

알코올 및 고콜레스테롤 식이로 유도된 흰쥐의 지방간에서 지방산 결합단백질의 역할 및 특성*

김혜경 · 권영아* · 노숙령* · 함영태**

한서대학교 식품생물공학과, 충양대학교 식품영양학과,* 중앙대학교 생명공학과**

The Role of Fatty Acid Binding Protein in the Fatty Liver Induced by Alcohol or High Cholesterol Diet in Rats

Kim, Hye Kyung · Kwon, Young A* · Rho, Sook Ryoung* · Hahn, Young Tae**

Department of Food & Biotechnology, Hanseo University, Chungnam 356-820, Korea

Department of Food and Nutrition, * Biotechnology, ** Chungang University, Kyungido 456-756, Korea

ABSTRACT

There is a marked increase in geriatric disease, especially liver disease, due to the continuous increase in alcohol and fat consumption. Since the fatty liver, induced by alcohol or fat, is basically from abnormalities in the lipid metabolism, it is possible that fatty acid binding protein(FABP) which is related to the fatty acid metabolism may also be abnormal in these livers. FABP is a small molecular weight protein family present in cytosol in high concentration. It has been proposed as a fatty acid transfer protein and as a binding protein responsible for controlling intracellular free fatty acid concentration. In this research, we have examined the relationship between liver FABP and fatty liver induced by alcohol or high cholesterol diet. Rats were fed one of either semipurified liquid diets; control diet containing 65% carbohydrate, 20% protein, and 15% fat or high cholesterol diet containing 1%(w/w) cholesterol or alcohol diet containing 37% of alcohol instead of carbohydrate. After 5 weeks of feeding period, all rats received commercial chow diet for 5 weeks to examine recovery effect. Liver and blood samples were collected at 0, 1, 3, 5 and 10 weeks to analyze lipid compositions. FABP was purified from liver cytosol and injected to rabbit to obtain antiserum. Liver FABP amount was determined by SDS-PAGE and western blotting methods. Fatty acid binding capacity was determined by binding of ¹⁴C-palmitate with the delipidated liver cytosol. Consumption of alcohol increased serum cholesterol, triglyceride concentration and decreased HDL-cholesterol concentration after 5 weeks. Serum apolipoprotein B concentration increased after 3 weeks and LDL-cholesterol and apolipoprotein A concentration changed after 1 week. Liver cholesterol and triglyceride concentration increased after 3 weeks. Consumption of high cholesterol diet changed liver and serum lipid composition after 3 weeks. Switching to normal diet for 5 weeks did not normalize most of lipid composition in serum and liver except serum cholesterol, triglyceride and liver cholesterol. Liver cytosol FABP content and the fatty acid binding capacity decreased dramatically after 1 week with alcohol consumption. This results indicate that FABP content changes before the changes of blood or liver lipid composition, suggesting changes of FABP may cause development of the fatty liver induced by alcohol and can be used as an index of detecting a early development of fatty liver. (Korean J Nutrition 32(6) : 628~636, 1999)

KEY WORDS: free fatty acid, fatty acid binding protein, fatty liver, alcohol, cholesterol, lipid metabolism, fatty acid binding capacity.

서 론

장쇄 유리지방산(Long chain fatty acid)은 많은 조직들의 주된 에너지 금원이 될 뿐만 아니라 prostaglandin과

채택일 : 1999년 7월 16일

*This research was supported by GRANT No. KOSEF 961-0604-026-1 from the Korea Science and Engineering Foundation.

같은 제 2 전령의 전구체로서도 필요하고 또한 단백질 합성에서 post translational modification에도 필요한 중요 영양소이다. 그러나 지방산이 세포 내에서 이용되기 위해서는 세포막을 통과하여 세포내로 들어온 후에 mitochondria, peroxisome, endoplasmic reticulum과 같은 세포내 소기관까지의 이동이 필수적인 과정이다. 혈액 내에서 세포막 까지의 지방산 이동에는 일부만이 관여하지만 세포내에는 일부만이 존재하지 않고 또한 장쇄 지방산이 수용성의 세포

질에 잘 용해되지 않기 때문에 세포막에서부터 세포내 소기관들로의 이동에는 세포내에 존재하는 어떤 이동 매체가 필요할 것이다.

Okner¹⁾과 Mishkin²⁾에 의하여 20여년 전에 처음으로 발견된 지방산 결합 단백질(Fatty Acid Binding Protein, FABP)은 장래 지방산에만 결합하며³⁾ 14~15kDa의 비교적 작은 단백질군으로 세포내 전체 단백질의 3~8%를 차지한다.⁴⁾ FABP의 정확한 생리적 기능은 아직 알려지지 않고 있으나 세포내에서 유리지방산의 흡수, 이동 및 저장에 관여하며 세포내 유리지방산 농도 조절에 관여할 것으로 추측되고 있다.^{5), 6)} Glatz⁷⁾은 고지방식이나 고농도의 당을 함유한 식이를 장기간 투여하였을 경우 간, 심장, 소장, 지방 조직 등의 FABP가 증가하였고 clofibrate나 cholestyramine과 같은 혈청 지질 강하제는 간세포내에서 유리지방산의 흡수 속도와 FABP의 양을 증가시킨다고 보고하였다.⁸⁾ 또한 *in vitro* 실험에서 지방산 결합 단백질이 지방대사 관여 효소의 활성에 영향을 미친다는 것이 보고되어 유리지방산의 이용과 대사에 변화가 생겼을 경우, 조직에 존재하는 FABP의 양 또한 변화가 있으며 이 단백질이 세포내의 지방 이용에 중요한 역할을 한다는 것을 간접적으로 시사하고 있다.

성인병의 중요한 부분을 차지하는 당뇨병, 비만, 고지혈증, 지방간 등은 지방대사에 이상이 있고 특히 간에 큰 영향을 미치는 질병이므로 이들 질병과 지방산 결합 단백질간에는 상당한 연관 관계가 있을 것이며 유리지방산의 이용이 감소되어 지방간 생성의 한 요인으로 작용할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 이들 지방대사 이상과 관계가 깊은 질병과 지방산 결합 단백질과의 상호 연관성에 관한 연구는 아직 미비한 실정이다. 최근 들어 우리나라의 알코올 소비와 식생활의 변화에 따른 지방 소비량이 매년 증가하고 있으며 이로 인한 성인병 특히 간 질환이 급증하고 있어⁹⁾ 본 연구에서는 이들 질병의 생리적 대사 이상과 지방산 결합 단백질의 상호 연관 관계를 밝히고자 하였다. 알코올 및 고 cholesterol 식이로 유도된 흰쥐의 간 조직에서 FABP와의 관계를 분석 해보고자 다음의 몇 가지를 조사하였다.

- ① 지방간 유발이 간조직의 FABP에 미치는 영향과, 지방간 생성과 FABP 변화 시점을 비교하며,
- ② 이들 동물에서 지방간의 치유가 지방산 결합 단백질에 미치는 영향을 비교 분석하였고,
- ③ 지방간이 유도된 동물의 간조직의 FABP가 지방산과 결합하는 기능적 변화를 비교해 보기 위하여 FABP와 지방산의 결합능력을 측정하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험동물 및 식이

실험에 사용된 동물은 80~100g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였으며 일주일간 고형사료(삼양사료)로 적응시킨 후 대조군, 알코올군, 고 cholesterol군 등 3군으로 나누어 총 10주간 실험을 실시하였다. 5주간 실험 식이를 급여하여 지방간을 유도하면서 0, 1, 3, 5주째의 시료를 채취하였으며, 5주의 실험 식이가 끝난 후 다시 5주간 고형사료(삼양사료)를 급여하여 지방간의 회복을 유도한 후 10주째의 시료를 채취하였다. 실험 식이는 Lieber-DeCarli¹⁰⁾ 액체 식이를 변형하여 사용하였고 매일 식이 공급 직전에 조제하였으며 그 조성은 Table 1과 같다. 알코올군은 알코올로부터 공급받는 열량이 총 열량의 37%에 해당하였으며, 대조군은 이에 해당하는 열량만큼 maltodextrin을 대치하였고 당질 65%, 단백질 20%, 지방 15%로 구성되었다. Cholesterol군은 고 콜레스테롤 혈증을 유도하기 위하여 0.2%(w/v)의 cholesterol과 Na-Taurocholate 0.06%(w/v)을 투여하였다. 식이 섭취 및 체중 증가는 매주 측정하였으며 식이 효율(Food Efficiency Ratio, FER)은 체중 증가량(g)을 같은 기간에 섭취한 열량(kcal)으로 나눈 값으로 계산하였다.

2. 시료채취 및 분석방법

실험 동물은 실험개시 후 0, 1, 3, 5, 10주째 되는 날에 12~16시간동안 절식시킨 후 단두하여 회생하였다. 혈액은 혈액에서 30분간 방치 후 3,000rpm에서 20분 원심분리하여 혈청을 분리하고 지질 분석시까지 액체질소에 냉동 보관

Table 1. Composition of liquid diet(g/liter)

Component	Control	Alcohol	Cholesterol
Casein	42	42	42
DL-met	0.6	0.6	0.6
Salt-mixture ¹⁾	7.0	7.0	7.0
Vitamin-mixture ²⁾	2.0	2.0	3.0
Choline bitarate	0.4	0.4	0.4
Cellulose	1.0	1.0	1.0
Xanthan gum	3.0	3.0	3.0
Lard	-	-	5
Corn oil	15	15	10
Sodium saccharin	0.254	0.254	0.254
Sucrose	20	20	20
Maltodextrin	120	40	120
Cholesterol	-	-	2
Na-taurocholate	-	-	0.6
Ethanol	-	45.5	-

1), 2) AIN salt and vitamin mixture¹¹⁾

하였다. 간을 적출하여 무게를 측정한 후 냉장온도의 10 mM KCl-PO₄ 완충액(pH 7.4)으로 균질화하여 일정량을 떨어 액체질소에 보관하여 지질 분석에 이용하였다. 나머지 균질액을 9800g로 20분 원심 분리하여 얻은 상층액을 다시 38000g에서 60분 원심 분리하여 지방총을 거즈로 제거한 후 상층액을 cytosol로 사용하였다. 이상의 모든 조작은 4°C에서 실시하였다.

3. 혈청과 간의 지질 분석

혈청의 총 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 함량은 효소를 이용한 분석 kit(영동제약 및 국제시약, 일본)로 비색 측정하였고, 중성지방 함량은 trinder법에 의한 kit(영동제약)을 사용하여 분석하였다. LDL-콜레스테롤 함량은 Friedewald¹²⁾의 방법에 따라 계산하였다. Apolipoprotein A 및 Apolipoprotein B 함량 분석은 항체를 이용한 측정용 시약(Sigma Diagnostics)으로 측정하였다.

간의 지질분석은 Folch 등¹³⁾의 방법으로 지질을 추출한 뒤 혈청과 같은 방법으로 분석하였다.

4. 간 cytosol에서 FABP 분리정제 및 FABP의 Antibody 정제

Ockner 등¹⁴⁾의 방법에 의해 간조직의 cytosol에서 G-50, G-75 Sephadex gel filtration, DE-52 이온 교환수지 및 isoelectric focusing에 의하여 지방산 결합단백질을 순수 분리하였고 SDS-PAGE에 의하여 순수도를 측정하였다. 이렇게 분리된 FABP를 4주된 토끼에 3주에 한번씩 2번 boost하여 antiserum을 얻어 western blotting에 사용하였다.

5. 간의 FABP 함량 분석

1) SDS-PAGE

Cytosol내의 단백질 함량을 Lowry법¹⁴⁾에 의해 측정하였으며 동량의 cytosolic protein(10 µg protein)을 15% SDS Polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 분리하고¹⁵⁾ coomassie brilliant blue 염색으로 분자량이 14 kDa에 해당되는 단백질을 FABP로 간주하여 비교하였다.

2) Western Blotting

SDS-PAGE가 끝난후 토끼에서 얻은 antiserum을 이용하여 western blot을 시도하였다. 즉 gel을 nitrocellulose membrane에 0.1mA로 8~10시간 electroblotting 시킨후 nitrocellulose membrane을 NET 완충액(50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 1.25% Triton

X-100, pH 7.4)속에서 1시간 동안 blocking 시키고, 1 : 1500으로 희석시킨 FABP antiserum과 실온에서 30분간 반응 시킨후 1 : 2000으로 희석시킨 goat anti-rabbit antibody와 실온에서 2시간 반응시켰다. 반응용액(20mg/ml chloro-1-napthol/17% methanol, 10mM Tris-HCl, 0.02% H₂O₂, pH 7.4)을 넣어 충분한 반응이 나타나면 nitrocellulose membrane을 물로 씻어서 반응을 정지시켜 나타난 띠를 측정하였다.

6. 지방산 결합 단백질의 결합능력

Glatz와 Veerkamp¹⁶⁾의 방법에 따라서 cytosol의 FABP에 결합 되어있는 지방산을 Lipidex 1000에 흡착시켜 제거하여 유리상태의 FABP로 만든 다음 ¹⁴C-palmitate와 반응시켜 그 결합도를 측정하여 간조직에 존재하는 FABP 결합능력을 측정하였다.

7. 통계처리

각 처리구의 측정값은 평균치와 표준오차를 계산하였으며 통계적 유의성은 p < 0.05 수준에서 분산분석법(ANOVA)에 의하여 검증 후 유의성이 발견된 군들간의 유의도는 Dunnett의 다중비교법에 의해 분석하였다.

실험 결과

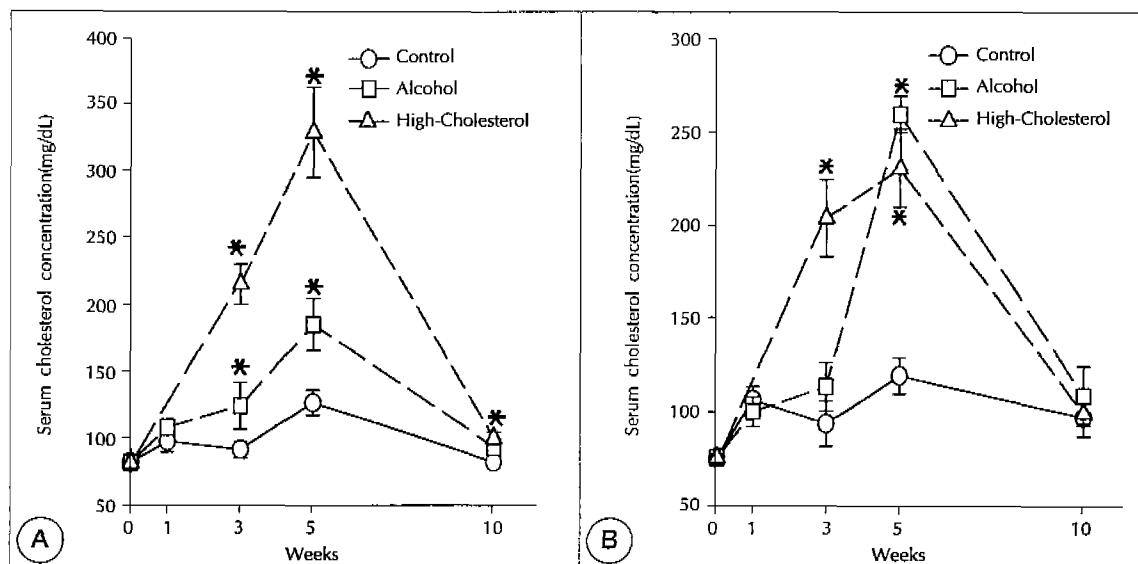
1. 식이 섭취, 체중 증가 및 식이효율

실험 식이를 실시한 1, 3, 5 및 10주째의 누적 열량 섭취량과 누적 체중 증가량 및 식이 효율에 관한 결과는 Table 2와 같다. 실험 식이를 섭취한 5주간의 식이 섭취량은 알코올군과 고 콜레스테롤군이 대조군에 비해서 유의적으로 낮았으나, 5주 이후 다시 5주간 고형사료를 먹인 10주째에는 각 군간의 차이가 없었다. 체중 증가량은 알코올 섭취시, 3주 후부터 대조군과 유의적 차이를 보여서 대조군의 60~70% 밖에 미치지 못하였고 정상식이를 5주간 섭취한 후에도 대조군의 80%의 체중증가량에 그쳤다. 고 콜레스테롤군의 경우, 체중증가량은 대조군보다 훨씬 높았으나 5주간의 정상식이를 섭취한 후에는 다시 정상수준으로 돌아왔다. 식이효율도 체중증가량과 같은 경향을 나타내었다. 따라서 장기적인 알코올 섭취는 식이섭취량, 체중증가량 및 식이효율 모두 대조군보다 월등히 낮은 수준을 나타내었으며 고콜레스테롤 식이는 식이섭취량은 감소시키고 체중증가량은 높여서 식이효율이 증가되지만 정상식이로 대치함에 따라 다시 모든 수치가 정상수준으로 돌아왔다.

Table 2. Cumulative energy intake, body weight gain and food efficiency ratio of rats fed experimental diets for 5 weeks and switched to chow diet for the next 5 weeks

Wks	Groups	Energy intake (Kcal)	Wt gain (g)	FER
1	Control	236.6 ± 13.0	8.3 ± 7.6	0.04 ± 0.02
	Alcohol	190.2 ± 8.5*	8.3 ± 4.0	0.04 ± 0.02
3	Control	911.9 ± 37.0	59.2 ± 7.0	0.06 ± 0.007
	Alcohol	615.8 ± 24.6*	41.7 ± 4.9*	0.04 ± 0.007*
	High cholesterol	818.7 ± 16.8*	90.0 ± 6.8*	0.1 ± 0.007*
5	Control	2007.4 ± 37.0	111.7 ± 9.1	0.06 ± 0.003
	Alcohol	1360.9 ± 24.3*	65.0 ± 7.3*	0.04 ± 0.004*
	High cholesterol	1363.5 ± 90.2*	145.0 ± 8.1*	0.1 ± 0.008*
10	Control	3798.8 ± 42.9	275.0 ± 6.3	0.08 ± 0.02
	Alcohol	3998.2 ± 54.1	219.2 ± 10.3*	0.05 ± 0.01*
	High cholesterol	3839.8 ± 17.4	286.7 ± 14.5	0.08 ± 0.02

Each value represents Mean ± SE

*Significantly different compare to control group of same week($p < 0.05$)**Fig. 1.** Concentration of Serum cholesterol and triglyceride of rats fed experimental diet for 5 weeks and switched to chow diet for the next 5 weeks. A: Serum cholesterol. B: Serum triglyceride. *Significantly different compare to control group of same week($p < 0.05$).

2. 혈중 지질 조성

1) 혈청 중성지방 및 콜레스테롤 함량

실험식이 급여 중 혈중 중성지방 및 총콜레스테롤 함량은 Fig. 1에 나타내었다. 혈청 중성지방 및 콜레스테롤 함량은 실험식이에 의하여 크게 영향을 받는 것으로 나타났다. 혈청 중성지방 및 콜레스테롤 함량은 비슷한 경향을 나타내어 알코올군의 경우 혈중 콜레스테롤은 3주 후부터, 중성지방은 5주 후부터 대조군에 비해서 유의적으로 높아졌으며, 고콜레스테롤군은 두 가지 모두 3주 후부터 유의적인 차이를 보였다. 그러나 표준사료를 5주 급여한 10주째에는 두 군 모두 혈청 콜레스테롤 및 중성지방이 현저히 감소하여 정상수

준으로 회복되었다. 알코올 섭취 5주 후 중성지방농도는 대조군의 2배 이상 높고, 고콜레스테롤 식이를 섭취했을 때보다 유의성은 없으나 높은 경향으로 나타나 장기적인 알코올 섭취시의 고지혈증의 심각성이 우려된다.

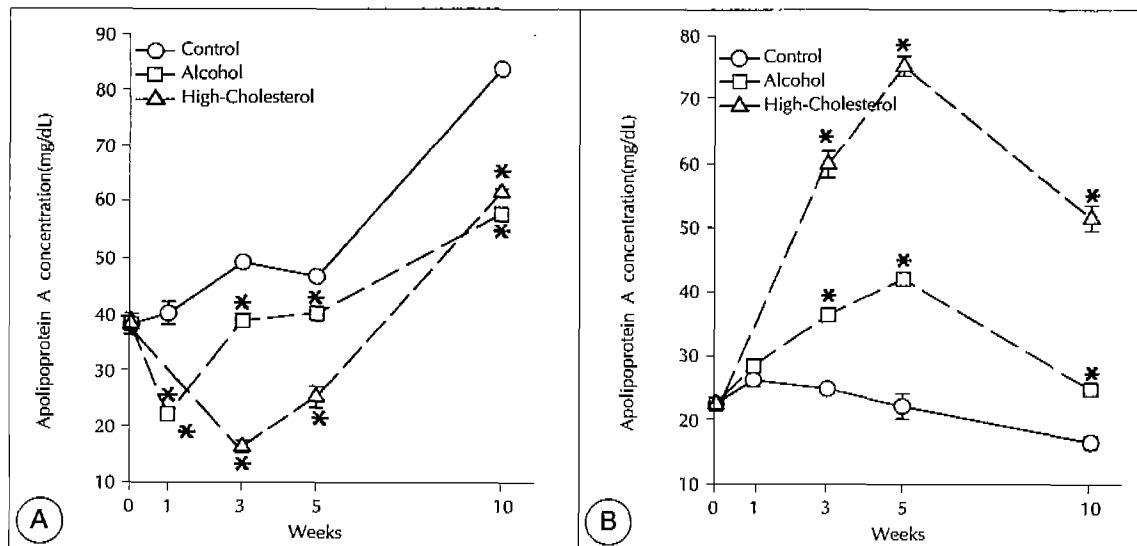
2) 혈청 HDL-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 함량

각 군의 혈중 HDL-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 농도는 Table 3과 같다. 혈청의 HDL-콜레스테롤 함량은 알코올 및 콜레스테롤을 섭취에 의해서 감소되었으며 콜레스테롤군의 경우 섭취기간에 비례하여 감소하였다. 이때 HDL-콜레스테롤 감소정도는 알코올보다 콜레스테롤 식이에 의한 감소가 더 심하여 알코올의 경우 5주 섭취 후에 대조군

Table 3. Serum HDL- and LDL-Cholesterol concentrations of rats fed experimental diet for 5 weeks and switched to chow diet for the next 5 weeks

Wks	Control		Alcohol		High-Cholesterol	
	HDL-C	LDL-C	HDL-C	LDL-C	HDL-C	LDL-C
0	54.2 ± 2.3	34.8 ± 5.3	54.2 ± 2.3	34.8 ± 5.3	54.2 ± 2.3	34.8 ± 5.3
1	44.4 ± 3.5	32.3 ± 4.7	41.4 ± 2.9	48.7 ± 4.8*	-	-
3	42.3 ± 1.9	30.8 ± 5.7	45.5 ± 7.2	73.1 ± 4.7*	34.5 ± 4.4*	161.4 ± 16.1*
5	46.1 ± 2.1	56.8 ± 11	35.9 ± 4.9*	123.7 ± 17.6*	27.3 ± 2.7*	256.9 ± 36.5*
10	46.8 ± 1.4	29.4 ± 3.9	33.7 ± 0.7*	40.6 ± 5.9*	25.9 ± 2.2*	54.9 ± 6.1*

Each value represents Mean ± SE

*Significantly different compare to control group of same week($p < 0.05$)**Fig. 2.** Concentration of serum Apolipoprotein A and B of rats fed experimental diet for 5 weeks and switched to chow diet for the next 5 weeks. A: Apolipoprotein A in serum. B: Apolipoprotein B in serum. *Significantly different compare to control group of same week($p < 0.05$).

과 유의적 차이를 나타내었으나 고콜레스테롤식이는 3주 후부터 대조군과 유의적 차이를 나타내었다. 5주간의 정상 식이 섭취는 HDL-콜레스테롤농도의 감소는 막았지만 이미 낮아진 HDL-콜레스테롤농도를 정상수준으로 높이지는 못하였다.

LDL-콜레스테롤 함량은 알코올군 및 고콜레스테롤군 모두 대조군에 비하여 현저한 증가를 나타내었으며 특히 콜레스테롤군이 알코올군보다 더 현저한 변화를 나타내었다. 알코올군의 경우 식이섭취 1주 후부터 40% 증가하여 대조군에 비해 유의적으로 높아졌으며 두군 모두 3주 후에는 대조군의 2~5배 이상 높은 수치를 나타내었다(Table 3). 또한 5주간의 정상식이 섭취에 의하여 LDL-콜레스테롤 함량이 70~80% 감소되었지만 대조군보다 높은 수준이었다. 따라서 본 실험결과 알코올과 콜레스테롤의 장기적인 섭취는 혈액중의 HDL- 및 LDL-콜레스테롤 모두에 영향을 미치지만 특히 LDL-콜레스테롤에 더 큰 영향을 주는 것을 알수 있었고, 다시 정상식이를 장기간 섭취했을 때 혈액 HDL-

및 LDL-콜레스테롤농도는 쉽게 정상수준으로 회복될 수 없음을 시사하였다.

3) 혈청 apolipoprotein A 및 B 함량

혈액의 HDL- 및 LDL-콜레스테롤의 주된 apoprotein이 되는 apolipoprotein A 및 apolipoprotein B 농도는 Fig. 2와 같다. 알코올 및 콜레스테롤 섭취는 apolipoprotein A 농도를 감소시켰으며 특히 콜레스테롤에 의한 영향이 훨씬 커졌다. 이 결과는 혈중 HDL-콜레스테롤농도와 같은 경향이었다. 또한 5주간의 정상식이에 의하여 apolipoprotein A 농도는 두군 모두에서 현저히 증가되었지만 대조군 보다 유의적으로 낮은 농도를 나타내었다(Fig. 2A).

Apolipoprotein B 농도는 apolipoprotein A 농도와 반대경향을 나타내었으며 두 군 모두 3주 이후부터 식이 영향으로 크게 증가되었고 apolipoprotein A와 마찬가지로 콜레스테롤에 의한 영향이 훨씬 큰 것으로 나타났다. 또한 LDL-콜레스테롤과 마찬가지로 정상식이를 5주간 섭취한

후에 두 군 모두 현저한 감소를 하였으나 대조군 보다 높은 수치를 나타내었다(Fig. 2B).

3. 간의 무게 및 지방조성

1) 간무게

간무게는 알코올 섭취에 의해서 1주 후부터 대조군에 비하여 유의적으로 감소되었으나 콜레스테롤 식이는 간무게에 영향을 나타내지 못하였다(Table 4). 또한 정상식이 섭취 5주 후인 10주째 간무기는 차이가 없었다.

2) 간의 중성지방 및 콜레스테롤 함량

각군의 간에 함유된 중성지방 함량은 Table 5에 나타내었다. 알코올 및 고콜레스테롤 식이는 섭취 3주 후에 간 중성지방 함량이 2배 이상 증가되어 지방간을 유발하였다. 알코올군의 경우 5주 후에 변화를 보인 혈액보다 빠른 변화를 보였으며 5주간의 정상식이 후에도 두군 모두 현저한 감소를 보였으나 대조군보다 높은 수치를 나타내었다. 혈청 중

성지방 함량은 5주간의 정상식이 대치 후 대조군과 같은 수준으로 회복되었지만(Fig. 1) 간의 중성지방 함량은 5주간의 정상식이 대치 후에도 정상으로 회복되지 못하여 혈액보다 회복효과가 늦은 것을 알 수 있었다. 또한 혈액과 마찬가지로 콜레스테롤에 의한 영향이 알코올보다 현저하였다. 콜레스테롤 함량 역시 알코올군과 고콜레스테롤군 모두 3주 후부터 식이에 의한 영향을 나타내어 알코올군의 경우 혈청 콜레스테롤보다 빠른 변화를 보여 주었으며(Table 6), 5주간의 정상식이에 의해 중성지방 함량과 달리 두군 모두 콜레스테롤 농도가 정상 수준으로 회복되었다.

4. 지방간 결합 단백질 함량 및 지방간 결합능력

알코올 및 고콜레스테롤 식이에 의한 cytosol내의 지방간 결합 단백질 함량의 변화를 살펴보기 위하여 SDS-PAGE로 14kDa에 해당되는 band를 비교하였고 FABP-antiserum을 이용한 western blotting에서 FABP band를 재확인하였다(Fig. 3, 4, 5, 6). 대조군에 비하여 알코올 및 콜레스테롤 식이는 SDS-PAGE에 나타난 14kDa에 해당되는 band가 감소되는 것을 볼 수 있었고 특히 알코올군의 경우 FABP 함량변화가 식이섭취 1주 후부터 현저히 감소하는 것을 볼 수 있어서 3주후부터 유의적인 차이를 나타내는 간의 지방 변화보다 빠른 영향을 나타내는 것을 알수 있었다. 또한 5주간의 정상 식이를 섭취한 후인 10주째에도 FABP 함량은 대조군 보다 낮은 수치를 나타내었다. 콜레스테롤군의 경우는 식이섭취 3~5주 후에 약간의 감소를 보였으며 정상식이 섭취 후에도 대조군보다 낮은 경향을 나타내었다.

Table 4. Liver weight of rats fed experimental diet for 5 weeks and switched to chow diet for the next 5 weeks

Wks	Control	Alcohol	High-Cholesterol
0	3.8 ± 0.1	4.1 ± 0.2	3.8 ± 0.1
1	6.5 ± 0.4	5.0 ± 0.6*	-
3	7.2 ± 0.5	5.3 ± 0.3*	8.0 ± 0.7
5	8.2 ± 0.5	6.5 ± 0.4*	8.8 ± 0.6
10	11.4 ± 0.6	10.6 ± 0.5	10.3 ± 0.5

*Significantly different compare to control group of same week(p < 0.05)

Table 5. Triglyceride content in liver of rats fed experimental diet for 5 weeks and switched to chow diet for the next 5 weeks

Wks	Control			Alcohol			High-Cholesterol		
	mg/g	mg/liver	mg/g	mg/liver	mg/g	mg/liver	mg/g	mg/liver	mg/g
0	3.9 ± 0.2	15.3 ± 1.2	3.9 ± 0.2	15.3 ± 1.2	3.9 ± 0.2	15.3 ± 1.2	3.9 ± 0.2	15.3 ± 1.2	3.9 ± 0.2
1	3.8 ± 0.5	28.3 ± 2.7	4.5 ± 0.8	19.5 ± 2.5	-	-	-	-	-
3	5.4 ± 0.4	38.9 ± 4.8	10.3 ± 1.9*	60.7 ± 19.2*	11.4 ± 1.3*	102.5 ± 13.7*	11.4 ± 1.3*	102.5 ± 13.7*	11.4 ± 1.3*
5	6.3 ± 0.4	27.6 ± 4.0	9.7 ± 0.8*	65 ± 12.9*	19.2 ± 1.8*	167.1 ± 9.58*	19.2 ± 1.8*	167.1 ± 9.58*	19.2 ± 1.8*
10	2.3 ± 0.3	25.9 ± 2.7	4.3 ± 0.4*	45.6 ± 4.7*	3.7 ± 0.2*	38.1 ± 2.5*	3.7 ± 0.2*	38.1 ± 2.5*	3.7 ± 0.2*

Each value represents Mean ± SE

*Significantly different compare to control group of same week(p < 0.05)

Table 6. Cholesterol content in liver of rats fed experimental diet for 5 weeks and switched to chow diet for the next 5 weeks

Wks	Control			Alcohol			High-cholesterol		
	mg/g	mg/liver	mg/g	mg/liver	mg/g	mg/liver	mg/g	mg/liver	mg/g
0	3.8 ± 0.4	14.6 ± 1.5	3.8 ± 0.4	14.6 ± 1.5	3.8 ± 0.4	14.6 ± 1.5	3.8 ± 0.4	14.6 ± 1.5	3.8 ± 0.4
1	3.6 ± 0.2	23.1 ± 3.4	5.7 ± 1.9	28.6 ± 11.7	-	-	-	-	-
3	4.3 ± 0.6	28.3 ± 2.7	8.6 ± 1.4*	40.5 ± 5.8*	7.9 ± 0.9*	68.1 ± 9.6*	7.9 ± 0.9*	68.1 ± 9.6*	7.9 ± 0.9*
5	3.8 ± 0.4	31.1 ± 2.4	10.1 ± 1.7*	64.2 ± 12.9*	15.9 ± 1.7*	139.4 ± 14.7*	15.9 ± 1.7*	139.4 ± 14.7*	15.9 ± 1.7*
10	2.8 ± 0.2	31.7 ± 2.9	3.1 ± 0.2	32.8 ± 2	3.3 ± 0.2	33.4 ± 1.2	3.3 ± 0.2	33.4 ± 1.2	3.3 ± 0.2

Each value represents Mean ± SE

*Significantly different compare to control group of same week(p < 0.05)

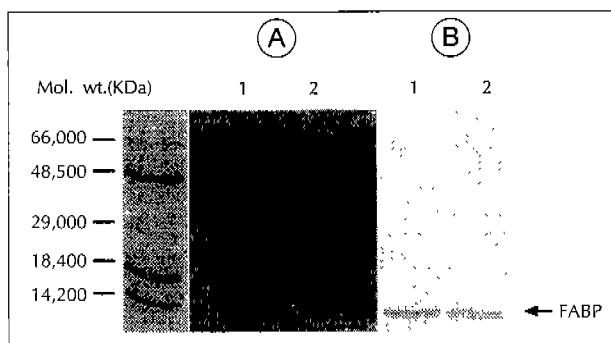


Fig. 3. Analysis of FABP of liver cytosolic protein for 1wk. A: SDS-PAGE, B: western blot (Lane 1. Control group, Lane 2. Alcohol group).

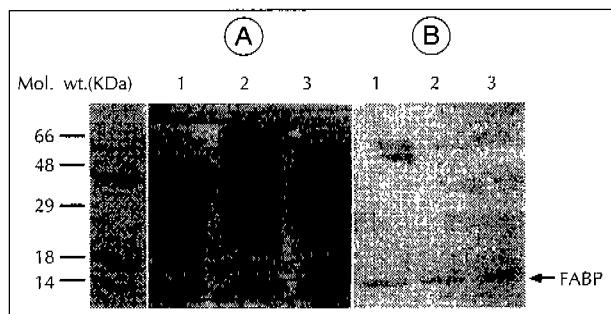


Fig. 4. Analysis of FABP of liver cytosolic protein for 3wks. A: SDS-PAGE, B: western blot (Lane 1. Control group, Lane 2. Alcohol group, Lane 3. High cholesterol group).

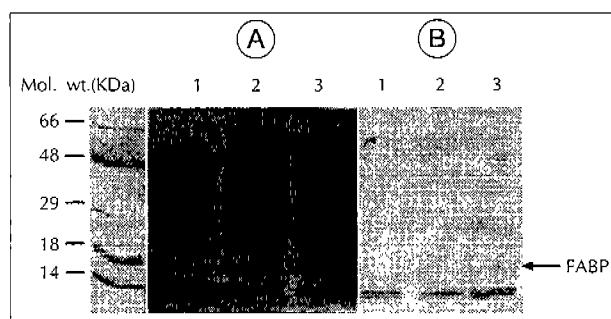


Fig. 5. Analysis of FABP of liver cytosolic protein for 5wks. A: SDS-PAGE, B: western blot (Lane 1. Control group, Lane 2. Alcohol group, Lane 3. High cholesterol group).

Western blotting도 SDS-PAGE와 비슷한 경향을 나타내었다. 즉 알코올 섭취 1주 후에 FABP 함량이 약간 감소하기 시작하여 3주 후에는 현저히 감소되었으며 콜레스테롤군 보다 현저한 감소를 나타내었다.

지방산 결합 단백질은 장쇄 유리지방산에 결합하며 세포내 지방산 이동 및 농도 조절에 관여 할 것으로 추측되고 있다. 그러므로 알코올 및 고콜레스테롤 식이를 섭취 하였을 때 간 세포내 지방산 결합 단백질의 함량 변화 외에 이들 단백질의 지방산 결합능력의 변화도 가능할 것이다. 그러므로 cytosol 내의 FABP와 이미 결합되어 있는 지방산을 Lipidex 1000으

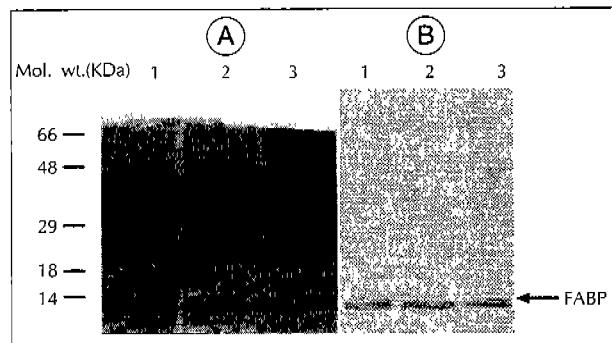


Fig. 6. Analysis of FABP of liver cytosolic protein for 10wks. A: SDS-PAGE, B: western blot (Lane 1. Control group, Lane 2. Alcohol group, Lane 3. High cholesterol group).

Table 7. Palmitate binding capacity of liver cytosol of rats fed experimental diet for 5 weeks and switched to chow diet for the next 5 weeks (PM/ug cytosolic protein)

Wk	Control	Alcohol	High-cholesterol
1	24.7 ± 6.8	9.2 ± 3.5*	-
3	31.2 ± 7.9	12.7 ± 4.2*	14.9 ± 3.4*
10	33.5 ± 6.6	18.9 ± 4.3*	24.8 ± 5.8*

*Significantly different compare to control group of same week ($p < 0.05$)

로 분리 시킨 후 ^{14}C -palmitate를 이용하여 FABP와의 결합 능력을 측정하였다(Table 7). 알코올군은 식이섭취 1주 후부터 ^{14}C -palmitate 결합력이 50% 이상 감소 되었고, 고콜레스테롤군도 3주째 감소를 보였다. 그러나 두군 모두 정상 식이를 섭취한 10주째에도 대조군 보다 낮은 결합력을 나타내어 FABP함량변화와 비슷한 양상을 보였다. 또한 위의 결과에서 간 cytosol내의 FABP함량 및 지방산 결합능력은 알코올 식이에 의한 영향을 더 많이 받았으며 혈액이나 간 보다 훨씬 빠른 변화를 나타내었다.

고찰 및 결론

만성적인 알코올과 고콜레스테롤 식이로 유도된 지방간에서 간세포내의 지방산 결합 단백질과의 연관성을 살펴보고 이를 동물을 다시 정상 식이로 장기간 회복 시켰을 때의 효과를 조사하여 보았다.

장기적인 알코올 섭취는 식이섭취량 및 체중 감소를 보였으며 이 결과는 만성적인 알코올 섭취 환자에서 식이 섭취량의 감소와 영양소의 흡수장애로 체중 감소를 초래한다는 보고와 일치하였다.¹⁸⁾ Pikaar등은 알코올 섭취로 인한 체중의 감소를 주로, 체지방의 손실, 식이 섭취량의 감소, 그리고 높은 에너지의 소비 등의 이유를 들고 있다.¹⁹⁾

본 연구 결과 특히 알코올에 의해 유도된 지방간의 경우 간의 지방산 결합 단백질이 중요한 역할을 하는 것을 알 수

있었다. 알코올군의 경우 혈청 콜레스테롤과 중성지방 농도는 식이 섭취 5주 후부터 증가하였고, HDL-콜레스테롤은 5주 후부터 감소하였으며, apolipoprotein B농도는 3주 후부터 증가하였고, LDL-콜레스테롤과 apolipoprotein A농도는 1주부터 변화하였다. 간의 지방 농도는 3주 후부터 증가하였다. 고콜레스테롤군의 경우 혈청 및 간의 모든 성분이 3주 후부터 변화되었으며 변화 정도는 알코올군보다 현저하였다. 또한 알코올을 섭취한 동물을 정상식이로 5주간 대치한 후에도 혈청 콜레스테롤, 중성지방 및 간 콜레스테롤을 제외한 모든 성분이 대조군과 같은 정상 수준으로 회복되지 못하였다. 그러나 western blotting으로 본 지방산 결합 단백질 양은 1주 후에 40% 이상 감소 되었고 이들의 지방산 결합 능력도 1주째 50% 이상 감소되어 혈액이나 간의 변화 보다 조기에 시작됨을 알 수 있었다. 또한 이들은 정상식이 대치 후에도 회복되지 않아서 혈액이나 간의 지표 보다 훨씬 예민하게 반응하는 것을 볼 수 있었다. 고콜레스테롤군의 경우도 같은 경향을 나타내었지만, 감소 정도가 적었고 시간도 느리게 변화하였다.

알코올 장기섭취는 지방산 산화를 억제하고²⁰⁾ 미토콘드리아의 손상을 유발하며,²¹⁾²²⁾ 유리지방산이 간에 축적되지 않기 때문에²³⁾ 간에서의 에스테르화가 증가되어 중성지방 함량이 증가될 것으로 사료된다. Barona등은 알코올을 장기간 섭취 할 때 콜레스테롤 합성보다는 분해에 이상이 생겨 간과 혈액의 콜레스테롤이 증가된다고 보고하였고,²⁴⁾ Böttiger등은 만성 알코올 중독자의 경우 hypertriglyceridemia를 유발한다고 하였고,²⁵⁾ Decarli와 Lieber²⁶⁾는 주에서 36% 알코올 섭취를 유도하였을 때 지방간을 유발한다고 하였다. 본 실험 결과에서는 알코올로 인한 지방 대사 이상은 먼저 간 세포질에 존재하는 지방산 결합 단백질의 함량 변화 및 지방산 결합 능력의 변화가 일어나 간세포 내에서 지방산 이용이 감소되고 이로 인하여 혈액이나 간의 지방대사 이상이 더욱 가중될 수 있음을 시사한다. 또한 만성적인 알코올 섭취시 간에서 지방산 합성을 증가되고 분해는 감소되는데, 이때 지방산 합성을 세포질에서 일어나기 때문에 지방산 결합 단백질의 역할이 크게 기대되지 않으나 지방산의 분해는 미토콘드리아에서 일어나기 때문에 지방산 결합 단백질의 양과 지방산 결합 능력이 감소된 경우에 미토콘드리아로의 지방산 이동이 감소되고 이로 인한 지방산 분해 감소가 일어나 결과적으로 간에서 중성지방 합성이 증가되고 혈액 내 중성지방 증가에 기여 할 것으로 사료된다. Pignon등은 4~5주간의 알코올 투여에 의해 간 FABP가 증가하였다고 보고하여 본 실험과 상반된 결과를 보고하였다.²⁷⁾ 그러나 그들의 실험 방법이 cytosol을 gel여과에 의해

분획한 후 oleate에 결합하는 부분을 다시 antiserum과 반응시켜 immunodiffusion에 의해 침전된 FABP함량을 측정하였기 때문에 실험 중 오차가 클 것이며 또한 그들은 pair-feeding을 하여 대조하였으므로 본 실험과 다른 결과를 나타난 것으로 사료된다.

Bass등³⁾은 고지방식이에 의해 FABP함량이 증가된다고 보고하였다. 고지방식이, 고콜레스테롤 식이 및 알코올 식이에 의해 모두 지방간이 유도되지만 고지방식이 시에는 지방산의 산화가 증가되고 고콜레스테롤 및 알코올식이 시에는 지방산 산화는 억제되고 지방산의 에스테르화가 증가되어 지방산 이용경로가 달라진다. 그러므로 고지방식이 시에는 간 FABP함량이 증가되고 고콜레스테롤 및 알코올식이 시에는 FABP함량이 감소되는 것으로 사료된다. 앞으로 지방산 산화 및 에스테르화에 기여하는 FABP의 역할규명이 되어야 할 것이다. 또한 알코올 섭취 시에는 알코올에서 나오는 열량 때문에 고콜레스테롤 식이보다 지방산의 산화가 더욱 억제되어 FABP함량 변화가 더 큰 것으로 사료된다.

고콜레스테롤군의 경우 혈액과 간의 중성지방, 콜레스테롤, HDL-, LDL-콜레스테롤, apolipoprotein A 및 B등은 알코올군 보다 빠르고 더 큰 변화를 나타내었으나 지방산 결합 단백질 함량은 크게 변화하지 않아 이 경우의 지방간 생성에는 지방산 결합 단백질과의 유의성 깊은 상관관계를 찾아보기 어려웠다.

이와 같이 본 실험의 연구결과는 특히 알코올로 인한 지방간의 경우, 지방산결합 단백질의 조기 감소가 세포내 지방산 이용에 영향을 미치고 나아가서는 지방간 생성과 발전에 영향을 미칠 수 있음을 제시하여 FABP 함량변화 측정이 지방간 발견의 조기 지표로 사용될 수 있는 가능성을 시사한다.

Literature cited

- Ockner RK, Manning JA, Poppenhausen RD, Ho WKL. A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa. *Science* 177: 56-58, 1972
- Mishkin S, Stein L, Gatmaitan Z, Arias IM. The binding of fatty acids to cytoplasmic proteins: Binding to Z-protein in liver and other tissues of the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 47: 997-1003, 1972
- Bass NM. The cellular fatty acid binding proteins: Aspects of structure, regulation and function. *Int Rev Cytol* 111: 143-184, 1988
- Kaikus RM, Bass NM, Ockner RK. Functions of fatty acid binding proteins. *Experientia* 46: 617-630, 1990
- Ockner RK, Manning JA. Fatty acid binding protein in small intestine: Identification, isolation, and evidence for its role in cellular fatty acid transport. *J Clin Invest* 54: 326-338, 1974
- Matarese V, Stone RL, Waggoner DW, Bernlohr DA. Intracellular fatty acid trafficking and the role of cytosolic lipid binding proteins. *Pr-*

- og Lip Res 28: 245-272, 1989
- 7) Glatz JFC, Veerkamp JH. Intracellular fatty acid binding proteins. *Int J Biochem* 17: 13-22, 1985
 - 8) Kawashima Y, Nakagawa S, Tachibana Y, Kozuka H. Biochemical Biophysics 754: 21-27, 1983
 - 9) Koo BK, Chung JM, Lee HS. A study on the alcohol consumption and nutrient intake in patients with alcoholic liver disease. *Korean J Nutrition* 30(1): 48-60, 1997
 - 10) Lieber CS, Decarli LM, Sorrel MF. Experimental methods of ethanol administration. *Hepatology* 10: 501-510, 1989
 - 11) Report of the American Institute of Nutrition. Ad Hoc committee on standard for nutritional studies. *J Nutr* 107: 1340-1348, 1977
 - 12) Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499-502, 1972
 - 13) Folch JM, Lees G, Staney HS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 226: 497-509, 1957
 - 14) Ockner RK, Manning JA, Kane JP. Fatty acid binding protein, isolation from rat liver, characterization, and immunochemical quantification. *J Biol Chem* 257: 7872-7878, 1982
 - 15) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
 - 16) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970
 - 17) Glatz JFC, Veerkamp JH. A radiochemical procedure for the assay of fatty acid binding proteins. *Anal Biochem* 132: 89-95, 1983
 - 18) Lieber CS. Alcohol and the liver: 1994 update. *Gastroenterology* 106: 1085-1092, 1994
 - 19) Pikaar NA, Wedel M, Vander Beck EJ, Van Dokkum W, Kempen HJ, Kluit C, Ockhuizen T, Hermus RJ. Effects of moderate alcohol consumption on platelet aggregation fibrinolysis and blood lipids. *Metabolism* 36: 538-543, 1987
 - 20) Lieber CS, Schmid R. The effects of ethanol on fatty acid metabolism: stimulation of hepatic fatty acid synthesis in vitro. *J Clin Invest* 40: 394-399, 1961
 - 21) Cederbaum AI, Lieber CS, Beattie DS, et al. Effects of chronic ethanol ingestion on fatty acid oxidation by hepatic mitochondria. *J Biol Chem* 250: 5122-5129, 1975
 - 22) Ryu SY, Kim JH. Effect of chronic alcohol feeding and 2-acetylaminofluorene treatment on hepatic mitochondrial ATPase activity and membrane lipid composition in rats. *J Korean Soc Food Nutr* 24(6): 867-873, 1995
 - 23) Pignon J-P, Bailey NC, Baraona E, Lieber CS. Fatty acid binding protein: A major contributor to the ethanol-induced increase in liver cytosolic proteins in the rat. *Hepatology* 7: 865-871, 1987
 - 24) Baraona E, Lieber CS. Effect of chronic ethanol feeding on serum lipoprotein metabolism in the rat. *J Clin Inves* 49: 769-778, 1972
 - 25) Böttiger LE, Carlson LA, Hultman E, Romanus V. Serum lipid in alcoholics. *Acta Med Scand* 199: 357-361, 1976
 - 26) Decarli LM, Lieber CS. Fatty liver in the rat after prolonged intake of ethanol with a nutritionally adequate new liquid diet. *J Nutr* 91: 331-336, 1967