슐린에 의해 SREBP-1c 전사조절부위의 활성화와 SREBP-1c mRNA, 전구형 및 활성형 단백질의 발현이 모두 증가함을 관찰하였다. 또한 알파-리포산은 인슐린에 의해 증가된 SREBP-1c의 발현을 억제하였고 전구형 SREBP-1c 단백질에서 활성형 SREBP-1c 단백질로의 전환을 억제함을 관찰하였다. 알파-리포산은 인슐린에 의해 증가된 SREBP-1c 전사조절부위의 활성을 억제하였는데 이러한 결과는 알파-리포산의 SREBP-1c 발현 억제 효과는 SREBP-1c의 전사활성을 억제함으로써 일어남을 보여 준다.

이상의 결과를 요약하면, 인슐린은 HepG2세포에서 SREBP-1c의 mRNA와 전구형 단백질 및 활성형 단백질 발현을 증가시켰고, 알파-리포산은 인슐린에 의하여 증가된 SREBP-1c 전사 촉진자 활성화와 총 단백질 및 활성형 단백질의 발현을 억제하였다. 알파-리포산이 SREBP-1c의 발현 억제 기전에는 AMPK의 활성화가 부분적으로 관여할 것으로 사료된다. 따라서, 알파-리포산이 SREBP-1의 발현 억제

전에 AMPK 활성 이외의 다른 기전이 있는 지에 대한 실험이 필요할 것으로 생각되며 또한 동물실험을 통해 알파-리포산이 지방간의 발생을 예방할 수 있는지를 알아보고 나아가 인슐린 저항성을 가진 지방간 환자를 대상으로 알파-리포산이 지방간의 치료에 유용한 지를 알아보는 임상 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

연구배경: 비알콜성 지방간은 인슐린 저항성이 있는 환자에서 흔히 발생 하는 간질환이다. SREBP-1c는 지방산의 생합성에 관여하는 효소를 활성화시켜서 간 내 지방 축적을 일으키는 중요한 전사조절인자이다. 본 연구는 알파-리포산이 간세포에서 인슐린에 의해 증가된 SREBP-1c 발현에 미치는 영향을 알아 보고자 하였다.

방법: 간세포로 human hepatoma cell line인 HepG2 세포를 사용하였다. 인슐린과 알파-리포산이 SREBP-1c 발현에 미치는 영향을 노던 블롯과 웨스턴 블롯으로 확인하였다. SREBP-1c 전사조절부위(promoter)활성 분석을 통해 알파-리포산이 SREBP-1c의 전사조절에 관여하는지 알아보았다. 알파-리포산이 AMPK 활성화에 미치는 효과는 AMPK의 인산화로 평가하였으며 AMPK 억제제인 compound C를 이용하여 알파-리포산의 억제효과가 AMPK를 통해 이루어지는지 알아보았다.

결과: 인슐린은 용량-의존적으로 HepG2 세포에서 SREBP-1c mRNA 및 단백질 발현을 증가시켰다. 알파-리포산은 인슐린에 의해 증가된 SREBP-1c의 발현을 억제하였다. 알파-리포산은 인슐린에 의해 증가된 SREBP-1c 전사촉진자의 활성을 억제하였다. 알파-리포산은 HepG2 세포에서 AMPK의 인산화를 증가시켰다. AMPK 활성 억제제인 compound C는 알파-리포산에 의한 SREBP-1c 발현 억제효과를 의미 있게 회복시켰다.

결론: 알파-리포산은 HepG2 세포에서 인슐린에 의해 증가된 SREBP-1c의 발현을 효과적으로 억제함을 알 수 있었다. 향후 알파-리포산이 고인슐린혈증에 의한 지방간의 발생에 대한 효과가 있는지에 대한 동물 및 임상실험이 추가적으로 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM: Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 122:1649-1657, 2002
2. Angulo P: Nonalcoholic Fatty liver disease. *N Eng J Med* 346:1221-1231, 2002
3. Marceau P, Biron S, Hould FS, Marceau S, Simard S, Thung SN, Kral JG: Liver pathology and the

- metabolic syndrome X in severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1513-1517, 1999
4. Kim TH, Yoo K: Obesity and Fatty liver disease. *Korean J Intern Med* 68:347-349, 2005
5. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlain G, Melchionda N: Nonalcoholic fatty liver disease; a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 50:1844-1850, 2001
6. Hillgartner FB, Salati LM, Goodridge AG: Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthase. *Physiol Rev* 75:47-76, 1995
7. Horton JD, Bashmakov Y, Shimomura I, Shimano H: Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:5987-5992, 1998
8. Foretz M, Pacot C, Dugail I, Lemarchand P, Guichard C, Lie'pvre XL, Berthelie-Lubrano C, Spiegelman B, Kim JB, Ferre P, Foulle F: ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Mol Cell Biol* 19:3760-3768, 1999
9. Brown MS, Goldstein JL: The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89:331-340, 1997
10. Shimomura I, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS: Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest* 99:838-845, 1997
11. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS: SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 109:1125-1131, 2002
12. Shimomura I, Bashmakov Y, Horton JD: Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem* 274:30028-30032, 1999
13. Foretz M, Guichard C, Ferre P, Foulle F: Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:12737-12742, 1999
14. Halaas, JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM: Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269:543-546, 1995
15. Yahagi N, Shimano H, Hasty AH, Matsuzaka T, Ide T, Yoshikawa T, Amemiya-Kudo M, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y, Lizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S, Yamada N: Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in Lepob/Lepob mice. *J Biol Chem* 277:19353-19357, 2002
16. Biewenga GP, Haenen SR, Bast A: The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen pharmacol* 29:315-331, 1997
17. Packer K, Kraemer K, Rimbach G: Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition* 17:888-895, 2001
18. Lee WJ, Song KH, Koh EH, Won JC, Kim HS, Park HS, Kim MS, Kim SW, Lee KU, Park JY: Alpha-lipoic acid increases insulin sensitivity by activating AMPK in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 332:885-891, 2005
19. Tarling E, Salter A, Bennett A: Transcriptional regulation of human SREBP-1c(sterol-regulatory-element-binding protein -1c) : a key regulator of lipogenesis. *Biochem Soc Trans* 32:107-109, 2004
20. You M, Matsumoto M, Pacold CM, Cho WK, Crabb DW: The role of AMP-activated protein kinase in the action of ethanol in the liver. *Gastroenterology* 127:1798-1808, 2004
21. Hardie DG: Minireview. The AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology* 144:5179-5183, 2003
22. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE: Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108:1167-1174, 2001
23. Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D: The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J Biol Chem* 277:25226-25232, 2002
24. Saha AK: Pioglitazone treatment activates AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J*

- Biol Chem 277:25226-25232, 2002
25. Neuschwander-Tetri BA, Brunt EM, Wehmeier KR, Oliver D, Bacon BR: Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR-gamma ligand rosiglitazone. *Hepatology* 38: 1008-1017, 2003
 26. Lee WJ, Lee IK, Kim HS, Kim YM, Koh EH, Won JC, Han SM, Kim MS, Jo I, Oh GT, Park IS, Youn JH, Park SW, Lee KU, Park JY: alpha-lipoic acid prevents endothelial dysfunction in obese rats via activation of AMP-activated protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:2488-2494, 2005
 27. Shimomura I, bashmakov Y, Ikemoto S, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL: Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13656-13661, 1999
 28. Azzout-Marniche D, Becard D, Guichard C, Foretz M, Ferre P, Foufelle F: Insulin effects on sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. *Biochem J* 350:389-393, 2000
 29. Deng X, Cagen LM, Wilcox HG, Park EA, Raghow R, Elam MB: Regulation of the rat SREBP-1c promoter in primary rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 290:256-262, 2002