

## 에이코사펜타에노익산에 의한 세포 내에서의 지방 축적 억제 효과 및 포도당 대사에 관여하는 전사인자의 변화

\*부 소 영

경일대학교 식품과학부 식품영양전공

### Effect of Eicosapentaenoic Acid on Cellular Lipid Accumulation and Transcription Factors Involving Glucose Utilization

\*So Young Bu

Major in Food Science and Nutrition, School of Food Science, Kyungil University, Gyeongsan 712-701, Korea

#### Abstract

Previous studies suggest that polyunsaturated fatty acids with long carbon chains such as eicosapentaenoic acid(EPA) and docosahexaenoic acid(DHA) have several health benefits. However metabolic consequences of these fatty acids themselves and their regulation of transcriptional activity involving glucose utilization are not well established. Thus, the purpose of this study was to investigate how EPA influx affects cellular lipid accumulation and gene expressions involving *de novo* lipogenesis in hepatocyte cultures. Compared to oleic acid treatment, EPA treatment showed remarkably decreased cellular TG conversion and accumulation, along with phospholipids at a lower extent. As expected, EPA increased mRNA expression involving fatty acid influx and lipid droplet formation, but did not affect mRNA expression involving glucose utilization. EPA increased transcriptional activity of PPAR- $\alpha$  and glucose responsive transcription factor when transcription factor binding protein was activated. Taken together, these data suggest that EPA decreases lipid accumulation through increases of the  $\beta$ -oxidation pathway without interruption of glucose utilization.

Key words: eicosapentaenoic acid, triglycerides,  $\beta$ -oxidation, glucose, lipogenesis

#### 서 론

최근 당뇨, 비만 등 지방 축적과 관련된 질병들에 대한 분자생물학적 기전에 관한 연구가 진행되면서 에너지대사 조절에 관여하는 전사조절인자(transcription factor)들의 전사활성(transcription factor)과 발현 조절에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Pawar 등 2002; Bu 등 2009). 지방대사에 관여하는 여러 전사인자들 중에서도 PPAR gamma(PPAR- $\gamma$ )와 PPAR alpha(PPAR- $\alpha$ )는 매우 잘 알려진 전사인자로서 PPAR- $\gamma$ 는 지방산이 중성지방으로 축적되는 과정에 관련된 유전자 발현을 증가시키고(Li X 등 2005), PPAR- $\alpha$ 는 지방산의 베타

( $\beta$ )-산화과정에 관여하여 지방산이 미토콘드리아에서 산화되어 ATP 발생에 관여하는 유전자들의 발현을 증가시킨다(Jay & Ren 2007). 또한 높은 농도의 당분이 세포 내에 유입되어 지방산으로 전환되는 지방 신생성(denovolipogenesis)과정에 관여하는데, 알려진 전사인자로는 carbohydrate responsive element binding protein(ChREBP), stearyl CoA responsive element binding protein(SREBP), Liver X receptor(LXR) 등이 있으며(Repa 등 2000; Xu 등 2001), 특히 ChREBP가 결합하는 ChoRE는 포도당 분자에 민감하게 반응하여 세포 내에서의 에너지 이용효율을 높이는 것으로 알려졌다(Stoeckman 등 2004). 또한 특정 약물, 영양소나 식품성분들의 이들 전사인자의 활성조절능력

\* Corresponding author: So Young Bu, Major in Food Science and Nutrition, School of Food Science, Kyungil University, Gyeongsan 712-701, Korea. Tel: +82-53-850-7178, Fax: +82-53-850-7584, E-mail: busy@kiu.ac.kr

에 대해서도 많은 정보가 밝혀지고 있다. 그 중에서도 지방 축적의 주체가 되는 여러 종류의 지방산들은 그 자체로 지방으로 축적되는 경로 이외에도 신호전달 조절, 염증반응, 전사인자 조절 등 다양한 생리적 기능을 가지고 있으며, 지방 축적에 관여하는 PPAR- $\gamma$ , LXR- $\alpha$  혹은 지방산 베타산화과정에 관여하는 PPAR- $\alpha$  등의 전사인자들에 직접 결합하여 그 활성을 선택 조절하는 것으로 알려졌으며, 포화지방산 혹은 단가불포화 지방산의 경우 주로 지방 축적에 관여하는 전사인자를 활성화시키고, 다가 불포화지방산의 경우 지방산화에 관여하는 전사인자의 활성을 증가시키는 것으로 알려졌다 (Reap 등 2000; Xu 등 2001; Moris 등 2003; Pawar & Jump 2003).

한편, 이전의 많은 연구들은 다가 불포화지방산, 그 중에서도 생선 중에 많이 함유된  $\omega$ 3 지방산 계열 불포화지방산인 eicosapentaenoic acid(EPA)와 docosahexaenoic acid(DHA)의 섭취가 혈중 콜레스테롤 감소, 혈관의 항상성 유지, 동맥경화 예방에 유의한 효과가 있다고 보고하였다(Nam 1994; Kim 등 1999). 또한 EPA, DHA와 같은 다가 불포화지방산의 섭취는 당뇨나 비만 등의 원인물질이 되는 중성지방 및 지방산의 합성도 감소시킴으로써 인슐린 민감성을 증대시키고, 신체 전반적인 에너지 이용률을 높이는 것으로 보고되었다(Choe 등 1998; Pawar & Jump 2003). 최근 정부기관의 통계조사 및 많은 역학연구에 의하면 당뇨나 비만과 같은 대사성질환의 발생은 고지방 섭취뿐만 아니라 과자, 고 과당 함유식품, 청량음료 등의 당분이 높은 음식 섭취의 증가율과도 비례 상관하였다(Shoham 등 2008; Nettleton 등 2009). 또한 단 음식의 과다 섭취는 지방 신생성, 콜레스테롤 신생성 및 중성지방의 축적에 관여하는 유전자의 발현도 증가 조절하는 것으로 밝혀져(Morris 등 2003), 이들 단 음식의 주체가 되는 포도당의 대사와 축적물질이 되는 중성지방 대사에 관련된 유전자, 전사인자들 사이에 밀접한 상호작용이 있을 것으로 사료된다. 그러나 고농도의 포도당 유입 시 지방 축적의 증가와 관련 유전자의 발현 증가는 많은 연구에서 보고되었으나, 지방 축적보다는 지방의 산화대사경로를 활성화시키는 다가 불포화지방산의 유입이 이들 지방산 자체의 대사 조절 외에 포도당 이용 측면에서의 대사적 변화 및 분자생물학적 기전에 대한 정보는 명확하지 않다. 이에 본 연구에서는 식품 중에서 대표적인 다가 불포화지방산 중 같은 계열  $\omega$ 3 지방산인 DHA에 비해 혈관세포 등에서의 NO 생성량이 낮은 것으로 보고되어(Mori 등 2000), 에이코사노이드에 의한 간섭 효과가 상대적으로 적을 것으로 생각되는 EPA를 선택하여 간세포 내에서 다가 불포화 지방산 유입 시 세포 내에서 지방산 자체의 대사과정을 추적관찰하고, 지방합성 및 포도당의 지방 전환에 관련된 유전자 및 전사인자의 활성 관찰을 통해 EPA와 세포 내에서의

지방 축적 억제 효과에 대한 기전을 규명하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포 배양

간세포는 실험용 쥐에서 분리된 것을 사용하였으며, collagenase 주입법(Klaunig 등 1981)을 이용하여 분리 배양하였다. 분리된 간세포는  $0.5 \times 10^6$  cells/22-mm well의 밀도로 분주하였으며, 10% FBS, 50 IU/ml penicillin and 50 mg/ml streptomycin, 10 nM insulin 및 5.5 mM glucose가 함유된 M199(Gibco-BRL) 배지에서 배양하였다. 세포를 플레이트(plate)에 분주한 후 최소한 48시간 이후부터 100% 밀집이 된 것을 확인하고 실험을 시작하였다. EPA의 처리는 이전의 연구문헌에서 세포독성을 나타내지 않는 농도로 보고된 500  $\mu$ M을 사용하였고(Perez-Martinez 등 2010; Sapiro 등 2009), EPA와 올레산 처리시 세포의 단백질량 및 세포활성의 차이가 없음을 확인하였다. 배지에서 지방산의 운반은 지방산 운반단백질인 알부민(albumin)에 의하여 세포내로 전달이 되므로(Elmadhoun 등 1998), 실험을 위한 지방산 처리는 올레산(oleic acid) 과 EPA 모두 bovine serum albumin(BSA)과 3:1의 비율로 혼합하여 실시되었으며, 지방산을 처리하지 않은 배지는 동량의 BSA만을 처리하여 대조군으로 하였다.

### 2. 방사성 동위원소의 추적

세포에 처리한 지방산의 대사경로를 추적하기 위하여 0.5  $\mu$ Ci의 [ $^{14}$ C]방사성 동위원소가 부착된 EPA와 올레산(oleic acids)을 세포에 처리해 주었다. 처음 배지에 방사성 동위원소가 부착된 지방산이 있는 상태에서 세포를 수확한 후, 지질 추출 및 분석을 한 값은 외부 지방산 대사 기간을 의미하는 “external”로 표시하였고, 이후 방사성 동위원소가 있는 배지를 두 차례에 걸쳐 PBS로 세척한 뒤 동위원소가 없는 일반배지로 갈아준 후 6시간을 더 배양하여 이 시간 동안 발생한 세포내의 지방 변화는 이미 유입된 지방산의 대사를 의미하는 “internal”로 표시하였다. 세포에 처리 당시, 순수 배지에 방사성 동위원소가 부착된 EPA 혹은 올레산이 들어있는 배지에서 검출된 방사는 활성은 배지 1 ml 당  $110,000 \pm 750$  dpm으로 측정되어 0.5 nmol까지의 지방산 검출이 가능한 수준임을 확인하였다.

### 3. Thin Layered Chromatography(TLC) 분석

세포 내에서 축적된 여러 종류의 지질을 분석하기 위해 방사성 동위원소가 부착된 지방산이 처리가 된 세포에서 지질을 추출한 후 TLC로 각기 다른 지질의 종류를 분석하였다(Bligh & Dyer 1959). 우선 일정시간의 지방산 처리시간이 지

난 후 세포를 0°C 얼음조에서 PBS로 세척해 주고, 냉장보관 메탄올을 가하여 세포를 수집하였다. 메탄올에 수집된 세포들은 메탄올 부피의 2배에 해당하는 클로로포름을 가하여 4°C에서 24시간 동안 방치한 후 세포 전체의 지질을 추출하였고, 추출된 지질은 질소 주입 하에서 용매를 증발시킨 후 일정량의 클로로포름:메탄올(1:2)에 녹여서 0.25-mm 실리카 젤에서 크로마토그래피를 실시하였다. TLC에서 지질의 분리는 hexan:에틸에테르:아세트산(80:20:1, v/v)의 혼합용액에서 이루어졌으며, Sigma에서 구입한 합성지질 마커를 이용하여 각각 다른 지질의 종류를 동정하였다. TLC에서 분리된 지질들은 요오드 기화로 염색하여 실리카 젤에서의 위치를 확인 후 해당하는 위치의 젤을 긁어내어 동위원소 활성을 측정하였다.

#### 4. mRNA 발현분석

세포내의 전체 RNA는 Trizol 용액을 이용하여 제조사(Invitrogen)의 제시방법에 따라 분리한 후, 분석이 이루어지기 전까지는 -80°C에 보관하였다. mRNA 분석은 quantitative PCR을 이용하여 측정되었으며, 우선 세포에서 분리된 RNA에 랜덤 헥사머(random hexamer)를 이용하여 first-strand cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA에 SYBR green PCR Master Mix (Invitrogen)을 첨가한 후 실시간 PCR 정량을 하였으며, 유전자 증폭 및 정량은 ABI Prism 7700 sequence detection system에서 이루어졌다. PCR 조건은 부착온도(annealing temperature)를 60°C로 하여 40 회전을 하였다. 각 유전자 검출을 위해 사용된 Primer는 Table 1에 나타내었다. PCR 결과는 유전자 증폭 후 검출기준치에 도달하는 증폭 회전수의 차이를 이용하여 분석되었고, mRNA의 정량에 있어 세포 수 혹은 실험도중의 오차를 보정하기 위하여 RPL32의 발현 정도에 대한 상대적인 발현치를 계산하였다.

Table 1. Primer sequences used for qRT-PCR analysis

Gene	Forward primer	Reverse primer
FAS	AGG ATG TCA ACA AGC CCA AG	ACA GAG GAG AAG GCC ACA AA
Perillipin2	CTC TCG GCA GGA TCA AAG AC	CGT AGC CGA CGA TTC TCT TC
ACC- $\alpha$	ATT GTG GCT CAA ACT GCA GGT	GCC AAT CCA CTC GAA GAC CA
ALBP	GAC CTG GAA ACT CGT CTC CA	CAT GAC ACA TTC CAC CAC CA
CD36	GGC TGT GTT TGG AGG CAT TCT	CAA AAA CTG GGT GAA AAC GGG
SREBP-1C	GGA GCC ATG GAT TGC ACA TT	AGA AGA GAA GCT CTC AGG AG
ChREBP	CGG GAC ATG TTT GAT GAC TAT	AAT AAA GGT CGG ATG AGG ATG
PPAR- $\gamma$ 1/2	CGA GAA GGA GAA GCT GTT GG	TCA GCG GGA AGG ACT TTA TG
PPAR- $\alpha$	TAC AAC CGG GAA GAC TTT GC	TGC AGA GAA GAT GCT GAT GG
PPAR- $\gamma$ 2	CAA GAA GCG GCG GGG AA	GCT CAT GTG ACC GGA GAG ATT T
RPL32	AAA CTG GCG GAA ACC CAG AG	GCA GCA CTT CCA GCT CCT TG

#### 5. 전사인자 활성분석

전사인자의 활성의 분석은 각기 다른 전사활성에 필요한 반응요소(responsive element)의 염기서열이 삽입된 plasmid DNA를 세포에 transfection하여 반응요소에 부착된 luciferase의 발현을 측정하여 이루어졌다. 모든 plasmid DNA의 transfection은 DNA와 세포에 nucleofector kit(Lonza, Switzerland)을 이용하여 electroporation에 의하여 실시되었다. 세포에 DNA가 삽입된 후 48시간 후에 EPA 혹은 BSA를 세포에 처리해 주었고, 6시간 후에 luciferase assay kit을 이용하여 세포에 삽입된 전사인자의 활성에 비례하는 초파리 루시페라제(firefly luciferase)의 형광활성을 측정하였으며, transfection 오차를 보정하기 위하여 전사인자의 구성요소를 세포에 transfection할 당시 renilla luciferase(pRL-SV40, Promega)를 20 ng씩  $0.5 \times 10^6$  세포에 transfection을 동시에 실시하여 내부보정 기준물로 사용하였다. 각 전사인자의 활성은 상대적 luciferase 단위(Relative luciferase Unit: RLU)로 표시하였다.

#### 6. 통계분석

실험 데이터는 means  $\pm$  S.E.로 표시되었으며, 결과의 유의수준은 Student *t* test를 이용하여  $p < 0.05$  수준에서 검정되었다.

## 결과 및 고찰

#### 1. EPA의 유입으로 인한 지방대사산물의 추적관찰

식품 중에서 관찰되는 대표적인  $\omega$ -3계열 지방산인 EPA의 간 세포 내에서의 대사과정을 살피기 위하여  $C^{14}$ 동위원소가 부착된 EPA를 세포에 처리한 후 처음에 생성되는 지질 대사물(중성지방, 인지질, 유리지방산)의 농도를 측정하고, 이들 지질 대사물의 생성 정도를  $C^{14}$ 동위원소가 부착된 올레산의

Table 2. Percent(%) composition of cellular lipids in [1-<sup>14</sup>C] fatty acids incorporation

	PL	DG	Fatty acids	TG	CE
EPA	21.70±0.10	7.17±0.14	4.34±0.42	65.83±0.41	0.96±0.10
Oleic acids	23.19±0.20	9.99±0.45	3.68±0.17	62.37±0.61	0.78±0.15

PL: phospholipids, DG: diacylglycerol, TG: triacylglycerol, CE: cholesteryl ester.

로 처리한 세포와 비교하였다. 세포에 지방산을 처리한 직후, 세포 외부에서 유입된 지방산으로 인한 지방 대사산물의 생성량 및 전체 비율은 중성지방 62~65%, 인지질 21~23%, 콜레스테롤 에스터 0.8~0.9% 등으로 큰 차이를 보이지 않았다(Table 2). 그러나 세포 내로 이미 유입된 지방산들이 대사가 이루어지는 시기(Chase)에는 EPA 처리를 한 세포의 경우, 중성지방의 축적이 66% 감소( $p<0.001$ )하였고, 인지질은 22% 감소하였다( $p<0.05$ )(Fig. 1). 그러나 올레산 처리를 한 세포의 경우 세포 내에 이미 존재하고 있는 올레산의 축적되는 정도가 감소하는 경향은 보였으나, 통계적으로 유의하지 않았으며, 인지질량의 변화도 유의적인 차이가 없었다. EPA와 올레산 모두 세포 내 유리지방산으로 존재하는 비율은 감소하였다. 이는 지방산구조 내에 이중결합이 많은 EPA가 세포 내 지방 축적비율이 훨씬 적다는 이전의 연구(Pawar & Jump 2003)와도 일치하며, 이미 세포 내에 유입된 지방산의 여러 대사경로의 이용 면에 있어서도 EPA가 올레산보다 더 신속하게 이

용되는 것으로 보인다. 또한 여러 보고들에 의하면 지방산들이 베타 산화과정으로 진입 시, 세포 외부에서 유입되는 지방산이 직접 산화과정을 거치는 비율보다 일단 세포 내에 여러 형태의 지방으로 전환되었다가 유리되는 지방산들의 이용률이 더 높은 것으로 알려지고 있어(Kanaley 등 2009), EPA도 세포유입 직후 산화과정을 거치기보다는 중성지방으로 먼저 전환된 후 대사가 이루어진 것으로 생각된다.

## 2. EPA가 지질 운반, 저장 및 지방 신생성에 관여하는 유전자 발현에 미치는 영향

방사성 동위원소 추적 실험에서, 올레산의 경우 세포내의 중성지방이나 인지질의 축적에 큰 변화를 보이지 않았기 때문에 EPA만을 선택하여 EPA가 지방 축적이거나 지방 신생성에 관여하는 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. EPA의 처리는 CD36의 mRNA 발현을 3배 이상 증가시켰으며, perilipin2의 발현도 4배 가까이 증가시켰다(Fig. 2a~c). 그러나 ALBP의 발현은 EPA에 의해 변화를 보이지 않았다. CD36는 fatty acid translocase로 알려져 있으며, 지방산의 세포 내 유입 시 운반체 혹은 통로 역할을 하는 단백질로 알려져 있어 주로 세포 내 유입 시 일반적으로 증가하는 유전자이며(Chabowski 등 2007), ADRP의 경우 중성지방 축적에만 특이적인 유전자로 중성지방이 지방구의 형태로 세포 내에 축적될 때 지방구(Lipid droplet) 주위를 포장하는 역할을 하여 지방구 안에 생성된 중성지방이 다른 리파아제 등에 의한 분해를 차단하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Sapiro 등 2009). ALBP(adipocyte lipid binding protein) 또한 지방산을 운반하는 역할을 하지만, 지방세포에 특이적인 단백질로 알려져 있으므로(Reese-Wagoner 등 1999), 간세포에서는 큰 변화를 보이지 않는 것으로 사료된다. 이들 지방유입 및 축적 관련 유전자들의 변화는 세포에 과량의 지방산이 유입된 결과로 보이며, 방사성 동위원소 추적대사실험에서 EPA에 의한 중성지방의 감소가 지방산 유입 감소가 아닌 세포내의 대사 변화에 의한 것임을 시사한다. 또한 포도당이 지방산으로 전화하는데 관여하는 효소인 fatty acid synthase(FAS), acetyl-CoA carboxylase- $\alpha$  (ACC- $\alpha$ )와 포도당의 이용에 관여하는 전사인자인 ChREBP의 발현은 EPA 처리에 의해 유의적인 변화를 나타내지 않았다(Fig. 2d~f). 세포 내에 지방산이 유입될 경우 주로 포도당

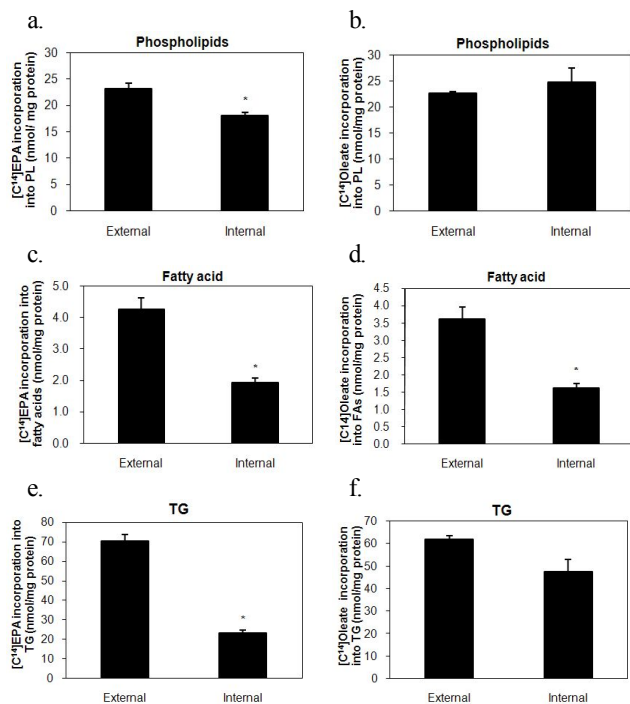
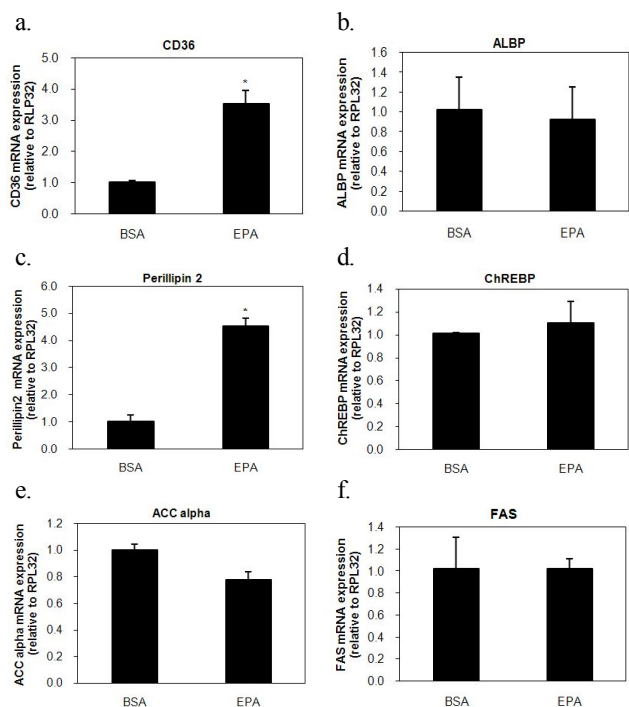


Fig. 1. Change of lipid metabolism by EPA. \* $p<0.05$  when compared with controls.

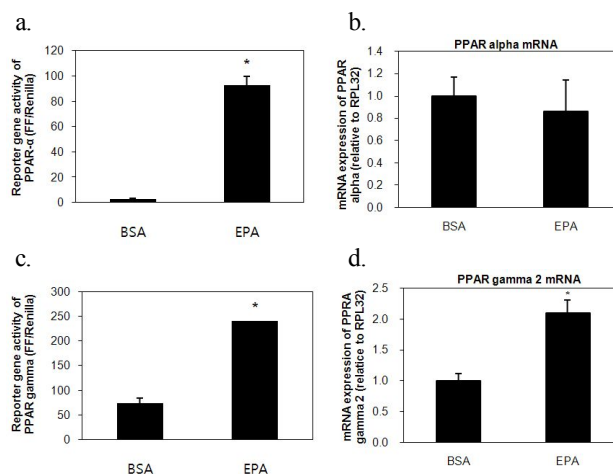


**Fig. 2. Effect of EPA on gene expression involving lipid synthesis and accumulation.** \* $p < 0.05$  when compared with controls.

이 지방산으로 전화되는 지방 신생성 과정이 감소하는 경향이 있어 포도당의 이용효율이 감소할 수 있으며(Robbez Masson 등 2008; Fedor & Kelly 2009), 이는 비만 동물실험 모델 혹은 임상에서의 비만 환자들이 인슐린 저항성이나 당뇨 등을 유발할 수 있는 원인이 될 수 있다(McGill 등 2011). 그러나 본 연구에서는 당 신생에 관여하는 유전자들의 발현 변화가 없는 것으로 보아 EPA는 지방 신생성 과정 변화 없이 중성지방으로의 전환 정도만 선택적으로 감소시키는 것으로 보인다.

### 3. EPA가 지방 축적 및 산화 관련 전사인자들의 활성과 발현에 미치는 영향

EPA가 중성지방 및 인지질로의 전환이 감소되었으나, 지방 신생성 과정 유전자 발현은 변화를 시키지 않았기 때문에, 지방 축적, 지방 신생성에 관여하는 전사인자의 활성과 또한 지방이 대사될 수 있는 또 다른 경로인 지방 산화과정에 관여하는 정도를 알아보기 위하여 지방 산화과정을 조절하는 것으로 알려진(Pawar & Jump 2002) PPAR- $\alpha$ 의 전사활성을 측정하였다. 전사활성의 측정은 PPAR responsive element(PPRE)가 있는 DNA plasmid를 세포에 주입하여 세포내의 전사인자들이 PPRE에 결합하는 정도를 관찰하였다. EPA의 처리는 지방산을 처리하지 않은 세포와 비교하여 PPAR 활성을 100배 이상( $p < 0.001$ ) 증가시켰으나 mRNA 발현에는 영향을 미치지

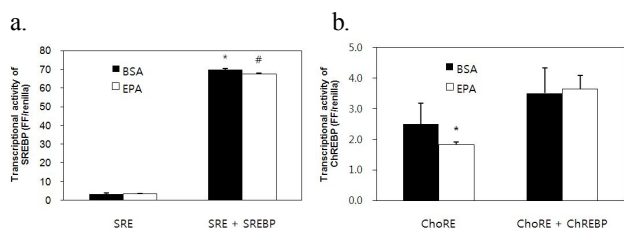


**Fig. 3. Transcriptional activity and gene expression of PPAR- $\alpha$  and PPAR- $\gamma$  by EPA.** \* $p < 0.05$  when compared with controls.

않았다(Fig. 3a~b). 이는 PPAR 전사인자의 발생량에 상관없이 전사인자의 활성만을 증가시킨 결과로 판단된다. 또한 같은 responsive element를 사용하지만, PPAR- $\alpha$ 와는 반대활성을 지닌(Zhang 등 2006) PPAR- $\gamma$ 의 활성 측정결과, EPA는 PPAR- $\gamma$ 의 측정을 2.5배( $p < 0.001$ ) 정도 증가시켰으며, PPAR- $\gamma$  mRNA 발현도 증가시켰다(Fig. 3c,d). 이는 PPAR- $\gamma$ 의 전사활성 증가뿐만 아니라 전사인자의 생성량도 많아진 것에 기인한 것으로 전사활성의 조절에 있어서는 EPA가 PPAR- $\gamma$ 보다 PPAR- $\alpha$ 에 더 특이적인 것으로 보인다. 또한 PPAR- $\gamma$ 의 전사활성은 지방산 자체에 의해서도 조절되지만  $\omega 3$  지방산의 주요 대사산물인 여러 형태의 프로스타글란딘(prostaglandins)에 의해서도 활성이 되므로(Figueras 등 2011), EPA가 지방 신생성 관련 전사활성 및 유전자 조절에 미치는 효과가 EPA가 아닌 프로스타글란딘에 의한 조절일 수 있다. 그러나 EPA는 같은 계열  $\omega 3$  지방산인 DHA에 비해 혈관세포 등에서의 NO생성량이 낮은 것으로 보고되었고(Mori 등 2000), EPA 처리시 프로스타글란딘에 의한 조절이 상대적으로 적은 PPAR- $\alpha$ 의 활성이 더 많이 증가한 것으로 보아 본 연구의 실험조건에서의 결과들은 EPA에 의한 직접적인 영향이라고 사료된다.

### 4. EPA가 인슐린 신호전달 및 포도당이용 효율에 관여하는 전사인자의 활성에 미치는 영향

위의 결과들을 종합해 보면 EPA가 중성지방으로 전화되는 비율이 감소하고, 지방 산화 관련 전사인자의 활성은 증가시켰으나, 세포내의 지방 신생성에 관여하는 유전자들의 변화는 없었으므로 EPA에 의한 포도당의 이용효율이 감소할 수 있는 우려가 있다. 그래서 EPA가 포도당이 지방으로 전환되



**Fig. 4. Change of transcriptional activity of ChREBP by EPA.** \* $p < 0.05$  when compared with controls. # $p < 0.05$  when compared with EPA controls.

는데 관여하는 전사인자의 활성화에 미치는 영향을 분석하기 위해 본 연구에서는 Stearoyl CoA responsive element(SRE)와 Carbohydrate responsive element(ChoRE)가 세포 내에서 전사인자에 의해 활성화되는 정도를 측정하였다. SREBP는 주로 두 종류가 있는데, 주로 콜레스테롤 대사에 관여하는 것으로 알려져 있으며, SREBP 1-a는 콜레스테롤 신생성 과정을 조절하고, SREBP1-c는 콜레스테롤대사보다는 주로 지방 신생성 과정에 더 많은 영향을 미치며(Repa 등 2000; Xu 등 2001), 포도당 농도보다는 인슐린 신호전달에 의해 직접적인 영향을 많이 받는 전사인자로 알려져 있다. ChREBP는 포도당에 의해 직접적으로 활성화되는 전사인자이며, L-pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase 등 포도당이 이용될 수 있는 에너지 대사에 관여하는 유전자들의 발현을 조절한다(Stoekman 등 2004). 전사인자의 활성화 분석 결과, EPA는 SREBP1-c가 활성화 되지 않은 상태와 활성화 된 상태 모두에서 SRE의 활성화의 차이를 보이지 않았다(Fig. 4a). 그러나 포도당 이용에 직접 영향을 주는 ChoRE의 활성화는 EPA 처리에 의해 26.8% 감소하였다. 그러나 ChREBP가 활성화 된 상태에서는 지방산이 없는 BSA 처리군과 차이를 보이지 않아(Fig. 4b), EPA가 포도당 이용에 관련된 전사인자의 활성화 자체는 감소시키지만, 포도당 혹은 다른 물질 등에 의해 전사인자가 이미 활성화 된 조건에서는 더 이상의 전사활성에 영향을 미치지 않으므로 포도당 이용과 관련된 유전자 발현에 큰 영향을 주지 않는 것으로 보인다. 이는 EPA가 지방 축적을 감소시키는 효과가 있더라도 포도당 이용 효율은 방해하지 않는 결과로 사료되며, EPA가 다른 여러 동물, 임상실험에서 보고된 에너지대사 향상, 동맥경화 예방, 심장병 예방의 효능을 발휘하면서도 인슐린 저항성, 포도당 내성 증가, 당뇨 등의 부작용이 현저하지 않았던 현상(Mori 등 1997; Figueras 등 2011)을 부분적으로 설명할 수 있는 결과이다.

## 결론 및 요약

이전의 연구에서 EPA는 지방 축적 감소, 동물실험에서 지

방산의  $\beta$ -산화과정을 증가시키는 것으로 알려졌으나, 전사인자 수준에서의 연구가 미흡하였다. 본 연구는 EPA의 대사과정 중에 발생하는 유전자 발현 및 전사인자의 변화를 살펴 그 분자생물학적 기전에 대해 규명하였으며, 특히 본 연구에서는 방사성 동위원소를 이용하여 직접 추적하는 방식으로 실제로 지방이 대사되는 과정을 모니터할 수 있었다. 이전의 연구들에 의하면 지방 축적 과정을 억제하는 화합물들은 포도당이 지방산으로 전화되는 과정까지 감소시킴으로써 포도당 이용성 저하에 의한 세포 내 에너지 결핍 혹은 순환계 중에 고농도로 존재하게 되어 인슐린 저항성이나 당뇨를 유발할 수 있는 위험성이 있다. 본 연구에서는 EPA는 EPA 자체가 중성지방으로 축적되는 대사경로는 감소시켰으나, 고농도의 포도당에 의해 활성화되는 것으로 알려진 ChREBP의 발현 하에서는 ChoRE의 활성을 회복시킴으로써 지방 축적경로의 억제로 유발될 수 있는 포도당 이용 감소를 완화하는 긍정적인 영향을 주는 것으로 보인다. 또한 지방산의  $\beta$ -산화과정 대사산물의 측정 및 포도당의 직접적인 처리에 의한 유전자 발현의 변화에 대한 연구가 더 필요할 것으로 보인다. 본 연구에서 관찰된 EPA에 반응하는 유전자들은 비만, 당뇨, 암 등 여러 질병과정에서도 중요한 역할을 하므로, 향후 다른 기능성 식품성분들의 질병에 대한 효능평가에 있어서 식품성분에 의해 직접 영향을 받는 표적물질로써도 유용한 연구 대상이 될 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 2011 학년도 경일대학교 교내 일반학술연구비로 수행되었습니다.

## 참고문헌

- Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911-917
- Bu SY, Mashek MT, Mashek DG. 2009. Suppression of long chain acyl-CoA synthetase 3 decreases hepatic *de novo* fatty acid synthesis through decreased transcriptional activity. *J Biol Chem* 284:30474-30483
- Chabowski A, Górski J, Luiken JJ, Glatz JF, Bonen A. 2007. Evidence for concerted action of FAT/CD36 and FABP to increase fatty acid transport across the plasma membrane. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 77:345-353
- Choe WK, Yoon OH, Kang BT. 1998. Effects of n-3 Polyunsaturated fatty acids on glucose uptake of soleus muscle in

- NIDDM diabetic rats. *Korean J Food Nutr* 11:550-555
- Elmadhoun BM, Wang GQ, Templeton JF, Burczynski FJ. 1998. Binding of [3H]palmitate to BSA. *Am J Physiol* 275:638-644
- Fedor D, Kelley DS. 2009. Prevention of insulin resistance by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 12:138-146
- Figueras M, Olivan M, Busquets S, López-Soriano FJ, Argilés JM. 2011. Effects of eicosapentaenoic acid(EPA) treatment on insulin sensitivity in an animal model of diabetes: improvement of the inflammatory status. *Obesity(Silver Spring)* 19:362-369
- Jay MA, Ren J. 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev* 3:33-39
- Kanaley JA, Shadid S, Sheehan MT, Guo Z, Jensen MD. 2009. Relationship between plasma free fatty acid, intramyocellular triglycerides and long-chain acylcarnitines in resting humans. *J Physiol* 587:5939-5950
- Kim DS, Ihm JG, Kim HD. 1999. Contents of polyunsaturated fatty acid in the pufferfish(*Lagocephalus gloveri*) liver oil. *Korean J Food Nutr* 12:113-118
- Klaunig JE, Goldblatt PJ, Hinton DE, Lipsky MM, Chacko J, Trump BF. 1981. Mouse liver cell culture. I. Hepatocyte isolation. *In Vitro* 17:913-925
- Li X, Hansen PA, Xi L, Chandraratna RA, Burant CF. 2005. Distinct mechanisms of glucose lowering effect by specific agonists for peroxisomal proliferator activated receptor gamma and retinoic acid X receptors. *J Biological Chem* 280:38317-38327
- McGill JB, Peterson LR, Herrero P, Saeed IM, Recklein C, Coggan AR, Demoss AJ, Schechtman KB, Dence CS, Gropler RJ. 2011. Potentiation of abnormalities in myocardial metabolism with the development of diabetes in women with obesity and insulin resistance. *J Nucle Cardiol* 18:421-429
- Mori TA, Watts GF, Burke V, Hilme E, Puddey IB, Beilin LJ. 2000. Differential effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on vascular reactivity of the forearm microcirculation in hyperlipidemic, overweight men. *Circulation* 102:1264-1269
- Mori Y, Murakawa Y, Katoh S, Hata S, Yokoyama J, Tajima N, Ikeda Y, Nobukata H, Ishikawa T, Shibutani Y. 1997. Influence of highly purified eicosapentaenoic acid ethyl ester on insulin resistance in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat, a model of spontaneous non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 46:1458-1464
- Morris KL, Namey TC, Zemel MB. 2003. Effects of dietary carbohydrate on the development of obesity in heterozygous Zucker rats. *J Nutr Biochem* 14:32-39
- Nam JH. 1994. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on tocopherol contents and lipid peroxidation of plasma and tissue in rats fed high fat diet. *Korean J Food Nutr* 7: 373-382
- Nettleton JA, Lutsey PL, Wang Y, Lima JA, Michos ED, Jacobs DR Jr. 2009. Diet soda intake and risk of incident metabolic syndrome and type 2 diabetes in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis(MESA). *Diabetes Care* 232:688-694
- Pawar A, Jump DB. 2003. Unsaturated fatty acid regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity in rat primary hepatocytes. *J Biol Chem* 278:35931-35939
- Pawar A, Xu JH, Jerks E, Mangelsdorf DJ, Jump DB. 2002. Fatty acid regulation of liver X receptors(LXR) and peroxisome proliferator-activated receptor alpha(PPAR alpha) in HEK293 cells. *J Biol Chem* 277:39243-39250
- Perez-Martinez P, Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J. 2010. n-3 PUFA and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1801:362-366
- Reese-Wagoner A, Thompson J, Banaszak L. 1999. Structural properties of the adipocyte lipid binding protein. *Biochim Biophys Acta* 1441:106-116
- Repa JJ, Liang GS, Ou JF, Bashmakov Y, Lobaccaro JMA, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ. 2000. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene(SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Development* 14:2819-2830
- Robbez Masson V, Lucas A, Gueugneau AM, Macaire JP, Paul JL, Grynberg, Rousseau D. 2008. Long-chain(n-3) polyunsaturated fatty acids prevent metabolic and vascular disorders in fructose-fed rats. *J Nutr* 138:1915-1922
- Sapiro JM, Mashek MT, Greenberg AS, Mashek DG. 2009. Hepatic triacylglycerol hydrolysis regulates peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity. *Lipid Res* 50:1621-1629
- Shoham DA, Durazo-Arvizu R, Kramer H, Luke A, Vupputuri S, Kshirsagar A, Cooper RS. 2008. Sugary soda consumption and albuminuria: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2004. *PLoS One* 3: e3431
- Stoekman AK, Ma L, Towle HC. 2004. Mlx is the functional heteromeric partner of the carbohydrate response element-

- binding protein in glucose regulation of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem* 279:15662-15669
- Xu J, Teran-Garcia M, Park JHY, Nakamura MT, Clarke SD. 2001. Polyunsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulatory element-binding protein-1 expression by accelerating transcript decay. *J Biol Chem* 276:9800-9807
- Zhang YL, Hernandez-Ono A, Siri P, Weisberg S, Conlon D, Graham MJ, Crooke RM, Huang LS, Ginsberg HN. 2006. Aberrant hepatic expression of PPARgamma2 stimulates hepatic lipogenesis in a mouse model of obesity, insulin resistance, dyslipidemia, and hepatic steatosis. *J Biol Chem* 281:37603-37615
- 
- 접 수 : 2011년 8월 25일  
최종수정 : 2011년 11월 9일  
채 택 : 2011년 11월 18일