creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000263426

2012년 8월
박사학위 논문

열량공급제한이 OLETF 쥐의 간 PGC-1α 와 IGF-1 발현에 미치는 영향

조선대학교 대학원

의 학 과

신 지 혜

열량공급제한이 OLETF 쥐의 간 PGC-1α 와 IGF-1 발현에 미치는 영향

Attenuation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1(PGC-1) alpha and insulin-like growth factor(IGF-1) on the response to caloric restriction in liver of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty Rats

2012년 8월 24일

조선대학교 대학원

의 학 과

신 지 혜

열량공급제한이 OLETF 쥐의 간 PGC-1α 와 IGF-1 발현에 미치는 영향

지도교수 배 학 연

이 논문을 의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2012년 4월

조선대학교 대학원

의 학 과

신 지 혜

신지혜의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 이 병 래 (인)

위 원 조선대학교 교수 배 학 연 (인)

위 원 전북대학교 교수 박 태 선 (인)

위 원 조선대학교 교수 정 종 훈 (인)

위 원 조선대학교 교수 김 상 용 (인)

2012년 6월

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT

Ⅰ. 서론 1

Ⅱ. 대상 및 방법 3

A. 실험동물 3

B. 실험방법 3

C. 혈당의 측정 3

D. RNA 분리 3

E. cDNA 합성 및 중합효소연쇄반응 4

F. 간 조직 효소원의 조제 5

G. G6Pase 활성도 측정 5

H. 혈장 IGF-1과 IGFBP-1 측정 5

I. 간조직의 IGF-1과 IGFBP-1 측정 5

J. 통계분석 6

Ⅲ.결과 7

A. 열량제한에 따른 혈당변화 7

B. 열량제한이 G6Pase 활성도에 미치는 영향 7

C. 열량제한이 PGC-1 mRNA 발현에 미치는 영향 7

D. 열량제한이 PPARα mRNA 발현에 미치는 영향 7

E. 열량제한이 PPARβ mRNA 발현에 미치는 영향 7

F. 열량제한이 PPARɣ mRNA 발현에 미치는 영향 8

G. 열량제한이 IGF-1과 IGFBP-1 발현에 미치는 영향 8

Ⅳ. 고찰 9

Ⅴ. 요약 15

참고문헌 17

표 목 차

Table 1. Primer set 23

Table 2. Blood glucose levels of Caloric-restricted LETO and OLETF Rats 24

도 목 차

Figure 1. G6Pase activity in whole liver homogenates from Caloric-restricted LETO and OLETF rats 25

Figure 2. mRNA levels of PGC-1 in whole liver homogenates from Caloric-restricted LETO and OLETF rats 26

Figure 3. mRNA levels of PPARα in whole liver homogenates from Caloric-restricted LETO and OLETF rats 27

Figure 4. mRNA levels of PPARβ in whole liver homogenates from Caloric-restricted LETO and OLETF rats(FD) 28

Figure 5. mRNA levels of PPARɣ in whole liver homogenates from Caloric-restricted LETO and OLETF rats(FD) 29

Figure 6. Levels of IGF-1 detected by ELISA using whole extracts of livers 15% caloric-restricted rats 30

Figure 7. IGFBP-1 protein amounts in liver of 15% caloric restricted LETO and OLETF rats 31

ABSTRACT

Attenuation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1(PGC-1) alpha and insulin-like growth factor(IGF-1) on the response to caloric restriction in liver of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty Rats

Shin Ji-Hye
Advisor : Prof. Bae Hak-Yeon M.D. Ph.D
Department of Medicine,
Graduate School of Chosun University

Background : PPAR gamma-coactivator 1(PGC-1) is regulated by costimulating the expression of key enzymes of gluconeogenetic pathway. PGC-1 is negatively regulated by insulin like growth factor(IGF-1) dependent pathway. We investigated the response to caloric restriction(CR) on the PGC-1, glucose-6-phosphate(G6Pase) and IGF-1 in liver of diabetic rats.

Method : Diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty(OLETF) rats(male, aged

24 weeks) and non-diabetic Long-Evans Tokushima Otsuka(LETO) rats(male, aged 24 weeks) were used in this study. Liver PPARs and PGC-1 mRNA, IGF-1, insulin-like growth factor binding protein(IGFBP)-1, G6Pase and blood glucose levels were investigated at 3 weeks after the beginning of 15% CR.

Result : The liver PGC-1 mRNA levels were increased to 21% in LETO rats by 15% CR but significant change was not observed in OLETF rats by 15% CR. The difference of PPARs mRNA levels in liver of OLETF and LETO rats were not observed by 15% CR. The liver G6Pase activity was increased to 20% in LETO rats but changes were not significant in diabetic OLETF rats by CR.
In OLETF rats, plasma IGF-1 and IGFBP-1 levels were lower than LETO rats by 40% and 25%, respectively. The plasma IGF-1 level was increased to 20% in OLETF rats by 15% CR but change was not significant in LETO rats by 15% CR. The liver IGF-1 and IGFBP-1 levels were increased to 30% and 42% in OLETF rats by 15% CR but significant change was not observed in LETO rats by 15% CR.

Conclusion : These findings suggest that PGC-1 and IGF-1 control system altered in diabetic OLETF rat liver and decreased IGF-1 expression may have some role in the aberrantly activated gluconeogenesis in diabetes mellitus by PGC-1.

Key word : PGC-1, Caloric restriction, IGF-1, OLETF rats

Ⅰ.서론

혈당조절은 당뇨병 환자의 치료에서 가장 기본적이면서 중요한 요소로서 혈당을 조절하기 위해서 식사요법, 운동요법 및 약물요법이 병행된다. 제2형 당뇨병에서 비만은 조절 가능한 주요 원인 인자로, 인슐린 저항성을 증가시키며, 상당수의 제2형 당뇨병환자들이 비만에 속한다. 당뇨병 치료에 있어 열량제한은 인슐린 감수성을 증가시키고 췌장의 베타세포의 기능을 호전시킴으로서 혈당을 안정화시킬 뿐 아니라 혈액지질량 조절 및 혈관합병증 예방에도 효과적이다(1-3). 비만형 당뇨병 환자에서 혈당과 체중의 조절을 위해 저열량, 저당질 식품으로 구성된 식사요법의 시행은 매우 중요하다(4). 열량제한(caloric restriction)을 하면 수명 연장의 효과가 있다고 알려져 있으며 자유기(free radical)와 당화(glycation)의 감소 및 T 세포 매개성 면역기능을 향상시키는 효과가 있다고 보고되었다(5). 또한 열량제한은, 간내 인슐린 전달체계의 유전자 발현(insulin pathway gene expression)(6)과 포도당 대사에 관여하는 해당성 효소(glycolytic enzyme)의 활동에 영향을 미친다(7). 제 1형 당뇨병과 제2형 당뇨병 모두에서 간의 포도당 신합성은 공복혈당의 증가 및 식후혈당의 증가에 있어서 많은 부분을 기여하는 것으로 알려져 있다. 이에 관여하는 인자로 Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)γ coactivator-1 (PGC-1)가 있으며, 이것은 공복 상태의 간에서 발현이 증가되어 포도당신합성에 중요한 PEPCK, FBPase, G6Pase 유전자의 mRNA 발현을 유도한다. PGC-1은 Glucocorticoid Receptor (GR), PPARα, PPARγ, Retinoid X Receptor (RXR)α, Hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4)α, Liver X Receptor (LXR)α를 포함하는 많은 다른 핵 수용체의 보조 활성인자로 작용하며, 에너지 생산과 이용, 체온 조절, 미토콘드리아 생합성, 횡문근 섬유타입 교체 그리고 근육에서의 당 이용 등 당대사에 관련된 여러 가지 생리적 반응들에 관여한다(8-11). Yoon 등(12)의 연구에 의하면, ad libitum-fed(마음대로 먹인) 쥐에 adeno PGC-1을 투여 하면 대조군의 공복상태에서 보이는 정도의 PGC-1 증가를 보이며 당신생과정의 필수효소인 G6Pase (Glucose-6-phosphatase)와 PEPCK (phosphoenolpyvurate carboxykinase) mRNA가 증가하고 결과적으로 혈당이 증가한다. 또한, 스트렙토조

신을 주사한 제1형 당뇨병 모델 쥐의 간에서 PGC-1의 발현은 증가되어 있으며, 인슐린 수치가 높고 심각한 인슐린 저항성을 보이는 제2형 당뇨병 모델인 ob/ob 쥐에서도 PGC-1의 발현은 증가되어 있다. 당뇨병모델에서의 비정상적인 혈당상태는 IGF-1 과도 관련이 있다고 생각되는데, 제2형 당뇨병환자들에게 IGF-1을 6주간 투여한 연구 결과 혈당과 혈중 인슐린농도를 낮추었으며, 3~4배의 인슐린 감수성을 향상시켰다(13). 또 정상인을 대상으로 IGF-1을 12주 동안 농도별로 투여한 Conover등(14)의 연구에서 IGF-1의 투여 농도가 높을수록 평균혈당과 당화혈색소가 감소하는 것이 확인되었다. 이러한 결과, IGF-1은 체내에서 인슐린과 같이 인슐린 감수성을 증가시켜 당대사를 호전시킬 것으로 생각된다.

이에 저자는 비만형 제2형 당뇨병 모델인 OLETF 쥐에서 정상대조군인 LETO 쥐와 비교하여 열량제한에 따른 간의 PGC-1 과 G6Pase 활성도, IGF-1의 발현을 측정하여 열량제한을 통한 혈당개선과 인슐린 감수성의 증가가 간의 PGC-1, IGF-1의 발현에 미치는 영향을 알아보고자 본 연구를 진행하였다.

II. 대상 및 방법

1. 실험 동물

실험동물은 생후 24주령의 LETO (Long Evans Tokushima Otsuka) 종 흰쥐(체중 500±30 g, 수컷, 혈당 150mg/dl blood 이상)와 제2형 당뇨병 모델인 OLETF (Otsuka Long Evans Tokushima fatty) 종 흰쥐(체중 420±30 g, 수컷, 혈당 110mg/dl blood 이하)를 각각 12마리씩 사용하였다. OLETF 쥐는 5주령에 일본 오츠카 제약회사 (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd, Tokushima, Japan)로부터 공여받았다.

2. 실험 방법

OLETF 쥐는 생후 24주 경구당부하를 시행하여 최고 포도당 농도가 16.7 mmmol/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 ± 2℃)와 명암을 조절한 환경에서 사육되었으며 식이급여량을 15% 제한하여(사료 34g/kg Bw/day) 공급하였다. 이후 시간경과에 따라 3일, 7일, 14일, 21일 후에 공복 시 혈당을 측정하고 각 군에서 5마리씩 희생시켜 간장을 적출하여 간내 PPARs, PGC-1 mRNA, IGF-1, IGFBP-1, G6Pase 활성도를 측정하였다.

3. 혈당의 측정

혈당의 측정은 고형사료를 치우고 최소 8시간이 경과한 후 공복혈당을 오전 9시에 측정하였으며 hexokinase (HK)와 glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) 효소반응을 이용하는 혈당측정 Kit(Boehringer mannheim, Germany)를 사용하여 생화학 자동분석기(Hitachi 747, Japan)로 측정하였다.

4. RNA 분리

RNA 분리는 간조직에 TRI Regant (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 첨가하여 균

질화하고, 0.2 mL chloroform을 첨가하여 잘 혼합한 다음, 실온에서 15분간 방치한 후 4℃에서 12,000 x g로 15분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 침전물에 1mL 75% ethanol을 첨가하여 잘 혼합한 후 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 침전물을 건조시켜서 50μL의 0.1% DEPC 용액을 첨가하여 55~60℃에서 용해시켜 RNA 시료로 사용하였다.

5. cDNA 합성 및 중합효소연쇄반응

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 μL에 primer 2 μL를 넣어 95℃에서 5분 동안 방치한 후 5분 동안 얼음에 보관하고 10,000 rpm에서 5초 동안 원심분리하여 반응액을 침전시켰다. 여기에 DEPC로 처리된 증류수 20 μL, 5 × PCR buffer 10 μL, 0.1M dTT 5 μL, 10 mM dNTP 2 μL, RNAsin 1 μL, reverse transcriptase 1 μL를 넣고 37℃에서 1시간 반응시켜 cDNA를 합성한 다음 이것을 4℃에 보관하였다.

PCR은 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 처리된 증류수 30.5 μL, 10 × PCR buffer 5 μL, 25 mM $MgCl_2$ 6 μL, 10 mM dNTPs 1 μL, forward primer 1 μL, reverse primer 1 μL, cDNA template 5 μL, Taq polymerase (5 U/μL) 0.5 μL를 혼합하였다. PCR 조건은 denaturation과정으로 95℃에서 45초, annealing 과정으로 50℃에서 45초, 그리고 polymerization 과정으로 72℃에서 1분을 설정하여 30 cycle을 거친 다음 마지막으로 72℃에서 10분 동안 반응시킨 다음 -4℃에 보관하였다. PCR로 증폭된 산물을 확인하기 위하여 10 μL의 PCR 산물을 2 μL의 gel loading buffer (0.25% bromophenol blue traking dye in 25% Ficoll)와 혼합하여 1.5% agarose gel에 loading한 후 100 V에서 30분간 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 ethidiume bromide 용액으로 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 1.과 같다.

6. 간 조직 효소원의 조제

간 조직 1g 당 5배의 0.25 M sucrose 용액을 가해 빙냉상태에서 homogenizer (IKA, T-10 basic, Germany)로 균질화한 후 600 × g에서 10분간 원심분리 하여 상층액을 취하였다. 이를 다시 10,000 × g에서 20분간 원심분리하여 mitochondria 분획을 얻고, 상층액은 105,000 × g에서 1시간 동안 초원심분리 (Becjman, Optima TLX-120, USA)하여 cytosol 분획과 microsome 분획으로 분리하였다. Microsome 분획은 0.25M sucrose 용액에 현탁시켜 105,000 × g에서 1시간 동안 다시 초원심분리하여 얻은 침전물을 재현탁시킨 후 glucose-6-phosphatase (G6Pase) 활성도 측정에 사용하였다.

7. Glucose-6-Phosphatase (G6Pase) 활성도 측정

G6Pase 활성도 측정은 Swanson 등의 방법(15)에 따라 일정량의 0.1M Tris-maleate buffer (pH 6.5) 용액에 기질인 0.2M glucose-6-phosphate 및 효소원을 첨가하여 30℃에서 20분간 반응시킨 후, 제단백하고 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이 상층액에 acetate buffer (pH 4.0), ammonium molybdate 용액 및 환원시액을 넣어 발색시킨 다음 680 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성도는 microsomal protein 1mg이 1분당 생성시킨 phosphate의 양으로 나타내었다.

8. 혈장 Insulin-like growth factor (IGF-1)와 binding proetein (IGFBP-1)측정

실험동물의 전혈을 EDTA (10 mg/mL)가 처리된 주사기로 복부 하대정맥에서 채취하여 3,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후, 혈장을 분리하여 분석 시까지 -70℃에서 냉동 보관하였다. 혈장 IGF-1과 IGFBP-1의 농도는 이미 존재하는 ELISA kits (Diagnostic Systems Laboratory, Inc.)를 이용하여 측정하였다(16).

9. 간 조직의 IGF-1과 IGFBP-1 측정

간 조직 1g 을 적출하여 액화질소에 넣어 급속냉동 시킨 후 분쇄하여 균질화 하였다. 이를 냉장해놓은 1 mmol·L^{-1} 의 아세트산과 함께 원심분리 한 후, 상층액을 모아 0.05 mmol·L^{-1} Tris·HCL (PH 7.8)과 혼합하여 중화시킨 후 -70℃에서 냉동 보관하였다. Brodford 방법을 사용하여 총단백량을 구하고, IGF-1 펩티드(peptide)와 IGFBP-1 단백량을 ELISA (Diagnostic Systems Laboratory, Inc.)를 이용하여 측정하였다. DG-3022 type A를 이용하여 IGF-1 축적정도를 최대 450nm에서의 흡광도 변화로 측정하였다.

10. 통계분석

결과는 평균 ± 표준편차로 표기하였고, 통계분석은 SPSS (Statistical package for the social sciences, for windows version 14.0; SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) 통계 프로그램을 이용하였다. 실험군 간 차이는 student's t-test와 ANOVA를 시행하여 검정하였다. 통계학적 유의성은 P 값이 0.05 미만인 경우로 하였다.

III. 결과

1. 열량제한에 따른 혈당변화

LETO 쥐는 실험 시작때 12시간 공복 후 혈당이 5.40 ± 0.31 mmol/L에서 21일 후 5.26 ± 0.34 mmol/L 으로 열량제한 전후의 차이는 없었으며 OLETF 쥐는 실험시작때 12시간 공복 후 혈당이 9.30 ± 0.70 mmol/L에서 21일 후 7.04 ± 0.90 mmol/L로 38.2%의 감소를 보였다($P < 0.05$)(Table 2).

2. 열량제한이 G6Pase 활성도에 미치는 영향

열량공급 제한을 시작하기 전의 간 G6Pase 활성도는 OLETF 군에서 LETO 군에서보다 감소된 소견이 관찰되었으나 통계학적인 차이는 보이지 않았다. 간 G6Pase 활성도는 15% 열량제한 시행 3주후 LETO 군에서 열량제한을 시작하기 전보다 20% 가량 증가하였으나 당뇨가 있는 OLETF 군에서는 열량제한을 시작하기 전과 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig 1).

3. 열량제한이 PGC-1 mRNA 발현에 미치는 영향

열량공급 제한을 시작하기 전의 PGC-1 mRNA 발현은 OLETF 군에서 LETO 군에서보다 증가된 소견이 관찰되었으나 통계학적인 차이는 보이지 않았다. 열량제한 시행 3주 후 LETO 군에서는 열량제한을 시작하기 전보다 간의 PGC-1 mRNA의 발현이 21% 증가되었으나 ($P < 0.05$), OLETF 군에서는 열량제한을 시행하기 전과 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig.2).

4. 열량제한이 PPARα mRNA 발현에 미치는 영향

PPARα mRNA 발현은 두 군 모두에서 열량제한에 따른 변화를 보이지 않았으며 양군 간의 차이도 관찰되지 않았다 (Fig.3).

5. 열량제한이 PPARβ mRNA 발현에 미치는 영향

열량 제한을 시작하기 전의 PPARβ mRNA 발현은 LETO 군에서 OLETF 군에서보다

유의하게 증가된 소견이 관찰되었으나 ($P < 0.05$), 열량제한에 따른 변화는 관찰되지 않았으며, 열량제한 3주후에도 역시 LETO 군에서 OLETF 군에서보다 PPARβ mRNA 발현이 유의하게 증가된 소견이 관찰되었다 ($P < 0.05$)(Fig.4).

6. 열량제한이 PPARγ mRNA 발현에 미치는 영향

열량 제한을 시작하기 전의 PPARγ mRNA 발현은 LETO 군에서 OLETF 군에서보다 유의하게 증가된 소견이 관찰되었으나 ($P < 0.05$), LETO 군에서는 열량제한에 따른 변화는 관찰되지 않았다. 반면에 OLETF 군에서는 열량제한 시작전 PPARγ mRNA 발현이 매우 감소되어 있는 소견을 보였으나 열량제한 3주째에는 23%의 증가를 보였다 ($P < 0.05$). 그러나, 열량제한 3주째 측정한 PPARγ mRNA의 발현은 여전히 OLETF 군에서 LETO 군보다 감소된 소견이 관찰되었다 (Fig.5).

7. 열량제한이 IGF-1과 IGFBP-1 발현에 미치는 영향

열량 제한을 시작하기 전의 혈장 IGF-1, IGFBP-1 수치는 OLETF 군에서 LETO 군에 비해 각각 40% 와 25% 가 낮았다. 15% 열량제한 3주 후 혈장 IGF-1 수치는 OLETF 군에서 20% 상승하였으나, LETO 군에서는 유의한 변화를 보이지 않았다. 열량제한 3주째 OLETF 군에서 간내 IGF-1 과 IGFBP-1 발현은 열량제한 전에 비하여 각각 30%와 42% 증가하였으나, LETO 군에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았다 (Fig.6,7).

Ⅳ. 고찰

당뇨병은 전 세계 모든 나라에서 주목받고 있는 만성 대사성 질환이며 고혈압, 비만, 이상지질혈증, 인슐린저항성 및 이로 인한 대혈관 합병증과 밀접한 연관이 있고, 대부분의 나라에서 사망원인의 5번째 이상을 차지하는 중요한 질환이다(17). 혈당조절은 당뇨병 환자의 치료에서 가장 기본적이면서 중요한 요소로서 혈당이 증가되면 소혈관 및 대혈관 합병증 등의 유발이 증가하는 것으로 알려져 있는데, 혈당을 조절하기 위해서 식사요법, 운동요법 및 약물요법이 병행된다(1-3). 제2형 당뇨병에서 비만은 조절 가능한 주요 원인 인자로 인슐린 저항성을 증가시키며, 상당수의 제2형 당뇨병환자들이 비만에 속한다. 비만형 당뇨병 환자에서 혈당과 체중의 조절을 위해 저열량 식품, 저당질 식품으로 구성된 식사요법의 시행은 매우 중요하다(4). 비만형 당뇨병 환자의 체중을 감소시키면 인슐린에 대한 반응성이 증가되고 췌장의 베타세포의 기능이 호전되어 혈당과 혈액 지질량 조절 및 여러 장기의 항산화효소의 활성도에 변화가 유발되고 혈관합병증 예방에도 효과적이기 때문에 비만형 당뇨병 환자에서 체중 조절은 매우 중요하다(3,18). 에너지 섭취량을 감소시키는 식사요법이 비만형 당뇨병환자의 치료에 우선적으로 시도되며 체중의 변화는 개인의 특성에 따라 다르다(19,20). 영양결핍이 없는 30%의 열량제한이 제2형 당뇨병환자나 동물모델에서 insulin-stimulated glucose uptake를 증가시켜 혈당조절을 용이하게 한다는 것은 잘 알려진 사실이다. Capstick 등(21)의 연구에서 비만형 인슐린 비 의존형 당뇨병 환자에서 식이를 제한시키면 혈당량이 현저히 감소된다고 하였고, Williams 등(22)의 연구에서 식이 제한이 제2형 당뇨병환자의 혈당조절에 도움이 된다고 하였다. 본 연구에 사용한 Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats는 제2형 당뇨병의 동물모델로서 후천적으로 발생한 고혈당(대부분 생후 25주)을 기본으로 만성질환의 경과를 따르며, 비만이 있고 대부분 수컷에서 임상적으로 발병한 당뇨병 및 유전적 성향(다수의 열성유전자가 당뇨병의 발병에 개입함), islet cell hyperplasia, 그리고 당뇨병성 신병증 등이 있다(23,24). 이러한 특징적인 병리학적 모습들이 다른 어떠한 동물 모델보다 인간의 제2형 당뇨병과 가장 비슷하여 연구에 사용되고 있다. 본 실험에

서 15%의 열량공급제한에 의해 비만형 당뇨병 모델인 OLETF 쥐에서 실험시작 때의 혈당이 21일이 지난 후 38.2%의 감소를 보여 열량제한에 따른 혈당개선의 효과는 이전의 보고들과 일치하였다(21,22). 또한 OLETF 쥐가 대조군인 LETO 쥐에 비해 열량제한에 의한 혈당량 저하가 더 크게 나타났기 때문에 당뇨병이 발병된 개체는 정상 상태의 개체에 비해 열량섭취 변화에 의한 혈당량의 변화가 더 클 것으로 생각된다.

원래 OLETF 쥐는 고혈당 상태로 간에서의 당대사와 관련된 효소의 활성도는 LETO 쥐와 다를 것이라는 가정하에 간내 당신생과정에 연관된 효소 중 G6Pase를 확인하였다. 결과 G6Pase 활성도는 OLETF 쥐에서 LETO 쥐에 비해 연구 시작 때 감소되어 있었으나 통계학적 의의는 없었고, 열량제한 3주후 LETO 쥐에서는 20%의 증가를 보인 것에 반해 OLETF 쥐에서는 유의한 변화가 없었다. G6Pase (glucose-6-phosphatase)는 glucose-6-phosphate를 가수분해하여 유리인산염(free phosphate)그룹과 유리당(free glucose moiety)을 만들어 내는 효소이다. 간 내에서 작용하는 이 효소는 당뇨가 없는 정상적인 상태에서 인슐린 분비에 의해 저해되고 glucocorticoid, cAMP 등에 의해 활성화된다(25). 또한, FBPase(fructose 1,6-biphosphatase)와 더불어 당신생 과정의 마지막에 작용하여 혈당을 조절한다. Seo 등(26)의 연구를 보면 당뇨가 있는 OLETF쥐에서 해당작용은 활성화 되어 있고 당신생은 감소되어, G6Pase 나 FBPase 등의 효소가 대조군에 비해 감소된 것이 나타나는데, 이는 본 연구 에서도 마찬가지였으며, OLETF 쥐에서 고혈당에 대한 보상작용에 의해 G6Pase가 충분히 활성화 되지 않은 것으로 생각된다.

이러한 G6Pase 는 Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)γ coactivator-1 (PGC-1) 이라는 핵 수용체 보조 활성인자에 의해 발현이 증가되는데, Yoon 등(12)의 연구에 의하면, ad libitum-fed 쥐에 adeno PGC-1을 투여 하면 대조군의 공복상태에서 보이는 정도의 PGC-1 증가를 보이며 당신생과정의 필수효소인 G6Pase 와 PEPCK (phosphoenolpyvurate carboxykinase) mRNA가 증가하고 결과적으로 혈당이 증가한다고 하였다. 또한, 스트렙토조신을 주입한 제1형 당뇨병 모델인 쥐의 간에서 PGC-1은 높게 발현되며, 심각한 인슐린 저항성을 보이는 제2형 당뇨병 모델인 ob/ob 쥐에서도 PGC-1은 상승되어 있다. PGC-1은 Hepatocyte

nuclear factor 4 (HNF4)α에 작용하여 간세포에서 HNF1α를 유도하고, 이는 G6Pase promoter에 존재하는 HNF1α 결합 부위에 작용하여 활성화가 일어난다고 하였으며, 또한 PGC-1은 FoxO1에 결합하여 G6Pase promoter 내의 IRU를 통해 활성화한다고 하였다(27,28). 이처럼 PGC-1은 당 대사에 관여하여 공복 상태의 간에서 발현이 증가됨으로써 당신생에 중요한 PEPCK, FBPase, G6Pase 유전자의 mRNA 발현을 유도한다. PGC-1은 Glucocorticoid Receptor (GR), PPARα, PPARγ, Retinoid X Receptor (RXR)α, HNF4α, Liver X Receptor (LXR)α를 포함하는 많은 다른 핵 수용체의 보조 활성인자로 작용하며 에너지 생산과 이용, 체온 조절, 미토콘드리아 생합성, 횡문근 섬유타입 교체 그리고 근육에서의 당 이용 등 당대사에 관련된 여러 가지 생리적 반응들에 관여한다. 골격근세포에서 미토콘드리아 생합성에 영향을 주고 인슐린에 민감한 당수송체 (GLUT-4, glucose transporter 4)의 유전자 표현을 증가시켜 당 섭취를 증가시키며 간에서는 포도당신합성에 관여한다(8-11). 인슐린 저항성 치료제인 thiazolidinediones의 수용체이며 지방형성을 촉진시키는 PPARγ의 보조 활성인자로 작용하여 PPARγ의 전사활성을 증가시키며 미토콘드리아 내 지방산 베타산화 (fatty acid beta oxidation)에 관련된 유전자들의 전사활성을 조절하는 PPARα의 보조 활성인자이다(29). 당뇨병에서 PGC-1의 당섭취와 대사에 대한 효과는 미토콘드리아 산화의 비율이 당 섭취에 영향을 주기 때문에 중요하다.

본 연구에서는 제2형 당뇨병의 동물 모델인 OLETF 쥐에서 15%의 열량공급 제한 후 간의 PPARs와 PGC-1 mRNA, IGF-1, IGFBP-1 의 발현과 G6Pase 의 활성도를 측정하여 열량제한에 따른 혈당개선과 인슐린감수성의 증가가 간 내 PGC-1, IGF-1 그리고 G6Pase 활성도에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 그 결과 간에서의 PGC-1과 PPARs mRNA의 발현을 보면 공복시 PGC-1 mRNA 발현은 OLETF 쥐에서 LETO 쥐보다 증가되어 있는 소견을 보였으나 통계학적인 의의는 없었으며 열량제한 3주 후 LETO 쥐에서는 실험시작 때와 비교하여 21%의 발현 증가를 보였으나 OLETF 쥐에서는 열량제한에 따른 변화는 관찰되지 않았다. 또한 PPARα나 PPARβ mRNA의 발현도 역시 열량제한에 따른 변화는 보이지 않았다. PPARγ mRNA의 발현은 실험시작 전 LETO 쥐에서 OLETF 쥐보다 유의하게 증가되어 있는 소견이 관찰되었으나 LETO

쥐에서는 열량제한에 따른 변화는 보이지 않았고 OLETF 쥐에서는 열량제한을 시행함에 따라 점차적으로 증가되어 열량제한 3주째는 LETO 쥐의 PPARγ 의 발현정도와 거의 비슷한 정도에 이르렀다. 이러한 결과는 열량제한과 PGC-1 및 PPARs 의 관계를 실험한 Kim 등(30)의 연구 결과와 일치하였다. 이와 같이 열량공급제한은 인슐린 신호체계에 큰 효과를 나타내며, 이는 열량제한이 인슐린과 인슐린양성장인자 (IGF-1)의 혈중농도를 감소시키고, 이로 인해 간에서 Akt의 인산화 저하와 근육에서 PI3K 발현의 저하, 그리고 FOXO (forkhead box "other")의 발현증가가 일어나고 이러한 증가된 FOXO의 발현이 PGC-1의 발현을 증가시킨다고 생각해 볼 수 있다(31,32). FOXO는 또한 IGF-1 pathway의 중요한 인자로 생각되며, Skurt 등(33)의 연구에서 처음으로, FOXOs 는 인슐린 신호체계에 따라 심근세포에서 표현된다고 하였다. LETO 쥐와는 달리 OLETF 쥐에서는 열량제한 후 혈당의 감소에도 불구하고 PGC-1은 변화를 보이지 않았는데, 이를 보면 당뇨쥐에서는 열량제한에 따른 혈당의 감소가 간의 포도당신합성에 미치는 영향이 명확하지 않다. 반면 OLETF 쥐에서 열량제한 후 PPARγ mRNA의 발현은 매우 큰 증가를 보였는데, 이는 열량제한에 따른 인슐린 감수성의 개선이 PPARγ의 활동성을 증가시키며 제2형 당뇨병에서 보이는 비정상적인 혈당상태에 영향을 미친다고 생각된다.

이전의 연구들에서 낮은 수치의 IGF-1은 당뇨병과 연관이 있고 이는 주로 IGFBP 비의존성 유리 IGF-1의 역할이 주가 된다고 하였다. 본 연구에서도 이와 마찬가지로 열량제한을 시작하기 전의 혈장 IGF-1 과 IGFBP-1 수치는 OLETF 군에서 현저히 낮았다. 그러나 15% 열량제한 3주 후 혈장 IGF-1 수치는 OLETF 군에서 20% 상승하였고 LETO 군에서는 유의한 변화를 보이지 않았다. 열량제한 3주째 OLETF 군에서 간 내 IGF-1 과 IGFBP-1 발현 역시 열량제한 전에 비하여 각각 30%와 42% 증가하였으나 LETO 군에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았다. IGF는 인슐린과 약 50%의 아미노산이 동일한 성장인자로 간, 신장 등 여러조직에서 생산되며 간, 근육, 지방 조직에 주로 작용하는 인슐린과 달리 거의 모든 조직에 작용하여 세포의 대사와 증식 및 성장조절에 중요한 역할을 한다(34). IGF-1은 체내에서 인슐린에 비해 비교적 높은 농도로 순환하고 혈청 농도는 성장호르몬과 인슐린의 영향을 받으며 생산은 간의 인슐린 농도에 영향을 받는다. 간질액에 존재하는 IGF-1은 IGF-1수용

체와 인슐린/IGF-1 혼성 (hybrid) 수용체에 결합하는데 혼성수용체는 인슐린에 비하여 20배 더 높은 친화력으로 IGF-1와 결합하여 세포내에서 인슐린 수용체와 관련된 신호체계를 활성화시킨다(35).

Ferry등(13)의 연구에서 제2형 당뇨병환자들에게 IGF-1을 6주간 투여한 결과 혈당과 혈중 인슐린농도를 낮추었으며 3~4배의 인슐린 감수성을 향상시켰다. 또 정상인을 대상으로 IGF-1을 12주 동안 농도별로 투여한 Conover등(14)의 연구에서 IGF-1의 투여 농도가 높을수록 평균혈당과 당화혈색소가 감소하는 것이 확인되었다. 이러한 결과, IGF-1은 체내에서 인슐린과 같이 인슐린 감수성을 증가시켜 당대사를 호전시킬 것으로 생각된다. IGF-1의 대부분은 IGFBPs (IGFBP 1~6)와 결합하여 순환한다. IGFBP와의 결합은 IGF-1의 반감기를 증가시킴으로써 혈중 농도를 조절하고, 저장소로서의 역할을 하며 IGF-1이 모세혈관을 통과하여 인슐린 수용체에 결합하거나 특정 조직에 접근하는 것을 제한함으로써 IGF-1의 생화학적 활성을 조절한다. 이중 IGFBP-3는 90% 이상의 IGF-1과 결합하여 순환저장소에 격리시킴으로써 혈중 유리 IGF-1을 감소시키며 양에 있어서 IGF-1과 음의 상관관계를 갖는다(36). 당뇨병과 IGF-1과의 관계에 대한 많은 연구가 있었으며 이중 제1형과 제2형 당뇨병 환자들에서 연령별로 IGF-1을 측정한 Tan 등(37)의 연구에서는 제2형 당뇨병에서 제1형 당뇨병보다는 감소정도가 낮지만 모두에서 IGF-1농도가 일반인에 비해 낮게 측정되었으며 Isley 등(38)도 비슷한 결과를 보고하였다. Sandhu 등(39)의 연구에서 45-60세의 정상인 615명을 대상으로 5년간 추적 관찰한 결과, 혈중 IGF-1의 농도는 내당능 장애나 제2형 당뇨병의 위험과 연관 있었고 식후 2시간 혈당과 음의 상관관계가 있다고 하였다. 또한, 40대 2형 당뇨병환자와 정상인을 대상으로 한 Nam 등(40)의 연구에서 IGF-1이 감소하거나 IGFBP-3가 증가할수록 체질량지수는 높았고 공복혈당이 증가하였다. 성인 당뇨병 환자 387명을 대상으로 혈청 IGF-1을 측정한 Srinivas 등(41)의 연구에서도 65세 미만에서 낮은 IGF-1 수치와 당뇨병은 상관관계가 있었으나, 65세 이상에서는 상관관계가 없어 젊은 당뇨병 환자에서 IGF-1이 음의 상관관계가 있음을 결론지었다. 또한, IGF-1이 심근세포의 고사를 지연시켜 세포성장과 생존을 돕는다는 것은 알려진 사실이며, Naoki 등(42)의 연구에서는 OLETF쥐의 심근세포에서 정상대조군인 LETO쥐에 비해 IGF-1과

phospho-Akt 의 표현이 감소되어 있음을 확인하였다. 이와 마찬가지로, 본 연구의 시작때에는 OLETF 쥐에서 LETO 쥐에 비해 IGF-1의 발현이 현저히 감소되어 있었으며 열량제한 21일 후 LETO 쥐의 IGF-1 수치에는 미치지 못하지만, OLETF 쥐에서 IGF-1의 상당한 증가가 관찰되었다. 이미 여러 연구에서 확인된 결과, 정상상태에서의 열량제한은 인슐린과 IGF-1의 혈중농도를 감소시키나, OLETF 쥐에서는 이와 다른 결과를 보였다. 이미 발생되어 있는 제2형 당뇨병에서 이러한 변화된 PGC-1과 IGF-1의 발현은 비만한 제2형 당뇨병환자에서 비정상적으로 상승되어 있는 포도당신합성에 관여할 가능성이 있으며, 열량제한에 반응하여 증가한 IGF-1은 혈당조절을 용이하게 하는데 어느정도 영향을 미칠것이라고 생각된다.

본 연구의 제한점으로는 첫째, 연구기간이 비교적 짧은 3주간의 단기간으로 시행되어 장기간의 열량제한에 대한 영향을 판단하기 힘들며 둘째, 열량제한을 시행하지 않은 OLETF 쥐의 대조군이 없어 이러한 연구 결과가 단지 열량제한으로 인한 결과인지 가령 (aging) 등의 다른 인자가 관여된 것인지에 대해 명확하게 알 수 없으며 셋째, 간 이외의 근육이나 지방조직에서의 PGC-1과 PPARs 활성도, IGF-1 등을 측정하지 않아 열량제한에 따른 다른 장기에서의 변화를 관찰 할 수가 없으며 넷째, 단면적인 연구의 특성상 혈당의 개선과 PGC-1과 PPARs 활성도, IGF-1 등의 인자들 간의 인과관계를 설명할 수 없다는 점이 있다.

결론적으로 이상의 연구결과에 따르면, 열량제한에 따른 PGC-1과 IGF-1의 발현은 정상 대조군인 LETO 쥐와 당뇨병 모델군인 OLETF 쥐에서 서로 다르게 나타나며 제2형 당뇨병모델인 OLETF 쥐에서의 PGC-1 이상발현과 IGF-1 발현감소는 당뇨병의 병태생리 중의 하나인 증가된 포도당신합성에 관여할 것이라고 추측할 수 있겠다. OLETF 쥐에서 15% 열량제한에 반응하여 IGF-1 이 증가한 것은 정상상태 일 때보다 훨씬 더 열량제한에 민감하게 반응한 것으로, 비만한 제2형 당뇨병환자에서 열량제한이 여러 기전을 통해 혈당조절을 용이하게 하며 그중 IGF-1의 역할도 있는 것으로 추측할 수 있겠다.

V. 요약

연구배경

제 1형 당뇨병과 제2형 당뇨병 모두에서 간의 포도당신합성은 공복혈당의 증가 및 식후혈당의 증가에 있어서 많은 부분을 기여하는 것으로 알려져 있다. 이중 포도당신합성에 관여하는 인자로 Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)γ coactivator-1 (PGC-1)에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 저자는 비만형 제2형 당뇨병 모델인 OLETF 쥐에서 열량제한에 따른 간의 PGC-1 과 G6Pase, IGF-1 의 발현을 측정하여 열량공급제한을 통한 혈당 개선과 인슐린감수성의 증가가 간의 PGC-1과 IGF-1에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

방법

LETO 쥐를 정상대조군으로, OLETF 쥐에서 경구당부하검사를 시행하여 당뇨군으로 정하였으며 두 군 모두 24주령의 수컷 흰쥐를 연구에 사용하였다. 식이급여량을 15% 제한하여 3주간 공급하였으며, 이후 매주 체중과 공복혈당을 측정하고 RT-PCR 법을 이용하여 간의 PPARs 와 PGC-1 mRNA 를 측정하고 ELISA 를 이용하여 IGF-1과 IGFBP-1을, 그리고 효소원을 이용하여 G6Pase 활성도를 측정하였다.

결과

15% 열량 제한시 간의 PGC-1 mRNA 수치는 LETO 쥐에서 21%까지 상승하였으나, OLETF 쥐에서는 유의한 변화를 보이지 않았다. 15% 열량 제한시 간의 PPARs mRNA 수치는 LETO 쥐와 OLETF 쥐에서 차이가 없었다. 또, 간의 G6Pase 활성도는 LETO 쥐에서 20% 가량 상승하였으나 당뇨가 있는 OLETF 쥐에서는 유의한 변화를 보이지 않았다.

OLETF 쥐에서 혈장 IGF-1과 IGFBP-1 수치는 LETO 쥐에 비해 각각 40% 와 25% 가량 낮았다. 15% 열량 제한시 혈장 IGF-1 수치는 OLETF 쥐에서 20% 상승하였으나, LETO 쥐에서는 유의한 변화를 보이지 않았다. 15% 열량 제한시 OLETF 쥐에서 간의 IGF-1과 IGFBP-1 수치는 30% 와 42% 로 증가하였으나, LETO 쥐에서는 유의한 변화

가 관찰되지 않았다.

결론

열량제한에 따른 PGC-1과 IGF-1의 발현은 정상대조군인 LETO 쥐와 당뇨병모델군인 OLETF 쥐에서 서로 다르게 나타났다. 정상상태에서 간의 PGC-1 은 열량제한 시 증가하나 OLETF 쥐에서는 반응이 없었다. 이에 반해 IGF-1은 OLETF 쥐에서 15%의 열량제한에 상당한 증가를 보였다. 이는 원래 OLETF 쥐에서 IGF-1 이 낮은 수치로 유지되며 열량제한에 민감하게 반응하여 상승하는 것으로, 15% 열량제한에 변화가 없는 LETO 쥐와 상반되는 결과이다. 이는 당뇨병이 있는 OLETF 쥐의 간에서 PGC-1과 IGF-1의 조절시스템이 변화되었다는 것을 의미하며 이러한 변화된 IGF-1과 PGC-1의 발현은 비만한 제2형 당뇨병환자에서 비정상적으로 활성화된 포도당신합성에 관여할 가능성이 있는 것으로 생각되고, 비만한 제2형 당뇨병환자에서 적절한 열량제한이 여러 기전을 통해 혈당조절을 용이하게 하며 그중 IGF-1의 상승도 상당한 영향을 미칠 것 이라고 생각해 볼 수 있겠다.

참고 문헌

1. Simonen P, Gylling H, Miettinen TA. Acute effects of weight reduction on cholesterol metabolism in obese type 2 diabetes. Clin Chim Acta 316:51-61, 2002.

2. Kuwajima m, Kuroda I, Mizuno A, Murakami T, Shima K. The preventive effect of caloric restriction and exercise training on the onset on NIDDM on a rat model. Nutr Res 19:401-13, 1999.

3. Ostenson CG. The pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. an overview. Acta Physiol Scand Mar 171(3):241-7, 2001.

4. Muls E. Nutrition recommendations for the person with diabetes. Clin nutr 17(2):18-25, 1998.

5. 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. Springer Verlag, Berlin: 198-206, 1999.

6. 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 skeleral muscle and liver of normal and long-lived GHR-KO mice. Experiment Gerontol 40:679-84, 2005.

7. 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.

8. Vega RB, huss JM, Kelly DP. The coactivator PGC-1 cooperates with Peroxisome proliferator activated receptor a in transcriptional control of

nuclear genes ending mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. Mol Cell Biol 20:1868-76, 2000.

9. Knutti D, Kaul A, Kralli A. A tissue-specific coactivator of steroid receptors, identified in a fuctional genetic screen. Mol Cell biol 20:2411-22, 2000.

10. Delerive P, Wu Y, Burris TP, Chin WW, Suen CS. PGC-1 functions as a transcriptional coactivator for the reinoid X receptors. j Biol Chem 277:3913-7, 2000.

11. Oberkofler H, Schlaml E, Krempler F, Parsch W. potentiation of liver X receptor transcriptional of liver X receptor transcriptional activity by peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α. Biochem J 371:89-96, 2003.

12. 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.

13. Ferry JR, Cerri RW, Cohen P. Insulin-like growth factor binding proteins : new proteins, new functions. Hrom Res 51:53-67, 1999.

14. Conover CA, Clarkson JT, Bale LK. Effect of glucocorticoid on insulin-like growth factor (IGF) regulation of IGF-binding protein expression in fibroblasts. Endocrinology 136:1403-10, 1995.

15. Swanson MA. Phosphatases of liver. 1. Glucose-6-phosphatase. J Biol chem 184(2): 647-59, 1950.

16. Assy N, Paizi M, Gaitini D, Baruch Y, Spira G. Clinical implication of

VEGF serum levels in cirrhotic patients with or wothout portal hypertension. Wold J Gastroenterol 5:296-300, 1999.

17. WHO. Preventation of diabetes mellitus. Technical Report Series. No.844. Geneva, 1994.

18. Kreisberg RA. Diabetic dyslipidemia. Am J Cardiol 82:67-73, 1998.

19. Niemeijer-Kanters SD, banga JD, Erkelens DW. Lipid-lowering therapy in diabetes mellitus. Neth J Med 58:214-22, 2001.

20. Heilbronn LK, Noakes M, Clifton PM. Effect of energy restriction, weight loss, and diet composition on plasma lipids and glucose in patients with type 2 diabetes. Diabetes Care 22:889-95, 1999.

21. Capstick F, Brooks Ba, Burns CM, Zilkens RR, Steinbeck KS, Yue DK. Very low calorie diet(VLCD): a useful alternetive in the treatment of the obese NIDDM patient. Diabetes Res Clin Pract 36:105, 1997.

22. Williams KV, Mullen ML, Kelly 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, 1998.

23. Kawano K, Hirashima S, Mori S, Natori T. OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) rat: a new NIDDM rat strain. Diabetes Res Clin Pract. 24:317-20, 1994.

24. Kawano K, Hirashima S, Mori S, Kurosumi M, Saitoh Y, Natori T. Spontaneus long-term hyperglycemia rat with diabetic complications: Ostuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) strain. Diabetes. 41:1422-28, 1992.

25. Barzilai N, Rossetti L. Role of glucokinase and glucose-6-phosphatase in

the acute and chronic regulation of hepatic glucose fluxes by insulin. J biol Chem 268(33): 25019-25, 1993.

26. Seo E, Park EJ, Park MK, Kim DK, Lee HJ, Hong SH. Differential expression of metabolism-related genes in liver of Diabetic obese rats. Korean J Physiol pharmacol 14: 99-103, 2010.

27. Lin B, Morris DW, Chou JY. Hepatocyte nuclear factor 1alpha is an accessory factor required for activation of glucose-6-phosphatase gene transcription by glucocorticoids. DNA cell Biol. 17: 967-774, 1998.

28. Streeper RS, Eaton EM, Ebert DH, Champman SC, Svitek CA. Hepatocyte nuclear factor-1 acts as an accessory factor to enhance the inhibitory action of insulin on mouse glucose-6-phosphatase gene transcription. Proc Natl acad Sci USA. 95: 9208-13, 1998.

29. Koo SH, Satoh H, Herzig S, Lee CH, Hedrick S, Kulkarini 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(5): 530-4, 2004.

30. Kim SY, Lim JH, Bae HY, LEE BR. Effect of caloric restriction on the expression of PGC-1 and PPARs mRNA in liver of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty Rats. Diabetes 30(3): 161-9, 2006.

31. 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.

32. Tsuchiya T, Dhahbi JM, Cui X, Mote PL, Bartke A, Spindeler SR. Additive regulation of hepatic gene expression by dwarfism and calroric restriction. Physiol Genomics 17:307-15, 2004.

33. Skurk C, Izumiya Y, Maatz H, Razeghi P, Shiojima I, Sandri M, Sato K, Zeng L, Schiekofer S, Pimentel D, Lecker S, Taegtmeyer H, Goldberg AL, Walsh K. The FOXO3a transcription factor regulates cardiac myocyte size downstream of AKT signaling, J. Biol Chem 280: 20814-23, 2005.

34. Stewart CE, Rotwein P. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. Physiol Rev 76:1005-26, 1996.

35. RH IGF-1 in NIDDM Study Group. Evidence from a dose ranging study that recombinant insulin-like growth factor-1 (RhIGF-1) affectively and safely improves glycemic control in non-insulin dependent diabetes mellitus. Diabetes 45(2):27, 1996.

36. Katz LEL, Rosenfeld RG, Cohen P. Clinical significance of insulin-like growth factor biding proteins(IGFBPs). Endocrinologist 5:36-43, 1995.

37. Tan K, Baxter RC. Insulin-like growth factor I levels in adult diabetic patients: The effect of age. J Clin Endocrinol Metab 63:651, 1986.

38. Isley WL, Underwood LE, Clemmons DR: Dietary components that regulate serum somatomedin-C concentration in humans. J clin Invest 71:175, 1983.

39. Sandhu MS, Heald AH, Gibson JM, Cruickshank JK, Dunger DB, Wareham NJ. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-1 and development of glucose intolerance: A prospective obcervational study. Lancet 359:1740-45, 2002.

40. Nam JS, Kong JH, Noh TW, Kim CS, Park JS, Kim HJ, Choi YK, Lim JW, Ahn CW. Genetic polymorphism of insulin-like growth factor binding protein-3(IGFBP-3) promoter gene in Type 2 DM patients. Clin Diabetes

7(2):169-180, 2006.

41. Srinivas T, Anoop S. Association between serun IGF-1 and diabetes among U.S adults. Diabetes care: 33(10):2257-59, 2010.

42. Naoki M, Toyoki M, Oyama Jl, Yosihiro H, Koji M. Improving insulin sensitivity via activation of PPAR-r inceases telomerase activity in the heart of OLETF rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol 297: 2188-95, 2009.

Table 1. Primer set

Genes	Sequence	
PGC-1	sense	5'-CACGCAGCCCTATTCATTGTTCG-3'
	antisense	5'-GCTTCTCGTGCTCTTTGCGGTAT-3'
PPAR α	sense	5'-TTCGGAAACTGCAGACCT-3'
	antisense	5'-TTAGGAACTCTCGGGTGAT-3'
PPAR β	sense	5'-CAGACCTCTCCCAGAATT-3'
	antisense	5'-AAGCGGCAGTACTGACACTTG-3'
PPAR γ	sense	5'-TAGGTGTGATCTTAACTGTCG-3'
	antisense	5'-GCATGGTGTAGATGATCTCA-3'
GAPDH	sense	5'-CCCATCACCATCTTCCAGGAGCGAG-3'
	antisense	5'-TGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGCTC-3'

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

Weeks	Blood glucose level (mg/100 mL)	
	LETO	OLETF
0	97.0 ± 5.2	167.3 ± 12.4
1	96.4 ± 3.5	148.6 ± 16.2
2	92.5 ± 4.6	132.4 ± 13.3*
3	94.8 ± 5.8	126.6 ± 15.8*

Data are means ± SE, n=5.

* : $P < 0.05$ vs. LETO group

Figure 1. Glucose-6-phosphatase (G6Pase) activity in whole liver homogenates from Caloric-restricted LETO and OLETF rats. Values are means ± SD, n = 5. Bars without a common letter differ, $P < 0.05$.

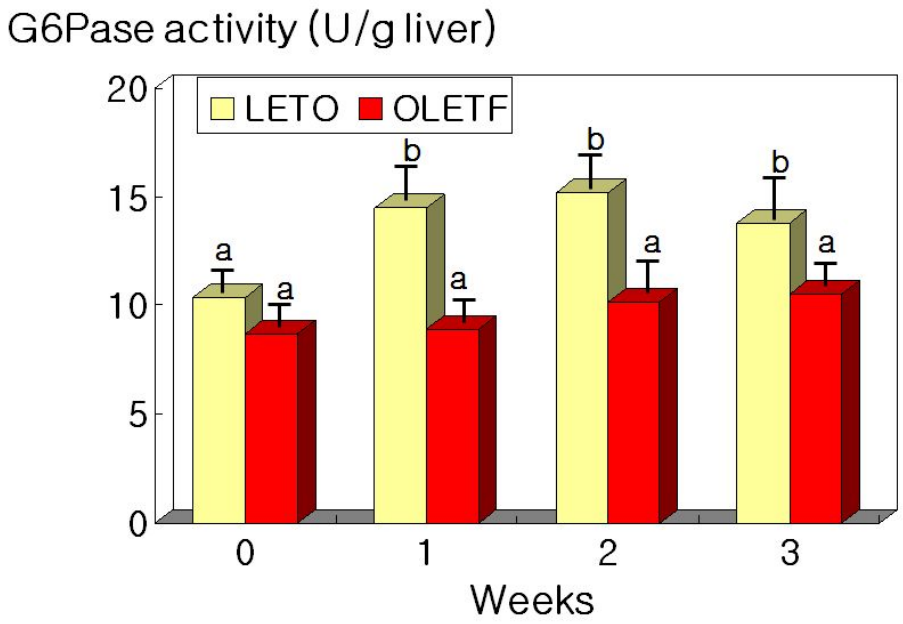


Figure 2. mRNA levels of PGC-1 in whole liver homogenates from Caloric-restricted LETO and OLETF rats. Data are the ratio of the G3PDH mRNA to PGC-1 mRNA. The top portion of each figure is a gel representative of n = 3/group. Bars without a common letter differ, $P < 0.05$.

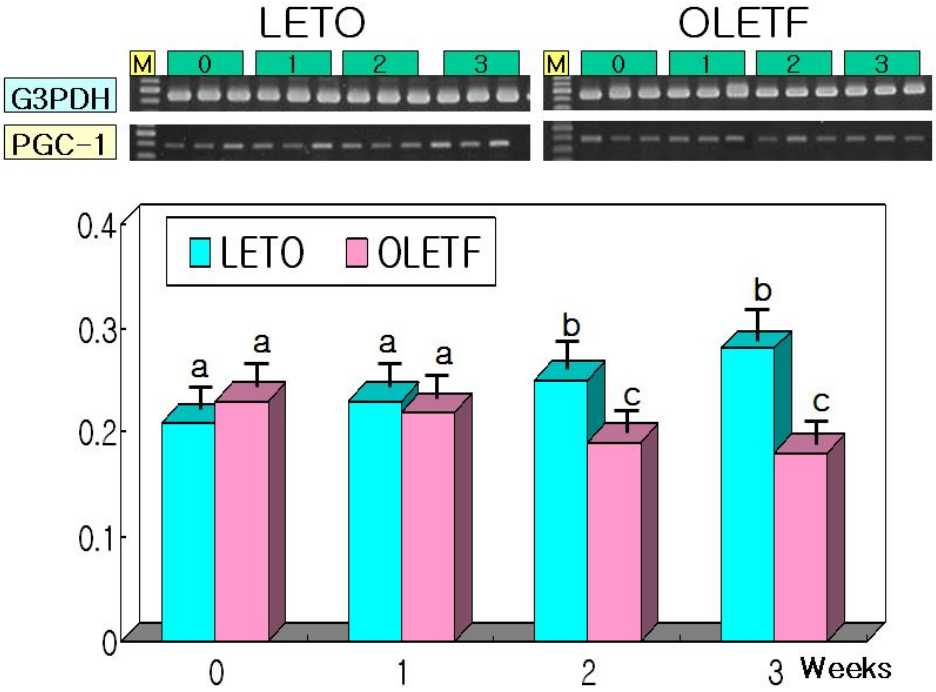


Figure 3. mRNA levels of PPARα in whole liver homogenates from Caloric-restricted LETO and OLETF rats. Data are the ratio of the G3PDH mRNA to PPARα mRNA. The top portion of each figure is a gel representative of n = 3/group. Bars without a common letter differ, $P < 0.05$.

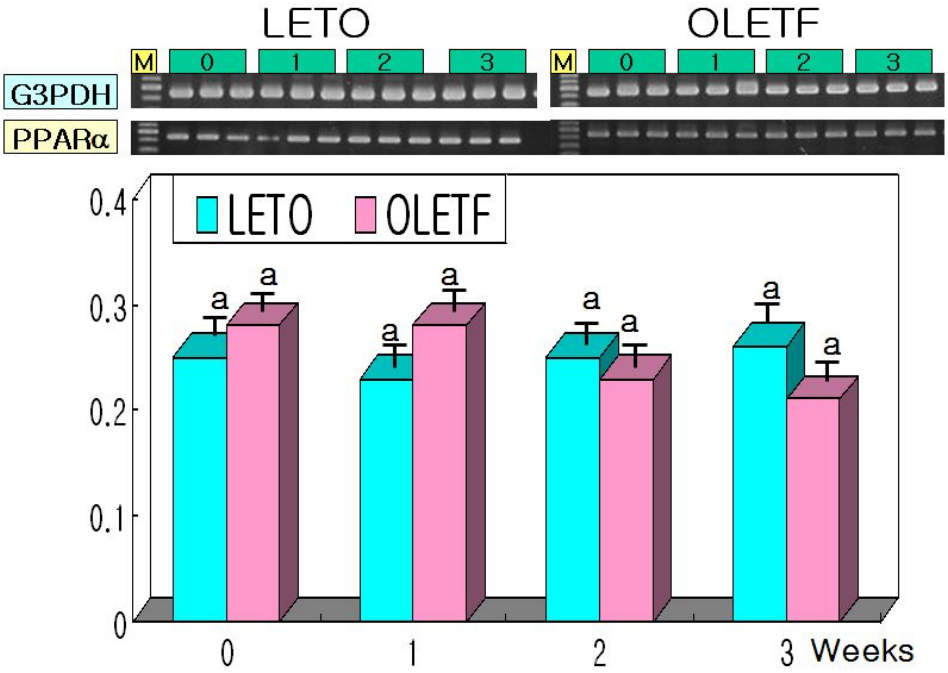


Figure 4. mRNA levels of PPARβ in whole liver homogenates from Caloric-restricted LETO and OLETF rats(FD). Data are the ratio of the G3PDH mRNA to PPARβ mRNA. The top portion of each figure is a gel representative of n = 3/group. Bars without a common letter differ, $P < 0.05$.

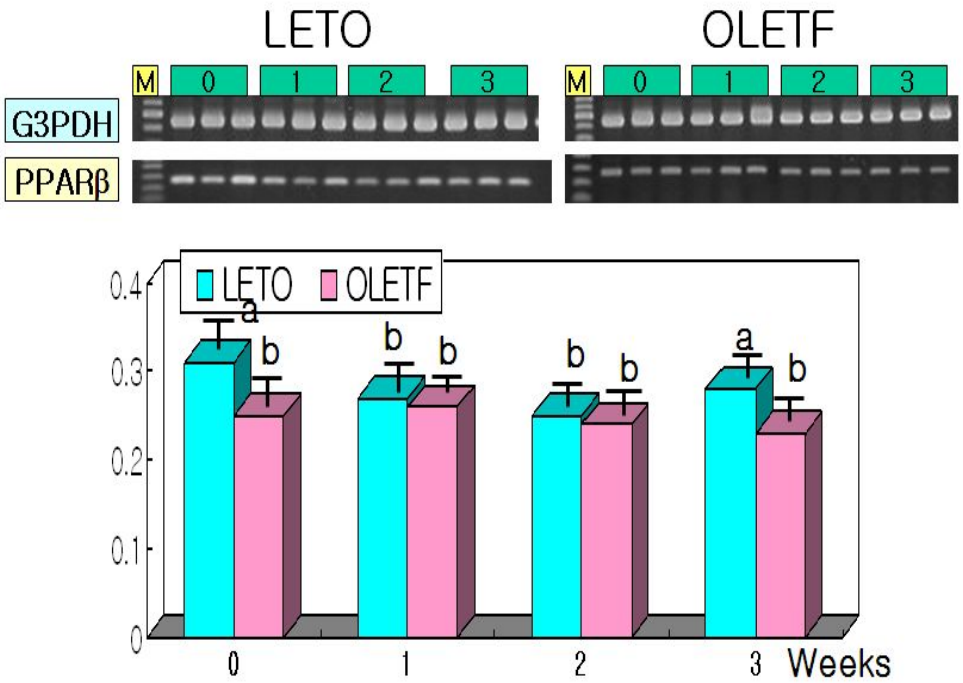


Figure 5. mRNA levels of PPARγ in whole liver homogenates from Caloric-restricted LETO and OLETF rats(FD). Data are the ratio of the G3PDH mRNA to PPARγ mRNA. The top portion of each figure is a gel representative of n = 3/group. Bars without a common letter differ, $P < 0.05$.

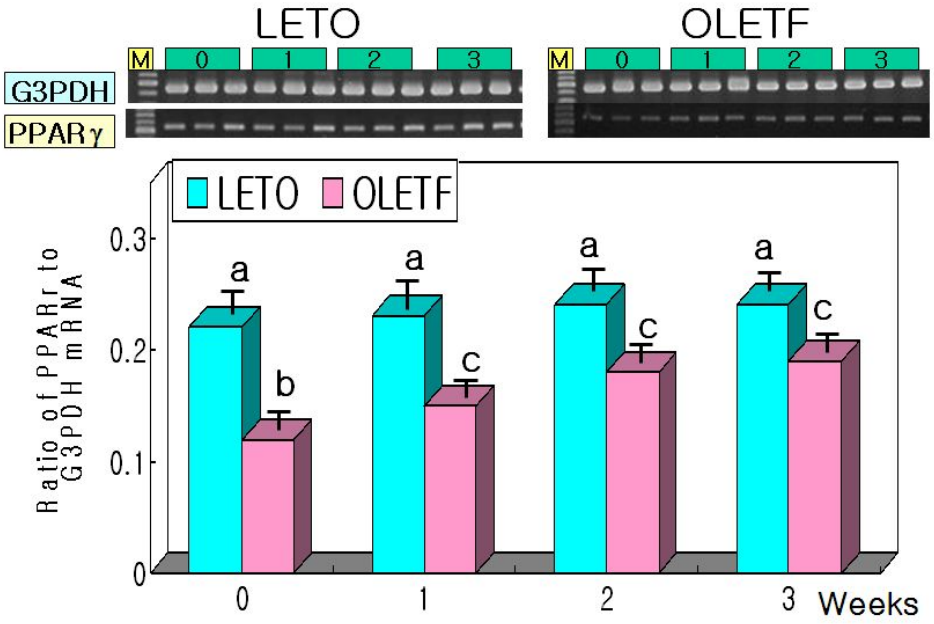


Figure 6. Levels of Insulin like growth factor-1(IGF-1) detected by ELISA using whole extracts of livers 15% caloric-restricted rats. Values are mean ± SD, n = 5. Bars without a common letter differ, $P < 0.05$.

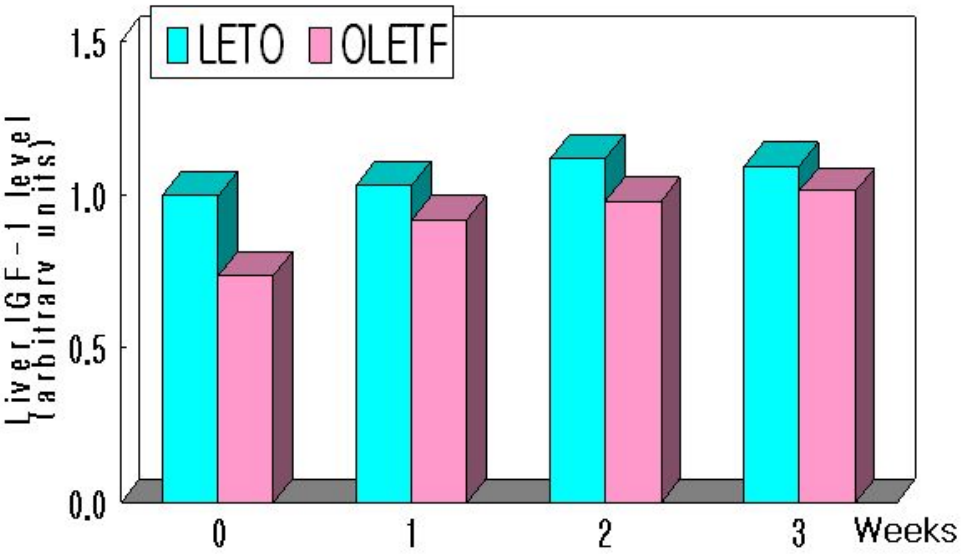
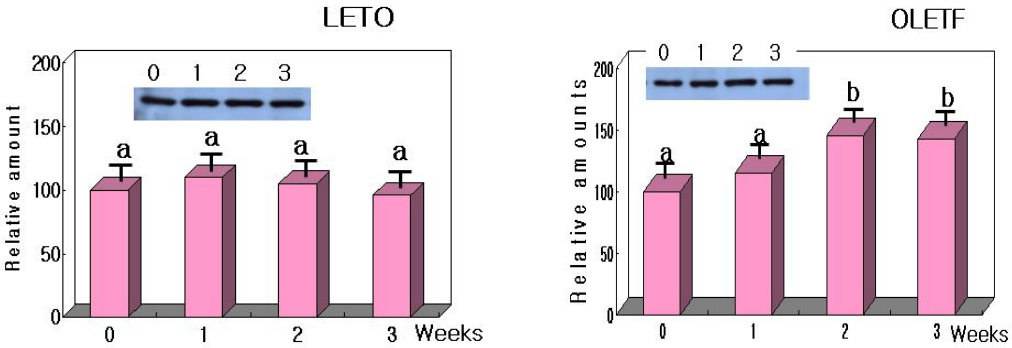


Figure 7. IGFBP-1 protein amounts in liver of 15% caloric restricted LETO and OLETF rats. Values are mean ± SD, n = 5. Bars without a common letter differ, $P < 0.05$.



저작물 이용 허락서

학 과	의학과	학 번	20107438	과 정	박사
성 명	한글: 신지혜 한문 : 辛至彗 영문 : Shin Ji-Hye				
주 소	광주시 남구 풍암동 동부센트레빌 101-1601				
연락처	E-MAIL : ultrasinji@naver.com				
논문제목	한글: 열량공급제한이 OLETF 쥐의 간 PGC-1α 와 IGF-1 발현에 미치는 영향 영어:Attenuation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1(PGC-1) alpha and insulin-like growth factor(IGF-1) on the response to caloric restriction in liver of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(O) 반대( )

2012 년 07 월 02 일

저작자: 신 지 혜 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하