

Ob/ob Mouse에서 비탐-에스의 비 알코올성 지방간 개선 활성

한은정 · 김애경* · 정성현#

경희대학교 약학대학, *주식회사 에스엔비
(Received June 9, 2005; Revised July 26, 2005)

Bitam-S Improves the Non-alcoholic Fatty Liver Disease in C57BL/6J ob/ob Mice

Eun Jung Han, Ae Kyung Kim* and Sung Hyun Chung#

School of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

*SNB, Chang Won 641-851, Korea

Abstract — *Semisulospira libertine* (SL) has been used as a folk medicine for quenching a thirst, hepatic fever and inflammation in oriental countries. Although SL has been anecdotally ascertained to ameliorate the hepatic diseases, there are no sufficient experimental evidences. The purpose of this study was to examine the effect of Bitam-S, in which SL is a main component, on non-alcoholic fatty liver disease manifested in C57BL/6J ob/ob mice. At 6 week old, the ob/ob mice were randomly divided into four groups; control and three treatment groups. The control mice was to receive a regular diet, and the treatment groups were fed a regular diet with either 250 mg/kg, 500 mg/kg of Bitam-S (BS250 and BS500) or 300 mg/kg of metformin (MT300) for a 8-week period. Bitam-S exerted beneficial effects on lipid homeostasis in ob/ob mice that are not necessarily due to its ability to decrease food intake but its specific effects on hepatic lipogenesis related genes (SREBP1a, FAS and SCD-1). The combined effects of Bitam-S to reduce body weight and lipogenic gene expressions, and reduce the deposition of triglyceride in the liver are indicative of a marked improvement in obesity-related non-alcoholic fatty liver disease. Taken together, Bitam-S has potential as a treatment agent for non-alcoholic fatty liver disease and deserves clinical trial in the near future.

Keywords □ Bitam-S, non-alcoholic fatty liver disease, lipogenesis related genes

대다수의 산업화된 국가에서 성인의 25% 가까이는 간 조직에 과도한 지방이 축적되어 있다.^{1,2)} 이러한 지방간(fatty liver)의 원인은 정확히 알려져 있지 않으나 종종 비만, 2형 당뇨병과 연관이 있다.³⁾ 지방간을 가진 환자에서 간 손상은 수년에 걸쳐 서서히 진행된다.⁴⁾ 따라서 지방간이 심각한 간 질환의 주요 위험인자라는 사실이 최근 연구에 의해 밝혀지기 전에는 간 질환이 전반적인 비만-관련 유병율, 사망률과 상관관계가 있다는 사실이 사람들 사이에 충분히 인식되지 않았다. 지방간을 가진 사람들 중 적어도 20%는 간경화를 일으키며 간경화 환자의 50%는 진단 후 10년 이내에 간 질환으로 사망한다.⁵⁾ 현재까지 지방간 질환을 예방하거나 치료하는 약물은 거의 없고, 단지 비만을 개선하기 위해 식이요법이나 운동요법 등에 초점이 맞추어져 있었다.⁴⁾

그러나 이러한 방법들이 지방간 질환을 개선시킨다는 근거가 없어 적절한 지방간 치료제의 개발이 필요한 실정이다.

비탐-에스는 다슬기(고형분으로 75%), 인진쑥, 당귀, 유백피 등을 함유한 제제로 본 시제품에 주 약으로 들어있는 다슬기(*Semisulospira libertine*)는 동의보감 등 한방고전에 따르면 "갈증을 해소하고 간의 열과 염증을 다스리는 효능을 가지고 있다"고 알려져 있다. 또한 민속 의학자 인산 김일훈 선생의 어록 "신약본초"에서 다슬기에 들어있는 푸른 색소가 사람의 간 색소와 닮았기 때문에 간담계의 제 질환에 훌륭한 약이 된다고 설명하였다.⁶⁾ 그러나 다슬기가 간 질환에 효능이 있다는 임상적 혹은 실험적 근거가 없어 본 연구에서는 다슬기 추출물을 주 성분으로 하는 비탐-에스에 대하여 식욕억제 호르몬인 렙틴⁷⁾의 변이로 인해 고인슐린혈증, 비만, 인슐린저항성^{8,9)}과 지방간¹⁰⁾ 특성을 가지고 있는 C57BL/6J ob/ob 생쥐에서 비 알코올성 지방간(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 개선 활성을 살펴 보았다.

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-957-0384 (팩스) 02-966-3885
(E-mail) suchung@khu.ac.kr

실험 방법

실험재료

본 실험에 사용한 비탐-에스는 주식회사 에스앤비로부터 공급받아 환제를 증류수에 녹인 후 vortex mixer로 균질화시켜 사용하였다.

실험 동물

본 연구에서 사용된 마우스는 (주)오리엔트로부터 20~25 g 정도의 6주령 C57BL/6J ob/ob 생쥐를 구입하여 사용하였다. 생쥐는 plastic rat cage에 보관하여 동물실에서 23±2°C, 상대습도 50±10%, light/dark cycle(12/12 hr)의 조건하에서 사육하였으며, 물 및 사료는 자유로이 섭취할 수 있도록 하였다. 실험동물은 실험시작 전 일주일 동안 동물실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 생쥐는 8 마리씩 4군으로 다음과 같이 구분하였다: 대조군은 증류수를 투여하였으며(Con) 시료 투여군은 비탐-에스를 250 mg/kg(BS250)과 500 mg/kg(BS500) 농도로 그리고 양성 대조약물로 메트포르민 300 mg/kg(MT300) 용량¹⁵⁾을 8주 동안 경구로 투여하였다.

혈액지표 분석

혈액 지표 분석을 위한 혈액 채취는 8시간 절식 후 실시하였다. 안와 정맥을 통해 얻어진 전혈을 5,000 rpm에서 5분간 원심분리 한 후 혈장을 사용하였다. 혈중 포도당 농도는 glucose oxidase method(Trinder method)를 사용하여 측정하였으며¹¹⁾ 흡광도 측정은 UV Spectrophotometer(U-3210, HITACHI, Japan)를 사용하였다. 혈중 인슐린 농도는 마우스 insulin ELISA Kit(Shibayagi, Japan)를 구입하여 ELISA reader(Labsystems, Finland)로 측정하였다. 혈액 중 간 기능의 지표가 되는 효소 농도를 측정하기 위하여 안와 정맥을 통하여 얻어진 혈액을 5,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 혈장을 사용하였다. Alanine aminotransferase(ALT)와 Aspartate aminotransferase(AST)는 아산제약에서 시판되는 kit을 사용하여 측정하였다.

RNA 분리 및 RT-PCR

간으로부터 total RNA는 guanidine thiocyanate-water saturated phenol/chloroform와 acidic sodium acetate을 이용하여 분리하였다.¹¹⁾ 총 RNA 양은 UV Spectrophotometer를 사용하여 260 nm과 280 nm에서 흡광도로 측정하였다. 1 µg의 총 RNA를 Moloney murine leukemia virus transcriptase 와 oligo dT(15) (Promega, USA)를 이용하여 cDNA로 reverse transcription 하였다. Sterol regulatory element binding protein-1(SREBP-1)의 sense primer는 5'-GCGCTACCGGTCTTCTATCA-3', anti-sense는 5'-TGCTGCCAAAAGACAAGGG-3'이며; fatty acid

synthase(FAS)의 sense primer는 5'-GATCCTGGAACGAGA-ACAC-3', anti-sense 5'-AGACTGTGGAACACGGTGGT-3'이며 gene; steroyl-CoA desaturase-1(SCD-1)의 sense primer는 5'-CGAGGGTTGGTTGTTGATCTGT-3', anti-sense는 5'-ATAG-CACTGTTGGCCCTGGA-3'이며; glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)의 sense primer는 5'-CAACTTTGG-CATTGTGGAAGG-3', anti-sense는 5'-ATGGAATTGTGAG-GGAGATGC-3'이다. PCR buffer 조건은 20 mM Tris-HCl(pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTP, 2.5 units Taq DNA polymerase(TaKaRa, medicals, Japan), 0.05 µg cDNA, 0.5 µM primer를 혼합하였다. PCR 조건은 94°C에서 denaturation, 57°C에서 annealing, 72°C에서 extension하였으며 PCR 생성물은 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하였다. Density는 GS-700 imaging desitometer를 이용하여 측정하였다.

조직학적 관찰

C57BL/6J ob/ob 마우스로부터 적출한 간을 10% neutral buffered formalin을 사용하여 고정하였다. 이후 탈수 및 포매 과정을 거쳐 파라핀 블록을 제작하고 두께 5 µm의 관상 절편을 제작한 후 xylene으로 파라핀을 제거시키고, 100%, 95%, 90%, 80%, 70% 알코올로 친수화시켰다. 염색방법으로는 Hematoxylin-Eosin 염색으로 탈수 과정을 거쳐 Canada balsam으로 봉합하고 광학현미경(BX-50, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

데이터 분석 및 통계 처리

모든 실험 결과는 mean standard error로 나타내었다. Ob/ob 대조군과 비교하여 통계적 유의성을 Student t-test로 처리하였으며 $p < 0.05$ 이하인 경우 유의적인 차이가 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

체중 변화 및 식이효율

Table I은 8주 동안 그룹간 체중 증가, 식이 섭취 및 식이효율을 비교한 결과이다. 8주 동안 체중 증가 량(weight gain)을 그룹간 비교해 보면 대조군은 9.37±2.16 g 증가한 반면 비탐-에스 투여군은 250, 500 mg/kg 용량에서 5.89±2.79 g, 6.01±1.65 g 증가하여 대조군과 비교시 37%, 36% 체중 증가를 억제하는 활성을 나타내었다. 양성 대조 약물인 메트포르민 투여군에서는 같은 기간 동안 체중이 6.56±1.23 g 증가하여 대조군에 비해 30% 감소하였다. 또한 그룹간 8주 동안의 식이 섭취량에 따른 체중 증가율을 비교해 본 결과 비탐-에스 및 메트포르민 투여군들은 대조군에 비해 식이효율이 각각 25%, 23%, 17% 감소하는 경향을 나타내었다. 대조군에 비해 식이효율이 감소하였다는 것은 8주간 섭취한 총 식이량에 비해 체중 증가 폭이 대조군과 비교 시

Table I – Effects of BS and metformin on body weight gain, food intake and feed efficiency

Group	Body Weight (g)		Weight gain (g)	Food intake (g/8wk/mouse)	Feed efficiency ($\times 10^{-3}$)
	Initial	Final			
Con	47.05 \pm 2.44	57.37 \pm 3.05	9.37 \pm 2.16	244.16 \pm 2.81	38.38
BS250	46.49 \pm 3.39	52.39 \pm 3.43*	5.89 \pm 2.79*	204.99 \pm 3.34*	28.73
BS500	46.92 \pm 3.04	52.93 \pm 2.89	6.01 \pm 1.65**	204.93 \pm 2.86*	29.33
MT300	46.87 \pm 2.20	53.11 \pm 3.23	6.56 \pm 1.23*	205.38 \pm 2.21**	31.94

Values represent the mean \pm SD (n=8). * P <0.05, ** P <0.01 vs. Con. Feed efficiency=[weight gain (g/8wk)]/[food intake (g/8wk)].

작음을 의미한다. BS250 투여군의 식이효율이 대조군에 비해 25% 감소하여 가장 큰 활성을 나타내었으나 용량의존적인 현상은 보이지 않았다. 비탐-에스의 체중감소 현상은 식이량의 감소와 더불어 다른 기전에 의해서 일어난 것으로 사료되어 추후 규명이 필요하다.

간, 부고환의 무게 및 형태학적 관찰

Table II는 그룹간 간과 부고환(epididymal fat pad)의 무게를 비교한 것으로 BS250, BS500, MT300 투여군은 대조군과 비교 시 각각 24%, 20%, 20% 간의 무게가 감소한 것으로 나타났으나 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다. 체중 대비 간 무게에서도 세 그룹에서 대조군에 비해 감소한 경향은 보이고 있으나 유의한 차이는 발견되지 않았다. 한편 부고환의 경우는 BS250 투여군에서 대조군과 비교 시 19%의 유의한 감소를 나타내었다. 부고환 지방세포를 HE 염색한 후 그룹간 지방세포의 크기를 비교해 본 결과 대조군의 면적은 $4,186\pm 221.4 \mu\text{m}^2$ 인 반면 비탐-에스 250 mg/kg 투여군의 경우는 $3,427\pm 118.0 \mu\text{m}^2$ 으로 대조군에 비해 18% 지방세포의 크기가 감소하는 유의한 차이를 나타내었다(data not shown). Fig. 1은 적출한 조직과(Panel A) 조직을 HE 염색한(Panel B) 것을 그룹간 비교한 것이다. Panel A에서 보듯이 비탐-에스 투여군은 대조군에 비해 조직이 작아짐을 볼 수 있었고, Panel B에서 비탐-에스 투여군은 대조군에 비해 간 세포 내 지방구(lipid droplet)들의 숫자가 현저하게 줄어들음을 관찰할 수 있었다. 이 결과로부터 비탐-에스의 비알코올성 지방간 개선 활성을 확인할 수 있었다.

혈중 간 손상 지표 효소 측정

간 손상의 대표적인 혈 중 지표인 ALT, AST의 농도를 그룹간

Table II – Effects of and metformin on liver and epididymal fat weights

Group	Liver weight (g)	Liver weight/body weight (%)	Epididymal fat weight (g)
Con	3.29 \pm 1.36	5.18 \pm 0.45	2.69 \pm 0.40
BS250	2.50 \pm 0.28	5.05 \pm 0.56	2.17 \pm 0.20*
BS500	2.63 \pm 0.33	5.07 \pm 0.57	2.60 \pm 0.75
MT300	2.64 \pm 0.39	5.07 \pm 0.54	2.52 \pm 0.32

Values represent the mean \pm SD (n=8). * P <0.05 vs. Con.

비교해 본 결과 Fig. 2에서 보듯이 ALT의 경우 대조군에 비해 BS250, BS500, MT300 군의 ALT 농도는 각각 73%, 93%, 68%를 나타내었으며, 반면 AST의 농도는 대조군에 비해 각각

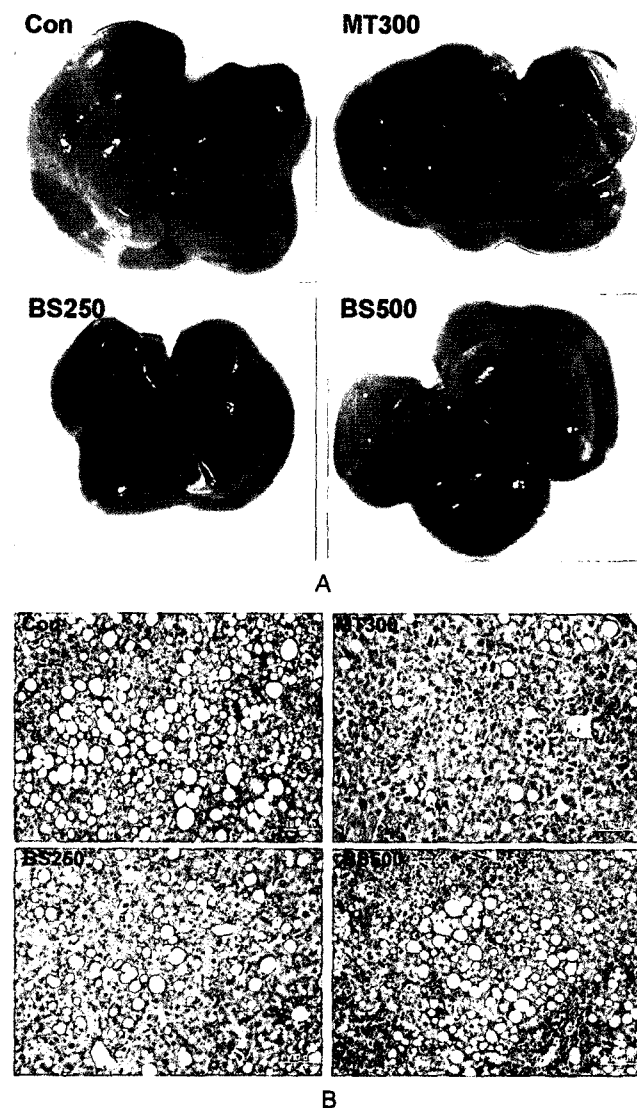


Fig. 1 – Panel A. Liver tissue photographs of C57LB/6J ob/ob mice. Panel B. Hematoxylin and eosin-stained paraffin sections of hepatocytes for control (Con), BS-treated mice (BS250 and BS500), and metformin-treated mice (MT300) and magnification was $\times 200$.

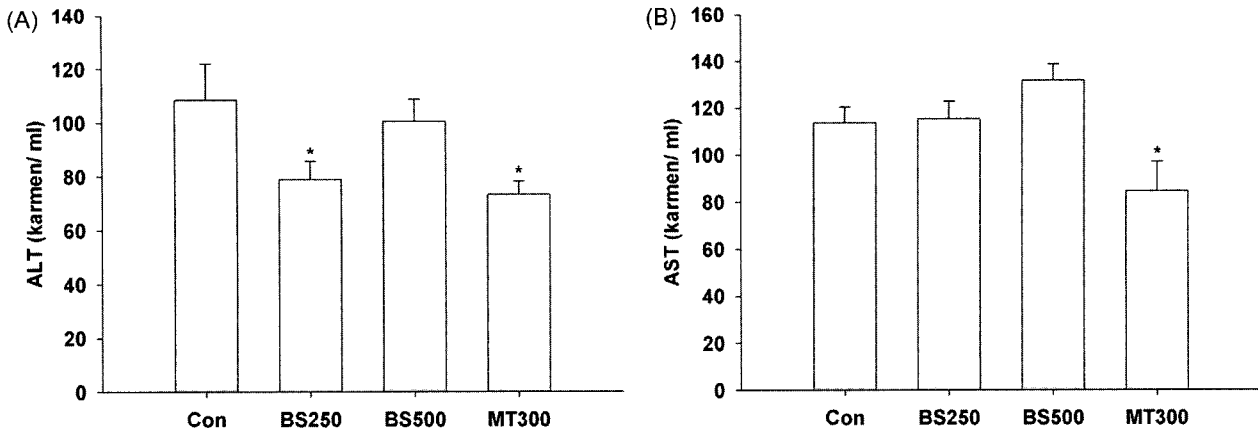


Fig. 2 - Effects of BS and metformin on plasma ALT (A) and AST (B) levels in C57BL/6J ob/ob mice. * $P < 0.05$ vs. control.

105%, 110%, 74% 효소 농도를 나타내었다. 메트포르민은 두 효소 농도를 모두 감소시켜 지방간 개선에 약효가 있음을 확인할 수 있었고 비탐-에스 투여군의 경우는 AST에는 큰 영향이 없는 반면 ALT 농도에는 유의한 감소를 나타내었다. ALT는 주로 간 세포 속에 있으므로 간세포가 파괴될 경우만 수치가 올라가지만

AST는 심장과 근육세포 속에도 있으므로 간 손상 외에 심장질환이나 근육질환인 경우에도 증가할 수 있다.¹²⁾ 따라서 AST보다는 ALT가 간 질환 진단에 더 정확하고 유용하므로 비탐-에스 투여군에서 ALT 농도가 유의적으로 줄어든 것은 비탐-에스의 지방간 개선을 의미한다고 볼 수 있다.

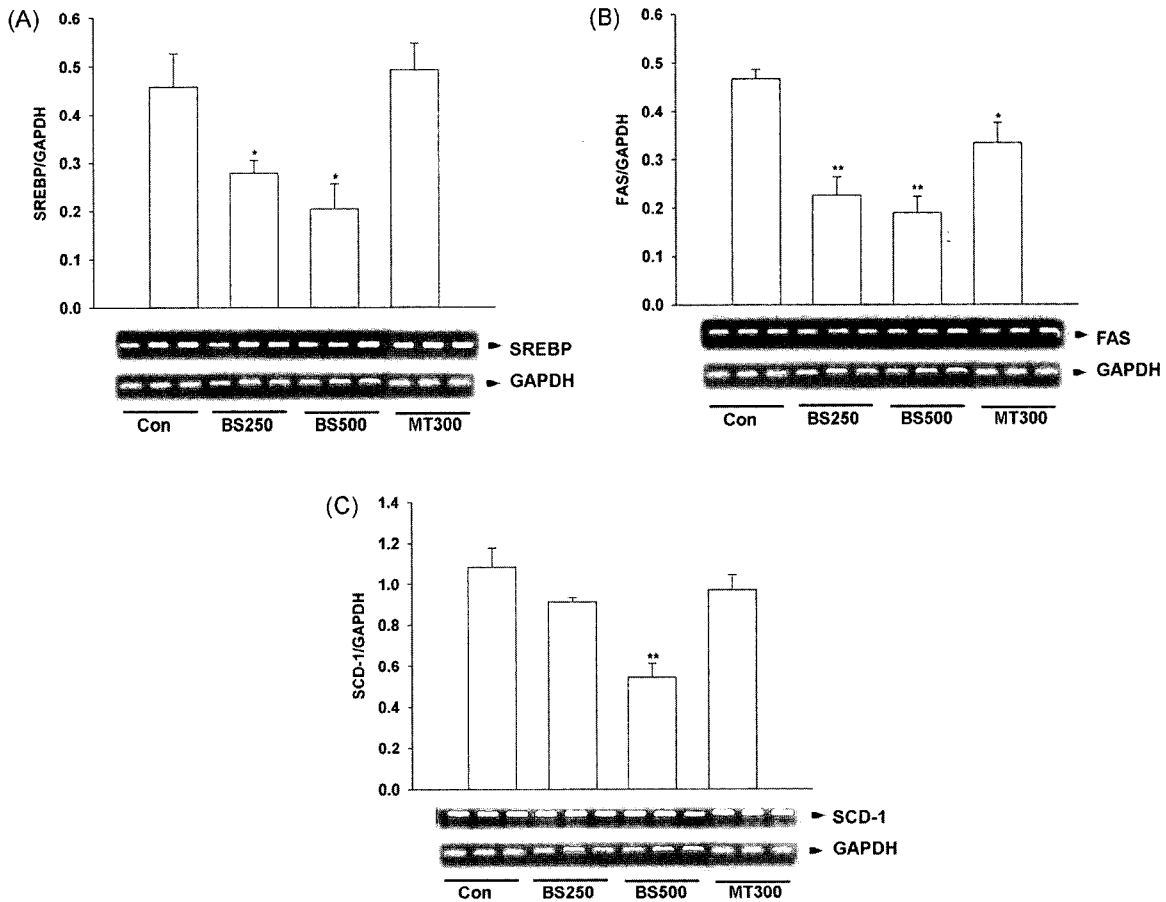


Fig. 3 - Effects of BS and metformin on either SREBP1a (A), FAS (B), or SCD-1 (C) mRNA expression in C57BL/6J ob/ob mice liver. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control.

지방합성 관련 유전자들의 발현

본 실험에서는 비탐-에스의 간 세포 내 지방구 감소 활성에 대한 기전을 살펴보기 위해 지방합성에 관련된 유전자들의 발현을 RT-PCR로 그룹간 비교한 결과이다. SREBP-1(sterol regulatory element-binding protein-1)은 지방의 항상성에 관여하는 지방산 합성효소(fatty acid synthase, FAS)와 다른 많은 유전자들(SCD-1, steroyl CoA desaturase; GPAT, glycerol 3-phosphate acyl-transferase)의 전사를 활성화시킨다.¹³⁾ Ob/ob 마우스의 지방간 내에 SREBP-1 단백질과 FAS의 mRNA 농도가 증가되어 있다는 사실은,¹⁴⁾ 간 지방증(hepatic steatosis)이 부분적으로 증가된 지방산 합성에 기인한다는 것을 시사한다. 따라서 본 실험에서는 간 조직 내 SREBP-1과 이와 관련된 유전자들인 FAS, SCD-1의 mRNA 발현을 그룹간 비교해 보았다. Fig. 3의 Panel A는 SREBP-1의 mRNA 발현을 그룹간 비교한 것으로 대조군과 비교 시 BS250, BS500, MT300 투여군은 각각 61%, 46%, 106%의 발현을 나타내어 비탐-에스 투여군의 경우 용량의존적으로 39%, 54%의 발현 억제 활성을 나타내었다. Panel B는 FAS mRNA 발현을 비교한 그림으로 대조군과 비교 시 BS250, BS500, MT300 군은 각각 49%, 40%, 70%의 발현을 나타내어 비탐-에스 투여군의 경우 용량의존적으로 51%, 60%의 발현 억제 활성을 나타내었다. 메트포르민 투여군의 경우도 대조군에 비해 30% FAS mRNA 발현을 억제하여 Lin 등이 ob/ob 생쥐에서 메트포르민 투여에 의한 FAS 단백질 발현을 면역화학법으로 확인한 결과와 일치한다.¹⁵⁾ Panel C는 SCD-1의 mRNA 발현을 그룹간 비교한 그림으로 대조군에 비해 각각 84%, 50%, 90% 발현을 나타내어 16%, 50%, 10%의 발현 억제 양상을 나타내었다. 비탐-에스 투여군은 역시 용량의존적으로 SCD-1 mRNA 발현을 억제하였다.

혈당 및 인슐린저항성 지수

Table III은 8주 동안 그룹간 혈당 및 인슐린저항성 지수를 비교한 결과이다. 8주째 공복 시 혈당을 비교해 보면 ob/ob 대조군은 7.23 ± 0.76 mM(130.1 mg/dl)인 반면 비탐-에스 투여군은 250,

Table III - Effects of BS and metformin on plasma insulin, plasma glucose, and homeostasis model assessment values for insulin resistance (HOMA-IR)

Group	Plasma glucose (mM)	Insulin (μ U/ml)	HOMA-IR
Con	7.23 ± 0.76	72.05 ± 13.19	22.41 ± 3.71
BS250	6.81 ± 0.39	63.28 ± 11.77	19.14 ± 3.44
BS500	6.62 ± 0.56	83.34 ± 14.18	24.36 ± 4.18
MT300	6.57 ± 0.84	$37.03 \pm 12.42^*$	$10.54 \pm 3.33^*$

Plasma glucose and insulin analyzed in plasma samples obtained from blood of 4h fasted (9:00 AM~1:00 PM) mice. Homeostasis model assessment was used to calculate an index of insulin resistance as $\text{glucose (mM)} \times \text{insulin } (\mu\text{U/ml}) / 22.5$. Values represents means \pm SE (n=8).

500 mg/kg 용량에서 각각 6.81 ± 0.39 (122.6 mg/dl), 6.62 ± 0.56 (119.2 mg/dl)을 나타내어 메트포르민 투여군과 함께 대조군에 비해 유의한 혈당강하 활성을 나타내지는 못하였다. 한편 혈액 중 인슐린 농도를 비교해 보면 각 그룹은 대조군과 비교 시 88%, 116%, 51%의 인슐린 농도를 나타내어 비탐-에스 투여군은 혈중 인슐린 농도에 큰 영향을 나타내지 못한 반면 메트포르민은 인슐린 농도를 49% 낮추어주는 활성을 보여주었다. Mathews 등이 개발한 혈중 포도당과 인슐린 농도를 이용한 인슐린저항성 지수 계산법¹⁶⁾을 사용하여 그룹간 인슐린저항성 지수를 그룹간 비교해 본 결과 비탐-에스는 대조군과 비교 시 유의한 차이를 나타내지 못한 반면 메트포르민의 경우는 인슐린저항성을 51% 감소시키는 탁월한 활성을 나타내었다. 본 실험 결과 비탐-에스는 ob/ob 생쥐에서 혈당이나 인슐린 농도에는 별 영향을 나타내지 않음을 알 수 있었다.

결 론

비만, 고인슐린혈증, 지방간의 특성을 보이는 ob/ob 생쥐에 비탐-에스를 250, 500 mg/kg 용량으로 8주간 경구로 투여한 후 지방간 개선 활성을 살펴본 결과 비탐-에스는 혈 중 포도당이나 인슐린 농도에는 아무런 영향을 미치지 않은 반면 간 조직 내에서 지방 합성에 관여하는 물질인 SREBP-1, FAS, SCD-1 mRNA의 발현을 억제함으로써 비알코올성 지방간을 개선시킨 것으로 사료되며 이는 혈중 ALT 농도의 감소로 확인되었다.

감사의 말씀

본 연구는 주식회사 에스앤비의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) el-Hassen, A. Y., Ibrahim, E. M., al-Mulhim, F. A., Nabhan, A. A. and Chammas, M. Y. : Fatty infiltration of the liver: analysis of prevalence, radiological and clinical findings. *Br. J. Radiol.* **65**, 774 (1992).
- 2) Bellentani, S., Tiribelli, C., Saccoccio, G., Sodde, M., Fratti, N., De Martin, C. and Cristianini, G. : Prevalence of chronic liver disease in the general population of Northern Italy: The Dionysis study. *Hepatology* **20**, 1442 (1994).
- 3) Marchesini, G., Brizi, M., Morselli-Labate, A. M., Bianchi, G., Bugianesi, E., McCullough, A. J., Forlani, G. and Melchionda, N. : Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am. J. Med.* **107**, 450 (1999).
- 4) Sheth, S. G., Gordon, F. D. and Chopar, S. : Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann. Intern. Med.* **126**, 137 (1997).

- 5) Matteoni, C., Younossi, Z. M. and McCullough, A. : Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical pathological severity. *Gastroenterology* **116**, 1413 (1999).
- 6) 김일훈 : 신약본초 (전편), 도서출판 인산가, 서울, p. 78 (2002).
- 7) Campfield, L. A., Smith, F. J. and Burn, P. : The OB protein (leptin) pathway-a link between adipose tissue mass and central neural networks. *Horm. Metab. Res.* **28**, 619 (1996).
- 8) Meglasson, M. D., Wilson, J. M., Yu, J. H., Robinson, D. D., Wyse, B. M. and de Souza, C. J. : Anti hyperglycemic actions of guanidenoalkanoic acids: 3-guanidinopropionic acid ameliorates hyperglycemia in diabetic KKAy and C57BL-6J ob/ob mice and increases glucose disappearance in rhesus monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **266**, 1454 (1993).
- 9) Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Marino, M. W. and Hotamisigli, G. S. : Protection from obesity-induced insulin-resistance in mice lacking TNF α function. *Nature* **389**, 610 (1997).
- 10) Yang, S. Q., Lin, H. Z., Lane, M. D., Clemens, M. and Diehl, A. M. : Obesity increases sensitivity of endotoxin liver injury: implications for pathogenesis of steatohepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2557 (1997).
- 11) Chomczynski, P. and Sacchi, N. : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156 (1987).
- 12) 이관식 : 알기 쉬운 간질환, 가림출판사, 서울, p. 44-45 (2005).
- 13) Shimomura, I., Hammer, R. E., Richardson, J. A., Ikemoto, S., Bashmakov, Y., Goldstein, J. L. and Brown, M. S. : Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev.* **12**, 3182 (1998).
- 14) Shimomura, I., Bashmakov, Y. and Horton, J. D. : Increased nuclear levels of SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J. Biol. Chem.* **274**, 30028 (1999).
- 15) Lin, H. Z., Yang, S. Q., Chuckaree, C., Kuhajda, F., Ronnet, G. and Diehl, A. M. : Mtorfin reverses fatty acid disease in obese, leptin-deficient mice. *Nature Medicine* **6**(8), 998 (2000).
- 16) Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenky, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F. and Turner, R. C. : Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia* **28**, 412 (1985).