

장기간의 고지방 식이 섭취가 골격근 내 PPAR Isoforms 유전자 발현에 미치는 영향*

이장규¹⁾ · 김정규²⁾ · 문희원³⁾ · 신영오⁴⁾ · 이종삼^{5)§}

상명대학교 사회체육학부,¹⁾ 강원대학교 레저스포츠학과,²⁾ 강릉대학교 체육학과,³⁾ 한국체육대학교,⁴⁾ 대구대학교 체육학과⁵⁾

The Effects of Dietary Interventions on mRNA Expression of Peroxisome Proliferator Activated Receptor Isoforms (PPAR Isoforms) in Rat Skeletal Muscle*

Lee, Jangkyu¹⁾ · Kim, Jungkyu²⁾ · Moon, Heewon³⁾ · Shin, Youngoh⁴⁾ · Lee, Jongsam^{5)§}

Division of Lifetime Sports and Leisure,¹⁾ Sangmyung University, Cheonan 330-720, Korea

Department of Leisure Sports,²⁾ College of Humanities & Social Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Department of Physical Education,³⁾ College of Arts & Physical Education, Kangneung National University, Gangneung 210-702, Korea

Sport Medicine Laboratory,⁴⁾ Korea National Sport University, Seoul 138-763, Korea

Department of Physical Education,⁵⁾ Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea

ABSTRACT

We determined the effects of dietary manipulations on messenger RNA of peroxisome proliferators activated receptor isoforms (i.e., PPAR α , β , δ , γ) in red vastus lateralis muscle of rats. Total 16 male Sprague-Dawley rats were used, and animals were divided into one of two dietary conditions: either chow diet group (CHOW; n = 8) in which animals were fed with standard rodent chow (61.8% carbohydrate, 15.7% fat, 22.5% protein) or high fat diet group (FAT n = 8) in which animals were fed 24.3% carbohydrate, 52.8% fat, 22.9% protein. At the end of the 8 weeks of experimental period, red vastus lateralis muscle was dissected out from all animals, and PPAR α , β , δ , γ mRNA expression was determined. There was no significant difference in body mass (BM) between CHOW and FAT. As expected, blood glucose and free fatty acid (FFA) concentration was higher in FAT than CHOW (p < 0.05), and lactate concentration was significantly lower in FAT compared to CHOW (p < 0.05). Insulin concentration tended to higher in FAT than CHOW (67.2 \pm 21.9 vs. 27.0 \pm 5.2 pmol/L), but it did not reach to the statistical significance. Gene expression of PPAR α was not significantly different between CHOW and FAT. It was not also significantly different in PPAR β / δ . Interestingly, expression of mRNA in PPAR γ however, was markedly depressed in FAT compared to CHOW (approximately 3 fold higher in CHOW; p < 0.05). Results obtained from present study implies that PPAR γ (as compensatory function of PPAR α is expressed) possibly exerts another major tuning roles in fatty acid transport, utilization, as well as biosynthesis in skeletal muscle cells. The situations and conditions that can be postulated for this implication need to be further examined. (*Korean J Nutr* 2007; 40(3): 221~228)

KEY WORDS : gene expression, diet, high fat, PPAR.

서 론

인체 내 지방의 소화, 흡수, 합성, 분해 및 동원을 포함하

는 대사 전반에 대한 조절은 매우 복잡한 단계를 거치며 일어난다. 최근 다양한 방법으로 지방 대사에 광범위하게 영향을 미치는 요인들이 체계적으로 연구되어 peroxisome proliferators activated receptors (PPARs)가 지방 대사를 전반적으로 조절하는 핵심 조절자임이 밝혀졌다. PPAR는 간에서 특수하게 peroxisomal proliferation을 일으키는 약물과 상호작용하는 ligand-activated transcription factor로 처음으로 보고되었으며,¹⁾ 이후 PPAR α 로 명명하였다. 이외에도 두 가지의 이성체가 복제되어 PPAR β / δ (nuclear hor-

접수일 : 2007년 2월 2일

채택일 : 2007년 4월 16일

*This work was supported by Korea Research Foundation Grant funded by Korea Government (MOEHRD, Basic Research Promotion Fund) (KRF-2005-206-C00033).

§To whom correspondence should be addressed.

E-mail : jlee@daegu.ac.kr

mone receptor 1 [NUC-1] 혹은 fatty acid activated receptor [FAAR]라고도 함)와 PPAR γ 로 명명되었으며,²⁾ 이들은 각각의 고유한 기능적 특성을 나타내는 것으로 알려져 있다.

일반적으로 PPARs는 지질 대사에 관여하는 광범위한 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. 즉, 조직 내 지질 전달 (apolipoproteins A-I, A-II, C-III), 지질 섭취 (lipoprotein lipase, fatty acid translocase, fatty acid transport protein), 및 지방산 대사 (acyl-CoA oxidase, acyl-CoA synthetase, carnitine palmitoyl-transferase-I, long-chain acyl-CoA dehydrogenase) 등에 직접적으로 관여하는 단백질들의 발현에 영향을 미칠 뿐 아니라, 이 밖에도 mitochondrial uncoupling proteins, malonyl-CoA decarboxylase, 그리고 pyruvate dehydrogenase (PDH) kinase 4 (PDK4) 등과 같이 지방산 산화와 밀접하게 관련을 맺는 요인들에게도 지대한 효과를 발휘한다.³⁻⁶⁾ 흥미로운 점은 이러한 유전체의 생성이 글루코스와 지방산의 대사 과정 사이에서 상호 유기적 관련성을 지니며, 이러한 것이 기본적으로 PPAR를 통해 조절된다는 점이다. 예를 들어, PDH complex의 인산화 반응 정도에 따라 PDK4가 mitochondria내로의 글루코스 유입 조절을 통해 간접적으로 지방산 산화율을 함께 통제하게 된다.²⁾

세 가지의 PPAR 이성체의 발현은 조직의 형태에 따라 제한적으로 나타난다. PPAR α 는 간, 신장, 및 심장과 같이 산화적 역량이 높은 조직에서 상대적으로 높게 나타나며 지방산의 β -산화과정, 지단백 합성 및 p450의 산화 과정 등에 관여하는 단백질의 합성을 조절하는 기능을 수행한다.⁷⁾ PPAR α 는 주로 지방산과 arachidonic acid와 leukotriene B4 (LTB4)와 같은 지방산 파생물질들에 의해 생리적으로 활성화되는 반면, clofibrate와 같은 fibrates 계통의 hypolipidemic drugs을 위한 약리적인 효과를 주로 발휘한다. 이에 반해, PPAR γ 발현은 기본적으로 지방 조직과 혈관 세포 등의 몇몇 조직들에서 제한적으로 일어나며 지방산 파생물질들과 15-deoxy- Δ 12,14-PGJ2와 같은 특정 prostaglandins에 의해 활성을 보이게 된다. 이 이성체의 경우, 지방세포의 분화를 유도하는데 매우 중요한 역할을 하며 활성화된 macrophages내 anti-inflammatory 성질과 명확히 밝혀지지 않은 세포 내 과정을 통해 골격근과 지방조직 내 인슐린 민감도에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.⁸⁾ 이와는 다르게, PPAR β/δ 의 발현은 매우 광범위한 조직에 편재되어 있다.²⁾ 최근 들어, Escher 등⁹⁾은 다양한 기관에서의 이러한 세 가지 형태의 이성체 발현 정도를 결정하기 위해 RNase protection을 사용하여 심장근과 골격근 모두에서 모든 형태의 이성체

가 존재함을 밝힌 바 있다. 횡문근들 (즉, 심장근과 골격근) 내에서의 이러한 세 가지 이성체의 상대적인 발현량은 PPAR β/δ > PPAR α > PPAR γ 의 순으로 나타나며 앞서 언급한 바와 같이, PPAR γ 는 특히 지방 세포에서의 발현이 확연하지만 γ 1과 γ 2 사이의 근육에서의 발현은 복잡한 상호연관성을 갖고 이루어지는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾ 골격근내 PPAR γ 의 발현 정도와 비만, 제 2형 당뇨병 발병 사이에 분명한 정적 상관관계를 보이며¹¹⁾ 이것은 근육 내 지방세포로부터 발현이 유도된 것으로 이해되고 있다.

근 섬유 형태에 따른 PPAR 이성체내 발현량 차이를 연구한 것은 매우 제한되어 있는 실정으로 Zierath 등¹²⁾은 immunostaining을 통해 PPAR γ 의 가자미근 (solus, 적근)과 백색의 비복근 (white gastrocnemius, 백근) 사이의 발현량을 관찰한 후 특별한 차이가 없음을 보고하였고, 이와 반대로 western blotting을 사용해 관찰한 연구결과에서는 가자미근에서의 발현이 백색의 외측광근 (white vastus lateralis muscle)에서의 발현량과 비교해 더 많음을 보고한 바 있다.¹³⁾ 후자의 경우 적근 섬유가 에너지의 급원으로서 지방산에 훨씬 더 많이 의존한다는 부분과 일치한다고 볼 수 있다. 이러한 연구들을 종합해 볼 때, 발현량의 차이는 존재할 수 있으나 골격근과 심장근 세포 내 기존에 알려진 세 가지 형태의 이성체가 모두 존재한다고 볼 수 있으며, 이것은 각각의 이성체가 근육 내 대사를 조절하는데 잠재적으로 중요한 역할을 한다는 것을 암시하는 것이라 볼 수 있다.

비만이나 당뇨병을 예방하기 위해 다양한 식이요법이 시도되어져 왔다. 식이 지방은 세포 내 및 세포막을 이루는 구성 성분을 변화시켜 직접적으로 대사적 활동에 영향을 미치므로 올바른 건강 식이가 될 수 있도록 식단의 계획이 이루어져야 할 것이다. 이러한 식이요법의 근간은 섭취 지방의 체내 저장율을 감소시키는 동시에 축적된 지방의 분해율을 증가시켜 이를 통해 혈액으로 방출되는 유리지방산의 산화를 증가시키는 것이라 볼 수 있다. 식이 지방의 섭취와 인슐린 저항성과의 관계를 밝힌 연구들도 다수 보고되었다. 지방산 형태에 따른 세부적인 효과에 대한 연구는 요구되지만 현재까지 보고된 대부분의 연구에서 지방산의 섭취량과 인슐린 민감성 사이에는 역상관관계가 있음이 밝혀졌다.¹⁴⁾ 이와 같이 지방 식이 섭취가 인체 내 대사 기능에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있으나 식이요법이 PPAR의 세 가지의 이성체들의 변화에 미치는 효과를 밝힌 연구는 현재까지 보고된 바 없다. 따라서 본 연구를 통해 서로 다른 식이섭취 형태와 PPAR 이성체들 사이의 변화를 실험용 쥐의 골격근을 이용해 밝히고자 하였다.

연구 방법

실험동물의 사육 및 배정

본 연구에서는 장기간의 서로 다른 식이 섭취가 골격근 내 PPAR 이성체의 유전자 발현에 미치는 효과를 연구하였다. 이를 위해 총 16마리의 3~4주령 (약 90~110 g) 되는 Sprague-Dawley (male) 쥐를 샘타코社 (경기, 대한민국)로부터 구입해 사용하였다. 실험용 동물이 실험실에 도착한 후 실험실 환경 (온도, 22 ± 2°C 상대습도, 55 ± 5%; 12 : 12시간 light-dark cycle)에 적응할 수 있도록 약 1주일의 적응기간을 거치게 하였으며 이후 이들을 무선배정방식을 통해 정상 식이 그룹 (standard chow, CHOW; n = 8)과 고지방 섭취 그룹 (high fat diet, FAT; n = 8)으로 나누어 8주간의 계획된 식이제공을 하였다. 8주간의 식이 처치 기간이 끝난 후, 복강 내 sodium pentobarbital (60 mg/체중 kg)을 주입해 마취제가 완전하게 효력을 발휘하는 시점을 확인해 각각의 쥐들로부터 적색의 외측광근 (33% type IIa fibers, 32% type II d/x fibers¹⁵⁾)을 적출해 곧바로 액체 질소 (liquid nitrogen) 속에서 급속으로 냉동시킨 후 PPAR α , β /

δ , γ 이성체에 대한 유전자 분석을 실시할 때까지 -80°C 냉동고에 보관하였다. 본 연구에서는 사료 및 수분의 섭취량에 제한을 두지 않았으며 최선의 사육 환경을 유지할 수 있도록 정기적으로 동물의 상태 및 실험실 조건을 점검하였다.

고지방 식이의 준비

고지방 식이는 선행연구¹⁶⁾에서 사용한 방법을 수정해 사용하였다. 고지방 식이에 대한 영양 구성 요소들과 에너지 함량은 쥐의 성장 및 발달에 필요한 영양소들이 골고루 공급될 수 있도록 하였다. CHOW 식이는 샘타코社 (경기, 대한민국)로부터 구입해 동물에게 공급하였으며, 고지방 식이는 ICN Biomedicals (Chicago, U.S.A)으로부터 각각의 재료를 구입해 충분히 잘 혼합 후 필요한 형태의 식이가 될 수 있도록 제조되었다 (Table 1). 선행연구^{16,17)}를 바탕으로 고지방 식이의 제조를 위해 라드와 코코넛유를 주로 사용하였다. 준비된 식이의 섭취를 통해 공급된 에너지의 함량은 CHOW 식이의 경우 탄수화물로부터 61.8%, 지방 및 단백질로부터 각각 15.7%와 22.5%였으며 FAT 식이의 경우 탄수화물로부터 24.3%, 지방으로부터 52.8% 및 단백질로부터 22.9%였다. 전체 실험기간 중 체중의 변화를 1주에 2회 정기적으로 관찰하였다 (Table 1).

Table 1. Composition and energy content of the experimental diets

Ingredient	Amount (g/100 g of diet)	
	CHOW	FAT
Starch (from corn)	48.3	
Starch (from rice)	-	18.0
Sucrose	-	8.0
Wheat bran	3.9	5.1
Lard	2.9	15.0
Coconut oil	-	15.0
Olive oil	-	-
Safflower oil	-	-
Vegetable oil	3.0	-
Casein	-	23.0
Soybean meal (48% protein)	20.0	-
Fish meal (64% protein)	14.4	-
Gelatin	-	6.0
DL-methionine	0.3	0.3
Mineral mixtures	5.9	6.7
Vitamin mixtures	1.3	1.3
Kcal · 100 g ⁻¹ (% Kcal)	337.9 (100.0)	511.6 (100.0)
Carbohydrate	208.8 (61.8)	124.4 (24.3)
Fat	53.1 (15.7)	270.0 (52.8)
Protein	76.0 (22.5)	117.2 (22.9)

Standard CHOW was purchased from SAMTAKO (Bio Korea Inc., Kyoung-ki, Korea). DL-Methionine, DL-2-Amino-4-methylthiobutanoic acid. All ingredients for high-fat diet were prepared from ICN Biomedicals, Inc (U.S.A, Chicago)

분석 항목 및 방법

혈액 성분의 생화학적 분석

채집된 전혈 (~7 mL) 중 일부 (~2 mL)는 EDTA 처리된 튜브로 옮겨져 혈장 분리를 위해 10분간 5,000 rpm에서 원심분리 하였다. 혈장 분리 후 곧바로 젯산 및 글루코스 농도를 자동화된 분석기 (Yellow Springs Instruments 2300, Yellow Springs, Ohio State, U.S.A)를 이용해 측정했으며 잔여의 혈장은 유리지방산의 측정을 위해 사용하였다. 혈장 내 유리 지방산 농도는 효소 반응을 이용한 색의 변화를 관찰해 정량화하는 방법 (NEFA C test kit, Wako, Richmond, Virginia, U.S.A)을 이용해 spectrophotometer에서 측정되었으며 잔여 혈액 (~5 mL)은 무처리된 튜브로 옮겨 3분간 응고시킨 후 15분간 원심분리 (7,000 rpm) 후 혈청을 분리해 enzyme immunoassay ELISA 분석용 kit (Mercodia AB, Uppsala, Sweden)을 사용해 혈청 인슐린 농도를 분석하였다.

Real time RT-PCR을 통한 PPAR 이성체 유전자 발현량 분석

조직으로부터의 총 RNA는 이전에 사용된 방법^{3,18,19)}에 의해 Fast RNA kit-Green (Integrated Sciences)을 사용해 추출하였으며, 실제 RNA 함량은 spectrophotometer (260 nm)에서 흡광도를 측정해 계산하였다. 첫 번째 strand cDNA

는 AMV RT (Promega, Madison, Wisconsin, U.S.A)를 이용하여 1 μg RNA를 취해 얻었으며, 이로써 생성된 cDNA는 최종분석이 이루어질 때까지 -20℃에서 보관되었다.

역전사 효소 연쇄중합반응 (Reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)은 ABI PRISM 5700 sequence detection system (Applied Biosystems, Chicago, U.S.A)를 이용하여 실시하였다. Forward와 reverse primers (3 μM) 그리고 cDNA (12 ng)를 이용해 20 μL의 전체 양으로 40사이클의 PCR을 수행하였으며, 이때 발생될 수 있는 오차의 최소화를 위해 cyclophilin (GeneBank accession number, M19533) mRNA를 정량화 하여 모든 결과의 값들에 적용 하였다. 이렇게 얻은 자료들은 critical threshold (CT)값을 이용하여 fluorescent emission data를 얻어 mRNA 수준을 분석하는데 사용되었다.

자료 처리

모든 자료는 Window용 SPSS 11.0 version 통계프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 산출하였으며, 식이섭취에 따른 PPAR 이성체간의 평균차 검정을 위해 독립 t-검정을

Table 2. Body mass differences in experimental animals

	0 WK	8 WK
CHOW	114.6 ± 4.6	385.8 ± 36.3
FAT	118.8 ± 6.8	407.8 ± 14.2

CHOW: standard chow diet, FAT: high fat diet. All values are means ± S.D.

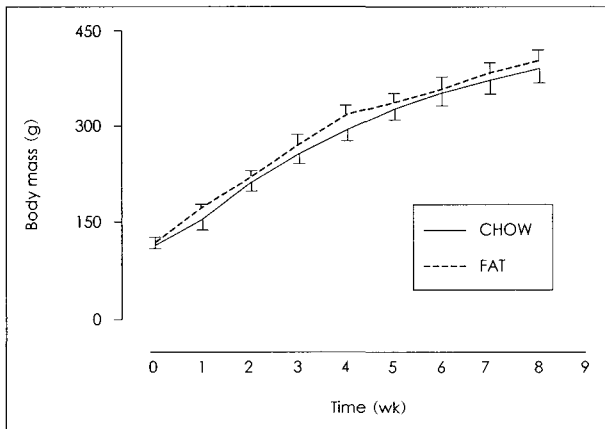


Fig. 1. Body mass changes of experimental animals. All values are means ± S.D.

Table 3. Changes in blood metabolites after 8weeks of dietary manipulations

	Glucose (mg/dL)	Lactate (mmol/L)	FFA (mmol/L)	Insulin (pmol/L)
CHOW	72.3 ± 8.0	1.13 ± 0.19	0.35 ± 0.08	27.0 ± 13.7
FAT	83.6 ± 7.7*	0.87 ± 0.22*	0.46 ± 0.07*	67.8 ± 58.1

FFA: free fatty acid, CHOW: standard chow diet, FAT: high fat diet. *: Significantly different from CHO (p < .05). All values are means ± S.D.

사용하였다. 이 연구에서의 통계적 유의 수준은 α = 0.05로 설정하였다.

결 과

동물 체중의 변화

실험동물의 체중은 실험기간 전반을 통해 꾸준히 증가함을 보여 성장에 지장을 받지 않은 것으로 사료된다. 실험시작 시점에서 고탄수화물 식이군에서 114.6 ± 1.6 g을, 고지방 식이군에서 118.8 ± 2.4 g을 나타내 유의한 차를 보이지 않았으며 8주간의 서로 다른 식이섭취 적용 후 고탄수화물 식이군에서 385.8 ± 12.8 g을, 고지방 식이군에서 407.8 ± 5.0 g을 보여 고지방 식이군에서 높은 경향을 보였으나 통계적 유의성은 나타나지 않았다 (Table 2). Fig. 1은 8주간의 실험동물의 체중의 변화를 비교한 것으로 실험 기간 중 어

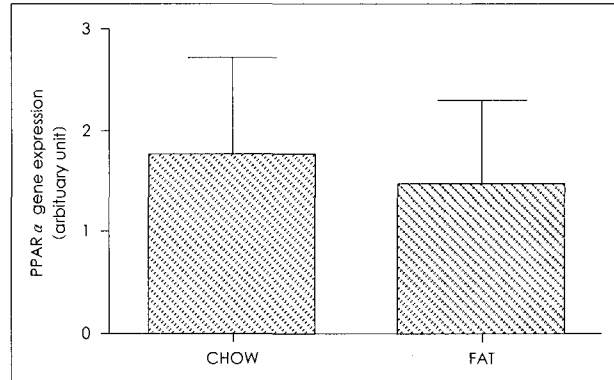


Fig. 2. The comparison between CHO and FAT of PPAR α mRNA. All values are means ± S.D.

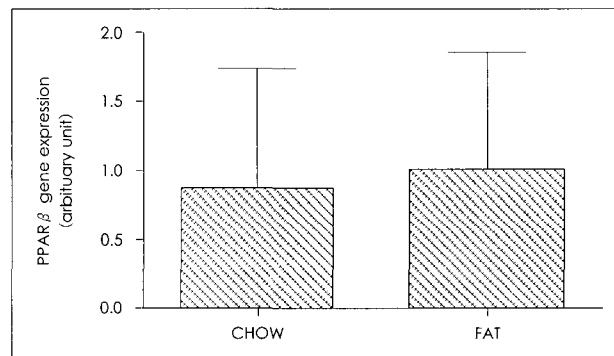


Fig. 3. The comparison between CHO and FAT of PPAR β/δ mRNA. All values are means ± S.D.

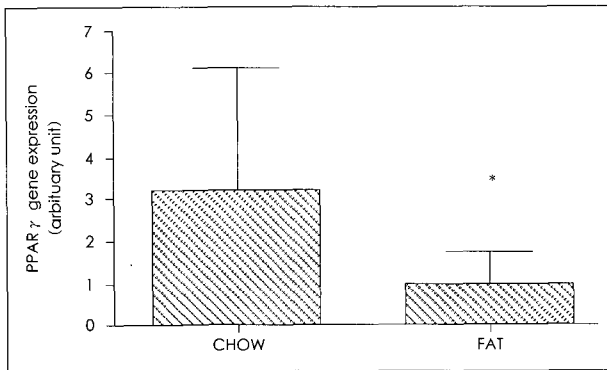


Fig. 4. The comparison between CHO and FAT of PPAR γ mRNA. *: Significantly different from CHO (p < .05). All values are means \pm S.D.

는 시점에서도 두 식이섭취 그룹 간 유의한 차이는 나타나지 않았다 (Fig. 1).

혈액 성분의 변화

8주간의 고지방 식이요법 후 혈중 글루코스의 유의한 증가를 나타냈다 (p < 0.05; Table 3). 혈중 젖산은 고탄수화물 섭취군에서 고지방 섭취군과 비교해 유의하게 높게 나타났으며 혈장 유리지방산의 농도는 고지방 섭취군에서 유의하게 높은 것으로 나타났다 (Table 3). 혈청 인슐린의 변화를 살펴본 결과 고지방 섭취 후 분명한 증가 경향 (약 2.5배)을 보였으나 통계적으로는 유의한 차를 보이지 않았다 (Table 3).

근육 내 PPAR 이성체의 변화

- 1) 근육 내 PPAR α 의 유전자 발현량은 장기간의 식이섭취 후에도 유의하게 변화하지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 2).
- 2) 근육 내 PPAR β 의 유전자 발현량은 장기간의 식이섭취 후에도 유의하게 변화하지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 3).
- 3) 근육 내 PPAR γ 의 유전자 발현량은 장기간의 고지방 식이섭취 후 유의하게 감소하는 것으로 나타났다 (p < 0.05; Fig. 4).

고 찰

본 연구에서는 수컷 Sprague-Dawley쥐를 사용하였다. 식이섭취 형태와 상관없이 연령의 증가에 따라 체중의 정상적인 증가를 나타냈으나 식이섭취의 차이에 따른 그룹 간 체중의 차이는 유의하게 나타나지 않았다. 이와 같은 결과는 Lee 등¹⁶⁾의 선행연구 결과와 일치하는 것이다.

일반적으로 고지방 식이 섭취에 따른 혈중 대사 물질의 변화 양상은 당 대사 능력의 저하에 따른 혈당치의 상승을 보임과 동시에 지방 대사의 억제로 인한 유리지방산 농도의 증가를 나타내는 것으로 알려져 있으며 이와 같은 변화는 인

슐린의 기능 저하와 연관되는 안정 시 혈중 인슐린 농도의 증가와 관련을 갖게 된다. 본 연구에서의 결과는 이러한 일반화된 경향을 잘 반영하고 있어 8주간의 고탄수화물 식이 섭취의 경우 혈중 글루코스, 유리지방산, 및 인슐린의 농도를 상대적으로 낮게 유지시킨 반면 포화지방산이 주로 함유된 고지방 섭취 후 같은 혈중 대사 물질의 유의한 증가를 보인 것으로 나타났다. 이와 함께 혈중 젖산농도는 당 대사의 활성화 정도를 나타내는 것으로 알려져 있는데 본 연구에서는 당 대사의 감소에 따라 고지방 식이 섭취 후의 안정 시 젖산 농도가 유의하게 낮음을 보여 이 역시 타당한 결과를 보였다고 결론 내릴 수 있겠다.

인체 내 지방 대사의 조절은 매우 복잡한 단계를 거치며 일어난다. 체계적이고 다양한 연구 방법을 통해 지방의 소화, 흡수, 합성, 분해 및 동원을 포함한 지방 대사 전반의 조절자들에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. PPARs는 지방 섭취에 따른 에너지 평형을 조절하는 세포 내 주요한 조절자로 세 가지 형태의 이성체들 (α , β/δ , γ)이 보고되어 있으며, 이러한 이성체들은 서로간의 통합적 기능을 수행하거나 각각의 고유한 특징적 기능을 발휘해 조직 내 지질 전달 및 섭취, 지방산 산화에 관여하는 단백질들의 유전자 발현을 조절한다고 알려져 있다. 골격근에서는 세 가지의 이성체체가 모두 발현되는 것으로 알려져 있으나²⁰⁾ 근육의 에너지 대사를 조절하는 이들 사이의 역할차이에 대해서는 여전히 명확하게 알려지지 않고 있다. PPAR α 와 γ 의 전사적 활성화는 전사적 활성 도메인의 인산화에 의해²¹⁻²⁴⁾ 그리고 조활성자들 (coactivators) 및 억제자들과의 조직 특이성 상호작용²¹⁾에 의해 조절된다. PPAR β/δ 의 세포 내 조절 기전에 관해서는 잘 알려져 있지 않지만 PPAR α 와 γ 와 비슷한 조절기전을 나타낼 것으로 추측하고 있다.

PPAR α 는 지방 산화가 높은 조직에서 가장 풍부하게 발현되는 것으로 알려져 있으며 산화능력이 뛰어난 조직에서 가장 풍부하게 발현되어 베타산화과정을 활성화시키는데 중요한 역할을 한다.²⁵⁾ PPAR α 를 knock-out시킨 생쥐의 심근 조직 및 간 조직 모두에서 베타 산화율이 저해됨과 동시에 중성지방의 비정상적인 축적을 나타낸다는 결과가 보고된 바 있으며²⁶⁻²⁸⁾ 이는 knock-out 생쥐의 지방 산화와 관련된 유전자 발현을 감소시킨 후 간과 심장에서 지방산 산화를 일으키지 못했다는 연구결과와 연관이 있는 것으로 보인다.^{26,28,29)} PPAR α 의 단백질 발현량은 규칙적인 운동 훈련을 통해^{13,30)} 그리고 베타산화 역량의 증가와 함께 근육세포의 분화중에도 증가되는 것으로 알려져 있다.³¹⁾ 본 연구에서는 고탄수화물 섭취 및 고지방 식이 섭취에 따라 PPAR α 의 유전자 발현량 변화를 살펴보았으나 유의한 차이를 관찰할 수 없었다.

이러한 연구 결과는 본 연구에서 사용한 조직이 적색의 외측 광근으로 심근 혹은 간조직과 다른 골격근이었다는데 점을 고려할 필요가 있을 것으로 사료되며 고지방 섭취에 따른 베타산화 역량의 긍정적 측면의 변화를 기대해 유전자 발현량의 변화가 일어날 것으로 기대했던 사전 가설과 다른 결과라 하겠다. 고지방 식이를 통해 베타산화 역량의 향상이 있었는지를 살피기 위해 베타산화과정에 관여하는 효소들의 활성도 변화 및 단백질 발현량의 변화를 살피지 못했다는 점에서 후속 연구의 필요성을 제시하는 바이다. 본 연구 결과를 토대로, PPAR α 는 (최소한 설치류에서는) 간과 심장에서는 지질 항상성을 유지하는데 필수적인 역할을 수행하지만 고지방 섭취와 관련해 골격근에서의 지방산 대사 조절과 관련해서 역할에 대해서는 미미한 것으로 결론지을 수 있었다.

다른 isoform들과 비교해 간에서의 PPAR α 발현량이 현격하게 높은 반면에 심장에서는 PPAR α 와 β/δ 의 발현량이 비슷하게 나타나며 대퇴근 (quadriceps muscle)에서는 PPAR β/δ 의 발현량이 두드러지게 높게 나타난다.^{9,32)} 외측 광근 내 유전자 발현량을 비교한 본 연구에서는 PPAR β/δ 의 유전자 발현량 차이가 유의하게 나타나지 않았다. 이는 어떠한 선행들을 통해서도 보고된 바 없는 결과로 최근의 연구들에서도 PPAR β/δ 가 콜레스테롤 대사와 비만의 조절자로서의 역할에 대해서만 가능성을 언급하고 있을 뿐,³³⁾ 자세한 작용기전에 대해서는 제시하지 못하고 있는 실정이다. 다양한 실험설계 및 연구방법을 통해 실제 기능 및 역할에 대해 밝혀야 할 것으로 사료된다.

PPAR α 와는 다르게, 지방 조직에서 주로 발현되는 PPAR γ 는 지방세포 분화 (adipocyte differentiation)를 증진시키고 지방생성 (lipogenesis)을 촉진하는 유전자 발현을 증가시킨다.³⁴⁾ 이러한 결과들은 RNase protection assay를 사용해 생쥐³²⁾와 쥐⁹⁾의 조직에서 PPAR 이성체의 발현 수준을 평가한 결과를 토대로 한 것이다. Wild type의 산화적 조직 내의 PPAR γ 발현량은 낮게 나타나는데 이는 PPAR가 지방 산화 과정을 조절하는데 주요한 역할을 담당하지 않는다는 것을 내포하는 것이며 대조적으로 knock-out 생쥐의 간과 심장에서 PPAR γ 의 발현량이 증가한 것은 그 기능이 지방생성 및 중성지방 합성을 위한 활성자라는 것을 뒷받침하는 것³⁵⁾으로 이와 같이 간과 심장 내 상승된 PPAR γ 수준은 이들 조직이 지질독성으로 발전하고 있다는 초기 반응을 암시하는 것이다. 본 연구에서는 8주간의 고지방 식이섭취가 PPAR γ 유전자 발현량을 고탄수화물을 섭취한 경우와 비교해 유의하게 감소시켰다. 이는 위에 제시한 연구 결과와 상반되는 것으로 이제까지 제시되어온 지방산 산화의 주요

조절자의 역할을 PPAR γ 가 수행할 수 있음을 나타내주는 것이라 하겠다. 고지방 섭취에 의한 지방 대사 조절의 측면에서 지방생성 및 중성지방의 합성이 과다하게 일어나는 것을 억제하기 위해 PPAR γ 의 유전자 발현량이 현격하게 감소된 것으로 생각할 수 있겠다. PPAR α knock-out 생쥐를 이용해 PPAR α 가 골격근 내 지질 항상성을 유지하는데 필수적인지를 조사한 연구 결과를 통해 지지될 수 있다.

Muoio 등²⁰⁾은 최근에 PPAR α 의 결핍이 골격근 에너지 대사뿐 아니라 유전자 조절에 매우 중요한 결과를 나타낼 것이라 가설을 제시한 후 pyruvate-dehydrogenase kinase (PDHK4)와 uncoupling protein 3 (UCP3)의 근육 내 지방산 대사와 전사적 활성화 (transcriptional activation) 조절에 대한 PPAR α 의 필요성을 연구하기 위해 같은 어미로부터 태어난 PPAR α knock-out 생쥐와 wild type 생쥐 근육을 이용한 시험관내에서 (in vitro)의 지방산 산화뿐 아니라 지구성 운동 시 일어나는 대사적 및 유전자 조절적인 반응에 대해 평가했다. 연구자들이 사전 제시한 가설과는 다르게, knock-out 생쥐의 골격근에서는 지방산 항상성에 매우 적은 변화만이 일어났을 뿐 더러 이미 알려져 있는 PPAR α 목표 유전자들에 나타나는 mRNA의 발현에 있어서도 PPAR α 의 부재에 의해 감소되는 방향으로 영향을 미치는 것으로 나타났다. Muoio 등²⁰⁾의 연구를 통해 골격근에서 높은 수준의 PPAR β/δ 발현을 확인할 수 있었으며 설치류와 인간 골격근 세포 모두에서 PPAR β/δ 하위형태의 활성이 PPAR α 목표 유전자들로 알려진 몇몇에 대해 mRNA 수준 뿐 아니라 지방산 산화의 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 이러한 결과들 즉 PPAR α 와 δ 기능상 상당한 정도의 중복이 나타나는 것은 이러한 두 형태의 하부 형태 모두는 지질에 의해 유도되는 베타 산화 과정의 조절을 중재하는데 중요한 역할을 한다는 것을 가리키는 것이다. 높은 수준의 PPAR δ 가 아마도 knock-out 생쥐 골격근 내 PPAR α 의 부족을 보상하는 것으로 보인다.

결론

본 연구에서는 16마리의 수컷 Sprague-Dawley쥐를 이용해 식이섭취에 따른 혈중 대사 물질의 변화와 PPAR 이성체 발현량의 변화를 살폈으며 위에 제시한 결과를 바탕으로 아래와 같은 결론을 내릴 수 있었다.

1) 장기간의 고지방 식이섭취 후 당 및 지방 대사에 밀접한 관련을 맺고 있는 혈중 글루코스, 유리지방산, 젖산 농도의 축적을 나타내 대사 항상성 유지 능력의 저하를 나타냈으며 혈중 인슐린 농도의 상승은 이러한 결과를 뒷받침하고

있다.

2) 장기간 고지방 식이섭취 후 적색의 외측광근내 PPAR α mRNA 발현량의 변화는 나타나지 않는다.

3) 장기간 고지방 식이섭취 후 적색의 외측광근 내 PPAR β mRNA 발현량의 변화는 나타나지 않는다.

4) 장기간 고지방 식이섭취 후 적색의 외측광근 내 PPAR γ mRNA 발현량은 고탄수화물 식이섭취 후와 비교해 유의하게 감소한다.

따라서, 장기간의 고지방 식이섭취로 유도되는 근육내 지방대사 촉진을 위한 세포내 유전자 발현의 조절은 기존에 알려진 PPAR α 에 의해 주로 일어나는 것이라기보다는 PPAR γ 에 의해 일어남을 알 수 있었으며 이는 정확하게 알려져 있지 않는 이들 두 이성체간의 cross-talk을 위한 상호 보충적 경로가 존재함을 암시하는 것이라 하겠다.

Literature cited

- 1) Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990; 347: 625-650
- 2) Gilde AJ, Van Bilsen M. Peroxisome proliferators activated receptors (PPARs): regulators of gene expression in heart and skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 2003; 178: 425-434
- 3) McAinch AJ, Lee JS, Burce CR, Tunstall RJ, Hawley JA, Cameron-Smith D. Dietary regulation of fat oxidative gene expression in different skeletal muscle fiber types. *Obesity Res* 2003; 11: 1471-1479
- 4) Van Der Lee KA, Willemsen PH, Van Der Vusse GJ, Van Bilsen M. Effect of fatty acids on uncoupling protein 2 expression in the rat heart. *FASEB J* 2000; 14 (3): 495-502
- 5) Wu P, Peters JM, Harris RA. Adaptive increase in pyruvate dehydrogenase kinase 4 during starvation is mediated by peroxisome proliferators-activated receptor alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287 (2): 391-396
- 6) Young ME, Goodwin GW, Ying J, Guthrie P, Wilson CR, Laws FA, Taegtmeyer H. Regulation of cardiac and skeletal muscle malonyl CoA decarboxylase by fatty acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280 (3): E471-E479
- 7) Gorla-Bajszczak A, Siegrist-Kaiser C, Boss O, Burger AG, Meier CA. Expression of peroxisome proliferators activated receptors in lean and obese Zucker rats. *Eur J Endocrinol* 2000; 142: 71-78
- 8) Spiegelman BM. PPAR- γ : Adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 1998; 47: 507-514
- 9) Escher P, Braissant O, Basu-Modak S, Michalik L, Wahli W, Desvergne B. Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology* 2001; 142: 4195-4202
- 10) Vidal-Puig A, Considine RV, Rimenez-Linan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF, Flier JS. Peroxisome proliferators activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest* 1997; 99(10): 2416-2422
- 11) Park KS, Ciaraldi TP, Abrams-Carter L, Mudaliar S, Nikoulina SE, Henry RR. PPAR-gamma gene expression is elevated in skeletal muscle of obese and type II diabetic subjects. *Diabetes* 1997; 46 (7): 1230-1234
- 12) Zierath JR, Ryder JW, Doebber T, Woods J, Wu M, Ventre J, Li Z, McCrary C, Berger J, Zhang B, Moller DE. Role of skeletal muscle in thiazolidinedione insulin sensitizer (PPARgamma agonist) action. *Endocrinology* 1998; 139 (12): 5034-5041
- 13) Cresci S, Wright LD, Spratt JA, Briggs FN, Kelly DP. Activation of a novel metabolic gene regulatory pathway by chronic stimulation of skeletal muscle. *Am J Physiol* 1996; 270: C1413-C1420
- 14) Feskens EJ, Virtanen SM, Rasanen L, Tuomilehto J, Stengard J, Pekkanen J, Nissinen A, Kromhout D. Dietary factors determining diabetes and impaired glucose tolerance. ["A 20 year follow"] up of the Finnish and Dutch cohorts of the Seven Countries Study. *Diabetes Care* 1995; 18 (8): 1104-1112
- 15) Delp MD, Duan C. Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J Appl Physiol* 1996; 80: 261-270
- 16) Lee JS, Bruce CR, Spriet LL, Hawley JA. Interaction of diet and training on endurance performance in rats. *Exp Physiol* 2001; 86 (4): 499-508
- 17) Storlien LH, Jenkins AB, Chisholm DJ, Pascoe WS, Khouri S, Kraegen EW. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and free fatty acids in muscle phospholipids. *Diabetes* 1991; 40: 280-289
- 18) Lee JS, Bruce CR, Tunstall RJ, Cameron-Smith D, Hugel H, Hawley JA. Interaction of exercise and diet on GLUT-4 protein and gene expression in Type I and Type II rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 2002; 175: 37-44
- 19) Tunstall RJ, Mehan KA, Wadley GD, Collier GR, Bonen A, Hargreaves M, Cameron-Smith D. Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283: E66-E72
- 20) Muoio DM, MacLean PS, Lang DB, Li S, Houmard JA, Way JM, Winegar DA, Corton JC, Dohm GL, Kraus WE. Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR) α knockout mice: Evidence for compensatory regulation by PPAR δ . *J Biol Chem* 2002; 277 (29): 26089-26097
- 21) Barger PM, Brandt JM, Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP. Deactivation of peroxisome proliferators-activated receptor- α during cardiac hypertrophic growth. *J Clin Invest* 2000; 105: 1723-1730
- 22) Barger PM, Browning AC, Garner AN, Kelly DP. p38 Mitogen-activated protein kinase activates peroxisome proliferators-activated receptor α : A potential role in the cardiac metabolic stress response. *J Biol Chem* 2001; 276 (48): 44495-44502
- 23) Forman BM, Chen J, Evans RM. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferators-activated receptors α and δ . *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 4312-4317
- 24) Lazennec G, Canaple L, Saugy D, Wahli W. Activation of peroxisome proliferators-activated receptors (PPARs) by their ligands and protein kinase A activators. *Mol Endocrinol* 2000; 14:

- 1962-1975
- 25) Su JL, Simmons CJ, Wisely B, Ellis B, Winegar DA. Monitoring of PPAR alpha protein expression in human tissue by the use of PPAR alpha-specific MAbs. *Hybridoma* 1998; 17(1): 47-53
 - 26) Djouadi F, Brandt JM, Weinheimer CJ, Leone TC, Gonzalez FJ, Kelly DP. The role of the peroxisome proliferators-activated receptor alpha (PPAR alpha) in the control of cardiac lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1999; 60(5-6): 339-343
 - 27) Djouadi F, Weinheimer CJ, Saffitz JE, Pitchford C, Bastin J, Gonzalez FJ, Kelly DP. A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferators-activated receptor α -deficient mice. *J Clin Invest* 1998; 102: 1083-1091
 - 28) Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP. A critical role for the peroxisome proliferators-activated receptor α (PPAR α) in the cellular fasting response: The PPAR α -null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7473-7478
 - 29) Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferators-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 1999; 103: 1489-1498
 - 30) Horowitz JF, Leone TC, Feng W, Kelly DP, Klein S. Effect of endurance training on lipid metabolism in women: a potential role for PPAR α in the metabolic response to training. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279: E348-E355
 - 31) Muoio DM, Way JM, Tanner CJ, Winegar DA, Kliewer SA, Houmard JA, Kraus WE, Dohm GL. Peroxisome proliferators-activated receptor- α regulates fatty acid utilization in primary human skeletal muscle cells. *Diabetes* 2002; 51: 901-909
 - 32) Jones PS, Savory R, Barratt P, Bell AR, Gray TJ, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Bell DR. Chromosomal localization, inducibility, tissue-specific expression and strain differences in three murine peroxisome-proliferator-activated-receptor genes. *Eur J Biochem* 1995; 233(1): 219-226
 - 33) Barak Y, Lian D, He W, Ong ES, Nelson MC, Olefsky JM, Boland R, Evans RM. Effects of peroxisome proliferators-activated receptor δ on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *PNAS* 2002; 99(1): 303-308
 - 34) Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 1999; 4(4): 611-617
 - 35) Unger RH, Orci L. Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. *FASEB J* 2001; 15: 312-321