

Expressional Analysis of Two Genes (*Scd1* and *Idi1*) Down-regulated by Starvation Stress

Junho Cho¹, Young-Sook Kwon², Dong-Il Kim³, Bok Jo Kim⁴ and Kisang Kwon^{4*}

¹Department of Emergency Medicine, Inje University Haeundae-Paik Hospital, Busan 612-896, Korea

²Department of Nursing, Joongbu University, Geumsan 312-702, Korea

³Department of Health care & biotechnology, College of Health & Welfare, Kyungwoon University, Gumi 730-739, Korea

⁴Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health & Welfare, Kyungwoon University, Gumi 730-739, Korea

Received March 28, 2014 / Revised July 24, 2014 / Accepted July 24, 2014

Diet exerts a major stress on the body and may affect gene expression and physiological functions. Understanding of cellular responses during starvation is necessary in developing strategies to reduce damage caused by diet. In this study, we isolated 10 genes (*Comt*, *RGN*, *Scd1*, *Tent*, *Idi1*, *Fabp5*, *Car3*, *Cyp2c70*, *Pinx1*, and *Poldip3*) that are down-regulated in starvation and are closely related to liver metabolism. Water supply during starvation had no effect on the induction of apoptosis, autophagy, and ERQC. The genes down-regulated by starvation were associated with many related pathways rather than limited to the liver homeostasis pathway. Water supply during starvation is important. However, maintaining NaCl homeostasis is more important. The results are thought to be closely related to gender-specific metabolism in starvation and NaCl.

Key words : *Idi1*, *Scd1*, starvation

서 론

비만이란 지방이 체내에 비정상적으로 축적됨으로 인하여 정상적인 생리 상태를 유지하기 어려운 것을 말한다. 체내에서 대사에 사용되지 않은 지방이 피하층 혹은 내장 사이에 쌓이면 대사질환에 쉽게 노출되어 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 동맥경화, 퇴행성관절염, 수면 무호흡, 담석증, 지방간, 암 등의 원인이 될 수 있다. 1997년 WHO에서는 비만을 '치료를 해야 하는 질병'으로 규정하고 적극적인 치료를 권장하고 있다. 우리나라도 1970년대 후반부터 급격하게 경제가 발전하면서 소득이 늘어났고 기름진 음식을 많이 섭취하면서도 운동량이 상대적으로 감소하면서, 현재는 성인 10명 중 3명 정도가 비만에 노출되고 있다. 비만해진 사람들은 어느 정도까지는 크게 자각하지 않고 생활하지만, 주위에서 일어나는 다이어트 열풍에 자신의 비만을 자각하게 되면 급속한 원상회복을 원하게 된다. 그래서 짧은 시간 안에 체중을 감량할 수 있는 방법에 관심을 가지게 된다. 단시간의 집중적인 체중감소를 위한 다이어트는 비타민, 무기질 등 필수 영양소를 섭취할 수 없고 근육량이 줄어 질병에 대한 저항력이 떨어지게 된다. 현대식

단과 생활습관은 급격하게 신체대사에 원하지 않은 비만과 심장병계통의 질환을 유발하는 결과를 초래하게 되었다. 비록 비만과 관련된 대부분의 대사질환은 높은 수준의 phenylalanine을 포함하고 있는 음식을 피하는 적절한 다이어트를 통해서 극복할 수 있으며 습식 칼로리를 제한하는 것은 분명한 효과가 있다, 그러나 이와 같은 다이어트과정에서 일어나는 생리적 반응의 분자기전은 불분명하다[5]. 본 연구는 다이어트가 질병과 노화와 같은 급속한 대사변화의 진행에 미치는 영향을 이해하기 위하여, 급속한 영양상태의 변화가 조절하는 유전자 및 신호전달기전에 관련된 실마리를 제공하는 것이다.

포유실험동물에 비해서 사육조건과 분석이 용이한 누에(silkworm)를 사용하여 만들었다. 누에의 fat body는 포유동물의 liver에 해당하는 기능을 가지고 있으며 대사적으로 중요한 대부분의 유전자와 대사기전을 공유하고 있다. 누에의 fat body를 현미경하에서 분리하여 glucose free medium에서 24 시간 후 배양한 후에 total RNA를 분리하여 DD-PCR실시하여 차별적으로 발현이 상승하는 유전자를 분리하였다. 이렇게 분리된 유전자중 *Scd1*과 *Idi1*을 대상으로 *in vivo/in vitro*에서 유전자 발현을 조사하고 그들 조직의 변화를 관찰한다.

Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1 (*Scd1*)은 endoplasmic reticulum membrane에 존재하는 iron-containing 효소로서 fatty acid metabolism에서 Stearoyl-CoA의 double bond형성을 담당하며 주산물은 stearic acid의 desaturation에 의해서 생산하는 oleic acid이다. Oleic acid생산율은 cell membrane fluidity and signal transduction을 통해서 세포성장과 분화에 깊이 관계가 있다[3]. 지금까지 4개의 *Scd* isoform이

*Corresponding author

Tel : +82-54-479-1284, Fax : +82-54-479-1280

E-mail : ppkisang@empal.com

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

알려지고 있다, 그 중에서 human에는 *Scd1*과 *Scd5b*가 존재한다. *Scd1*유전자는 359 amino acids (41,523 Da)를 chromosome 4에 코드하고 있으며 전사물로는 3.9 and 5.2 kb을 만든다[6]. 아래의 그림과 같이 *Scd1*의 발현에 따라서 세포내 cholesterologenesis에 많은 영향을 미친다. *Scd1*이 상승발현하면 liver X receptor (LXR)의 발현이 상승하여 bile acid생산이 증가하는 반면에 *Scd1*이 하강발현하면 triglyceride를 통한 very-low-density lipoprotein (VLDL)과 cholesterol ester의 생산이 증가된다. 이런 과정을 통해서 *Scd1*은 cholesterologenesis와 lipogenesis간의 균형을 유지하는데 크게 관여하는 효소이다[4]. *Scd1*결손에 의한 질환으로는 systemic primary carnitine deficiency disease (plasma membrane을 통과하는 carnitine관련 transporter의 결함이 원인이 되어 fatty acid transport에 태생적인 결함을 가지는 질환)와 familial combined hyperlipidemia (혈중 high cholesterol과 high blood triglyceride가 원인이 되어서 early heart attack을 가지는 유전질환)이 알려지고 있다[1]. Isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1 (*Idi1*)은 isopentenyl pyrophosphate isomerase; IPP로도 불리며 227 amino acids (26,319 Da)로 구성된 peroxisomally-localized enzyme으로 isopentenyl diphosphate를 highly electrophilic isomer인 dimethylallyl diphosphate (DMAPP, cholesterol의 전구체)로 전환을 촉매한다[2]. *Idi1*의 isomerization기능은 mevalonate pathway를 통한 isoprenoid 생합성의 중요한 단계이다[9]. Cholesterol biosynthesis와 geranylgeranyldiphosphate biosynthesis I (via mevalonate)에 관여하기 때문에 *Idi1*의 결손에 의해서 생기는 질환으로는 Zellweger syndrome (intracellular peroxisome의 감소 혹은 소멸)과 neonatal adrenoleukodystrophy (peroxisome biogenesis결합인 autosomal recessive질환)가 알려지고 있다[13]. 기능연구를 위하여 human *Idi1*의 구조가 1.7Å resolution 수준에서 결정되었다[14].

재료 및 방법

실험동물 & 세포배양

Rat는 200 g 정도의 암, 수를 사용하였으며, 실험 전날 공급 받아 하룻밤 안정화시켰다. Rat의 각종 장기는 도살 후 즉시 냉각된 각각의 buffer (4% paraformaldehyde 용액; 조직실험, RNAzol™ B; total RNA분리)에 보관하였으며, 누에(*Bombyx mori*)는 충남 잠사곤충사업장(장장 최택용)에서 공급받았으며, 누에의 fat body는 광학현미경하에서 순수하게 분리하여 rat와 동일하게 total RNA를 분리하였다. PCCL3 배양세포(rat thyroid cell line)는 5% 우혈청을 포함한 Coon's modified media에서 배양하였다. 배양조건은 37°C, 5% CO₂, 95%이상의 적당한 습도를 유지하였다. 신선한 배지를 2일 간격으로 교체하며 배양하였으며, 1주일에 한 번씩 계대 배양하였다. 실험에

쓰이는 세포는 70~90%의 충실도를 보이는 세포를 사용하였다.

Total RNA 분리

Total RNA 분리에는 RNAzol™ B kit (Tel-Test, Inc. TX, USA)를 사용하였다. Fat body 조직을 RNAzol™ B 800 µl와 함께 1.5 ml tube에 넣고 얼음 위에서 덩어리가 없어질 때까지 homogenization 시킨 다음 RNA 추출 용액 200 µl를 첨가하여 약 30초간 교반 후 상온에서 5분간 방치하였다. 12,000xg (4°C)에서 15분간 원심 분리하여 얻은 500 µl의 상층액에 500 µl의 isopropanol을 첨가하여 4°C에서 15분간 방치 후 다시 12,000x g (4°C)에서 15분간 원심 분리하여 튜브의 바닥에서 백황색의 침전물을 얻었다. 이 침전물에 75% ethanol 500 µl를 첨가하고 잘 교반하여 7,500x g (4°C)에서 8분간 원심 분리하여 RNA를 얻었으며 total RNA의 질량은 spectrophotometer로 측정하였다. RNA를 다룰 때는 항상 장갑을 착용하였고 diethylpyrocarbonate (DEPC) 처리된 물을 사용하였으며, -20 °C에서 1 mM의 EDTA (pH 7)를 함유한 DW에 보관하였다.

DD-PCR

mRNA level의 발현 정도에 차이를 보이는 것을 찾기 위해서 GeneFishing DEG premix kit (Seegene Co.)를 이용하여 DD-PCR을 시행한다. Harvest 한 세포에서 얻은 total RNA 3 µg을 10 µM의 dT-ACP1 2 µl와 함께 80°C에서 3분간 가열하여 denature 시킨 후, cold ice에서 급랭한다. 4 µl의 5× RT buffer, 4 µl의 dNTP (each 2.5 mM), 0.5 µl의 RNase inhibitor (40 u/µl), 1 unit M-MLV reverse transcriptase (200 u/µl)를 가하고 총 반응액이 20 µl가 되도록 조절한 후 42°C에서 90분 동안 반응시켜 cDNA를 합성한다. GeneFishing PCR를 위하여 dT-ACP2와 각각의 arbitrary ACP를 primer로 하여 cDNA를 증폭시키고 2%의 agarose gel에서 PCR product를 전기영동하여 차별적으로 발현하는 fragment를 확인 후 subcloning, sequencing과정을 거쳐 유전자를 확인한다.

RT-PCR

역전사반응은 42°C에서 90분간, RTase 비활성화 반응은 94°C에서 2분간 수행하였으며 이후 4°C에서 보관하였다. 위의 과정에 의해 합성된 cDNA는 MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (BIO-RAD, USA) PCR 기기를 이용하여 RT-PCR을 수행하였으며 사용된 primer는 모두 바이오니아(대전)에서 합성하여 사용하였다. RT-PCR의 반응 조건은 94°C에서 5분 동안 초기 변성을 시켜준 후 94°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 40초로 29회 반복한 후 마지막 합성은 72°C에서 5분으로 수행하였다. 증폭된 PCR 산물을 1% agarose gel에 전기 영동시켜 확인하였다. RT-PCR에 사용된 primer는 아래

와 같다. 실험에서 특별하게 언급하지 않은 시약은 Sigma사에서 구입하여 사용하였으며 최소 3회 최대 6회 동일한 실험을 반복하였다. 본 실험에 사용된 PCR primer는 다음과 같다. Scd1-F; 5'-tcctgctcatgtgcttcac-3', Scd1-R; 5'-ggatgttctccgagattga-3', Id1-F; 5'-gtcaaacgagcagcacagag-3', Id1-R; 5'-gatccgattcagggttaca-3'.

Western blotting

Protein electrophoresis kit (ATTO Co., Japan)를 사용하여 12% SDS-PAGE에 준비된 sample을 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 후 transfer kit (Bio-RAD, USA)를 사용하여 gel의 protein을 PVDF cell membrane (PALL corporation, USA)에 transfer buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM glycine, 20% methanol, pH 8.3)를 사용하여 transfer하였다. Transfer가 끝난 후 membrane을 PBST (PBS, 0.05% Tween20)와 5% skim milk를 사용하여 상온에서 1시간 동안 blocking하였다. Blocking이 끝난 후 1차 반응 시킬 때에는 PBST와 5% skim milk에 1:500~1:2,000의 비율로 희석하여 4°C에서 3시간 동안 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 후 membrane을 PBST로 10분씩 5회 상온에서 shaker를 사용하여 세척하였다. 세척이 끝난 후 2차 항체를 반응 시킬 때에는 PBST에 1:2,000의 비율로 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응 시켰으며, 반응이 끝난 후 membrane을 PBST로 10분씩 5회 상온에서 shaker를 사용하여 세척하였다. 세척이 끝난 후 West save (Lab Frontier, Korea)를 사용하여 발색반응을 유도한 후 X-ray film에 감광하여 결과를 분석하였다.

Immunofluorescence

Paraffin section tissue를 Deparaffin (Zylene 15 min, 2 time)과 rehydration (EtOH 100%-95%-90%-80%-70%, 각각 1 min)한 다음에 DW로 5 min 간 washing한다. 0.01 M Citrate buffer (pH 6.0) 4 min, 20분 동안 antigen retrieval을 실시한 후에 0.05 M PBS로 3회 각 10분간 washing한다. 비특이적 반응을 억제하기 위해서 normal serum blocking을 30분간 실시한다. 조직이 마르지 않게 해야 하여 조직 크기에 알맞게 dakopen으로 테두리를 두껍게 그려 dakopen을 말린 후 각 슬라이드에 50~100 µl씩 분주한다. 반응액(3% triton 100 µl, serum 50 µl, PBS 850 µl/1l) 1st Ab와 overnight 반응시킨 후 0.05 M PBS로 10분 간 3회 washing한다. Cy-biotin Rb (1/500), 2 hr [Cy-conjugated anti-rabbit IgG] 후에 위의 반응액으로 10분간 3회 washing한다. 2nd Ab와 overnight 반응시킨 후 0.05 M PBS로 10분간 3회 washing한다. Biotinylated Anti-M IgG [1/200]을 2시간 반응시킨 후에 0.05 M PBS로 다시 10분 간 3회 washing한다. DW로 수세 후 70%-80%-90%-95%-100% EtOH washing을 각각 1분간 실시한 다음에 zylene을 15분간 처리한 후 mounting을 한다.

결 과

누에 5령 1일의 몸무게는 0.8 g이지만, 뽕잎을 먹는 양이 급격히 늘면서 5령 2일째는 1 g, 5일-2.8 g, 6일-3 g, 8일-4.5 g로 급격하게 증가한다. Starvation 실험은 5령 3일되는 누에를 사용하였다, 하룻밤 동안 뽕잎을 공급하지 않는 starvation 처리를 하면 약 30%의 몸무게감소를 보였다[10]. 이후의 실험은 누에의 fat body조직을 사용하여 필요한 단백질과 total RNA분리하였다. 누에를 핀으로 고정하여 움직이지 못하게 한 다음에 등 쪽의 피부를 longitudinal section한다. 몸의 대부분을 차지하고 있는 장을 제거한 후에 피부에 붙어있는 신경관을 핀셋으로 제거한다. 누에의 꼬리피부에 붙어있는 fat body 조직을 yellow chip으로 끌어 모은 다음에, 실제현미경으로 cold PBS 속에서 fat body 조직 이외의 물질을 제거하여 순수한 누에 fat body 조직을 모아서 -80°C에서 다음 실험 때까지 보관한다. RNazol™B Kit를 사용하여 누에 total RNA를 정제 후에 GeneFishing DEG premix kit (Seegene Co.)를 사용하여 DD-PCR을 시행하였다. GeneFishing DEG premix kit는 mammalian 유래의 genome을 대상을 만든 것이지만 예비실험결과 누에에서도 신뢰할 수 있을 정도로 up-/down-regulation이 확인되어 본 실험에 사용하게 되었다. 아래와 같이 down-regulation되는 유전자 10개를 분류하였다. Catechol- O-methyltransferase (*Comt*), Regucalcin (senescence marker protein-30) (*RGM*), Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1 (*Scd1*), Thioether S-methyltransferase (*Tent*), Isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1 (*Idi1*), Fatty acid binding protein 5, epidermal (*Fabp5*), Carbonic anhydrase 3 (*Car3*), Cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 70 (*Cyp2c70*), PIN2/ TERF1 interacting, telomerase Inhibitor 1 (*Pinx1*), Polymerase (DNA-directed), delta interacting protein 3 (*Poldip3*).

Starvation에 의해서 *Poldip3*를 제외한 9개 유전자는 liver에서 약하게 발현하였다. 특히 *Cyp2c70*은 starvation에 의해서 liver특이적으로 발현하였다. *Scd1*은 24시간 starvation에서 가장 강하게 하강발현하였고 *Idi1*은 4시간 starvation이후부터 하강발현하였다. Starvation에 의해서 하강 발현하는 유전자로서 이후의 실험에서는(stearoyl-coenzyme A desaturase 1, *Scd1*), (isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1, *Idi1*)을 대상으로 정한 다음 *Scd1*, *Idi1*유전자발현이 단백질발현까지 연결되는 것을 Western blotting과 형광현미경으로 확인하였다 (data not shown). Starvation에 의한 *Scd1*, *Idi1*유전자의 발현이 타 장기에 비하여 liver에서 강하게 발현하는 것을 알았다. 이때에 liver가 받는 stress 정도를 알기 위하여 endoplasmic reticulum (ER) stress chaperone, apoptosis (Bax, Bcl2)와 autophagy (LC3a, Beclin)관련 인자들의 발현변화를 측정하였다. 압수 동일하게 ER stress chaperone, apoptosis와 auto-

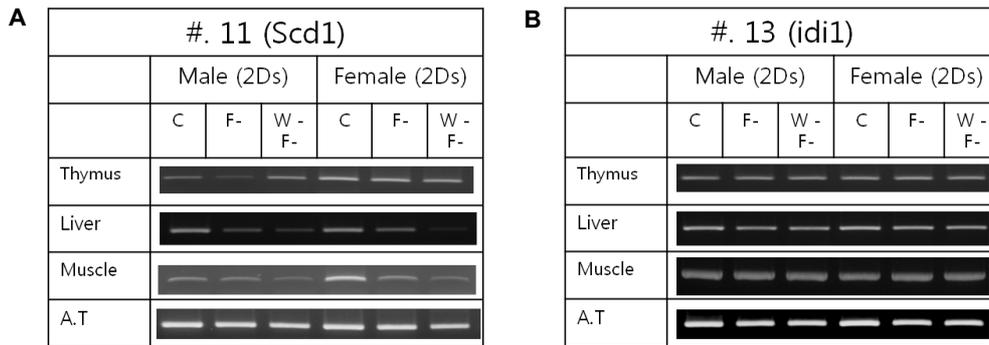


Fig. 1. Starvation conditions by a variety of changes in the mRNA expression of two genes. (A), (B) Two days starvation with water (F) or without (F-W) changes *Scd1/Id1* mRNA expression in the various rat organs of the male and female.

phage관련 인자들의 유의한 유전자의 발현변화는 관찰되지 않았다(data not shown).

Starvation 동안에 물 공급이 ♀/♂에서 *Scd1*, *Id1* 유전자의 발현에 미치는 영향을 알기 위하여 2일간 starvation 동안에 물 공급군과 물을 공급하지 않는 군으로 나누어 관찰하였다. *Scd1* 유전자 발현은 starvation에 의해서 ♀/♂에서 동일하게 liver, muscle에서 물이 공급될 때보다가 물이 공급되지 않는 상태에서 더욱 하강발현하였다. 그러나 *Id1* 유전자는 ♀/♂에서 동일하게 물 공급에 의한 주목할 만한 유전자 발현변화가 나타나지 않았다(Fig. 1).

개체에서 starvation 처리시간에 의한 *Scd1*, *Id1* 유전자 발현 변화를 알기 위하여, rat를 1-3일간 starvation 시킨 뒤에 각종 장기에서 *Scd1*, *Id1* 유전자의 발현을 조사하였다. Fig. 2에서

보는 것과 같이, 유전자 *Scd1*의 발현은 starvation에 의해서 cerebral cortex와 kidney에서는 변화가 없지만 cerebellum에서는 2일째에 발현이 완전히 멈추고, thymus와 muscle에서는 3일까지 순차적으로 하강하였다. Heart에서는 starvation 1일부터 급격하게 *Scd1*의 발현이 하강하였다. 유전자 *Id1*의 발현은 *Scd1* 유전자와 같이 심한 발현변화보다는 cerebellum, thymus, liver, lung, heart에서 starvation 1-3일 동안에 점차적으로 발현이 하강하였다.

간헐 starvation에 의한 *Scd1*, *Id1* 유전자의 발현양상을 관찰하였다. 2일간 starvation 군과 2일간 starvation 후 1일간 먹이를 공급한 군과 2일간 starvation + 1일간 먹이를 공급 + 2일간 starvation한 군으로 나누었다. 유전자 *Scd1*의 발현은 cerebellum의 경우는 2일간 starvation 군과 2일간 starvation 후

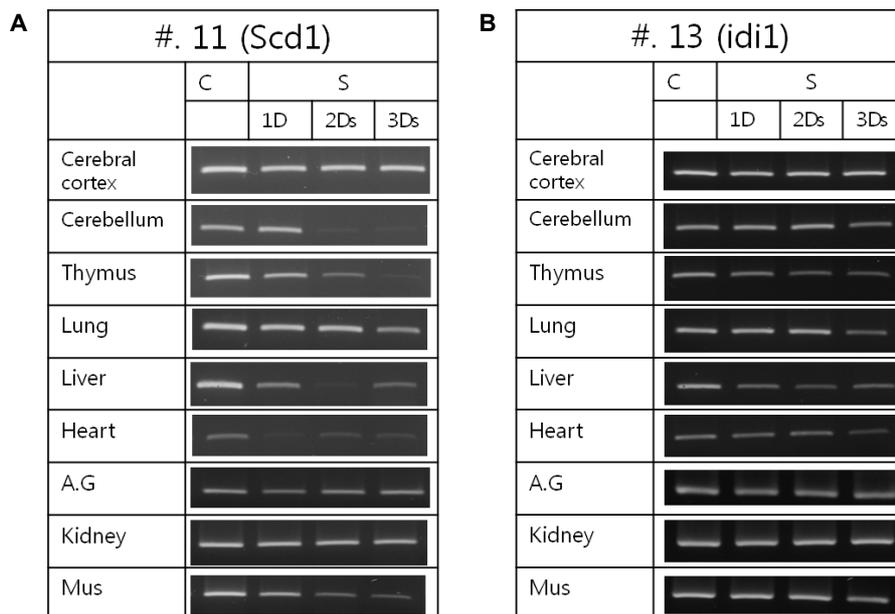


Fig. 2. Starvation changes the expression of two genes in the various rat organs. (A) Starvation (1-3 day) changes *Scd1* mRNA expression in the various rat organs. (B) Starvation (1-3 day) changes *Id1* mRNA expression in the various rat organs. The experiments were performed three times and represent resulting above fig is one of them.

1일간 먹이를 공급한 군에서 발현이 약해진 후 2일간 starvation +1일간 먹이를 공급 +2일간 starvation한 군에서 control과 같은 수준 정도의 발현을 보였다. Thymus에서는 2일간 starvation +1일간 먹이를 공급한 군에서 가장 강한 발현을 보였다. Liver에서는 2일간 starvation에 의해서 발현이 완전히 없어진 후에 다시 1일간 먹이를 공급하면 정상발현으로 돌아왔다, 다시 2일간 starvation하면 발현이 다시 완전히 살아졌다. Muscle에서는 2일간 starvation후에 control보다가 강한 발현을 보이지만 2일간 starvation +1일간 먹이를 공급 +2일간 starvation한 군에서 발현이 완전히 살아졌다. Adipo tissue에서는 starvation이 시작되면 발현이 거의 살아졌다. 유전자 *Idi1*의 발현은 간헐 starvation에 크게 연관된 발현형태를 보이지는 않았다(cerebellum, thymus, lung), 그러나 liver에서는 2일간 starvation +1일간 먹이를 공급에 의해서 발현이 원상태로 회복되었으나 adipo tissue에서는 부분적인 회복이 관찰되었다(Fig. 3). 물과 함께 생체항상성을 유지하기 위하여서는 NaCl는 필수적이다. Starvation중 NaCl에 의한

Scd1, *Idi1*유전자의 발현양상의 변화를 관찰하였다. NaCl 공급에 의한 발현차이를 ♀/♂구별하여 관찰하였다. 유전자 *Scd1*의 발현은 ♂의 경우 NaCl 공급으로 cerebellum, thymus, muscle, lung 에서는 발현이 유지되었으며, liver에서는 NaCl공급과 관계없이 하강발현을 보였다. ♀의 경우는 NaCl 공급에 의해서 유의할만한 *Scd1*의 발현변화를 보이지 않았다. 유전자 *Idi1*의 발현은 ♀/♂에서 동일하게 NaCl공급에 따른 특이적인 발현변화가 관찰되지 않았다(Fig. 4).

고 찰

일반적으로 modern diet (restricting caloric intake)는 oxidative stress, genome integrity, endocrine signaling이 관여하여서 급격한 aging을 피할 수 있고 life span을 연장할 수 있다는 많은 증거가 제시되고 있다[6, 7]. 비록 어떤 종류의 대사결함은 식사량을 제한(특히, 높은 수준의 phenylalanine)하는 적절한 dietary modification에 의해서 향상될 수도 있지

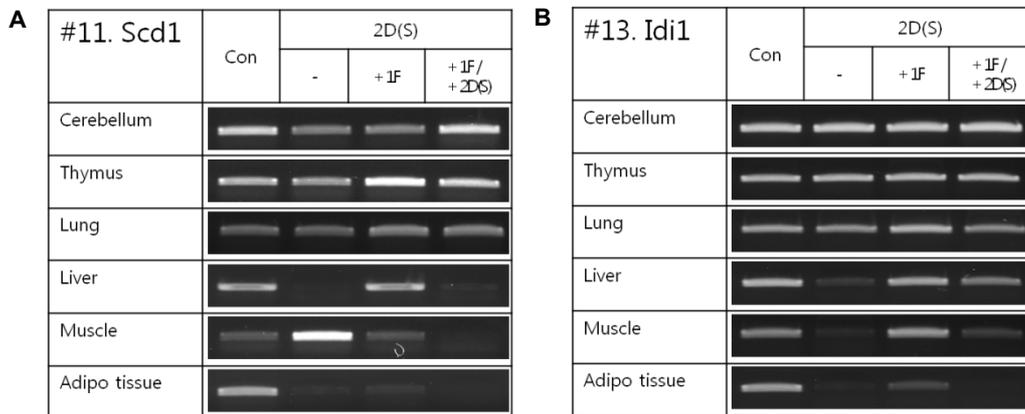


Fig. 3. Intermittent starvation changes *Scd1/Idi1* mRNA expression in the various rat organs. 2D; 2 day starvation, 2D+1F; 2 day starvation+1 day feed, 2D+1F+2D; 2 day starvation+1 day feed+2 day starvation). The experiments were performed three times and represent resulting above fig is one of them.

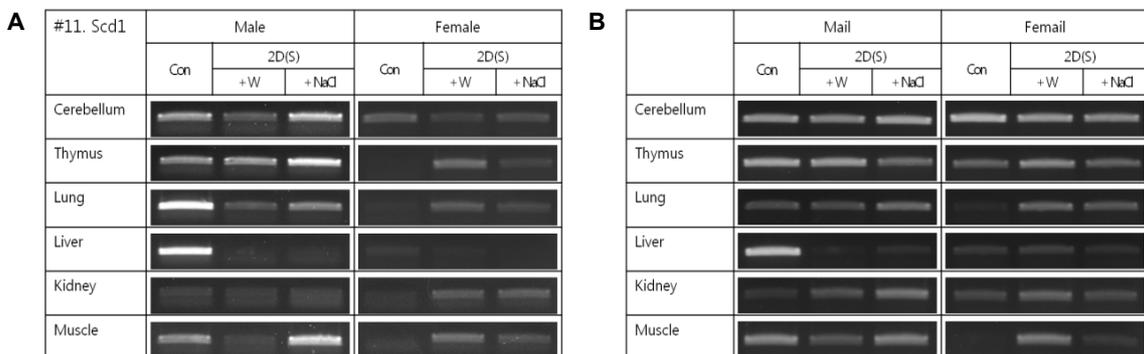


Fig. 4. The effect of NaCl on the starvation in male and female. Starvation with water only (+W) or water including 1% +NaCl (+NaCl) changes *Scd1/Idi1* mRNA expression in various rat organs of the male and female. The experiments were performed three times and represent resulting above fig is one of them.

만, 근본적으로 starvation을 바탕으로 하는 modern diet는 질병은 아닌 원하지 않는 대사불균형을 초래하는 경우가 많다. 이런 상태가 지속적으로 반복적으로 일어나면 malnutrition상태가 되어 obesity와 cardiovascular diseases가 될 수 있다. Malnutrition의 정의는 에너지, 단백질, 타 영양분이 몸의 기능과 의학적인 문제를 일으킬 수 있을 정도로 과다하거나 부족한 경우를 말한다. Malnutrition은 overnutrition 결과 obesity가 되는 것과 undernutrition 결과 marasmus와 Kwashiorkor-like malnutrition으로 구별한다[11]. BMI [body mass index, weight(kg)/body height²(m²)] 1.85이하는 severely underweight, 20이하는 underweight, 20~25는 건강한 상태, 25~30은 overweight, 30~35는 obesity I, 35~40은 obesity II, 40이상은 obesity III군으로 분류한다. 일반적으로 short starvation은 ≤72시간이며 long starvation은 ≥72시간을 의미한다. Short starvation동안에는 먼저 근육이 분해되어 liver의 gluconeogenesis에 의해서 만들어진 glucose가 brain에 사용되며 glycogen분해에 의해서 생성된 glucose와 fat분해에 의해서 생성된 FA와 glycerol이 말단에 전달된다[12]. Long starvation 동안에는 short starvation동안과 같이 근육이 분해되어 liver의 gluconeogenesis에 사용되며 liver에서 ketogenesis가 일어나 생성된 glucose와 ketone body가 brain에 전달되며 더욱 많은 양의 fat이 분해되어서 말단과 liver에 FA와 glycerol형태로 전달된다. 몸은 short- & long-term starvation에 탄수화물, 단백질, 지질을 전환시켜서 adaption한다. 더욱 효율적인 적응법은 에너지 사용을 최소화하여 탄수화물, 단백질, 지질을 전환을 감소시키는 것이다. Dietary modification이 어떤 분자기전이 작동하여 aging을 억제하고 질병을 촉진시키는지를 규명할 수 있는 실마리를 제공하는 것이다.

Starvation에 의해서 *Poldip3*를 제외한 9개의 유전자는 liver에서 약하게 발현하였다. 이 결과는 starvation에 의한 유전자 발현변화는 대부분 liver 대사변화와 관련된 것으로 볼 수 있다. *Scd1*은 starvation에 의해서 24시간에서만 발현이 하강하였고 *Idi1*은 4시간 starvation이후 발현이 하강하였다. 그래서 *Scd1*을 starvation에 의해서 장기적으로, *Idi1*을 starvation에 의해서 단기적으로 하강 발현하는 유전자의 예로서 이후의 실험을 하였다. 각각의 ♀/♂ rat를 물을 공급하는 것 물을 공급하지 않는 군으로 나누어 2일간 starvation한 결과는 물 공급에 의한 ♀/♂동일하게 apoptosis, autophagy, ERQC 유도와는 직접적인 상관성은 떨어지는 것으로 보인다. 그러나, *Scd1*유전자발현은 ♀/♂ 동일하게 starvation과 물 공급 제한에 의해서 발현이 하강하는 경향이지만 ♀의 경우가 ♂에 비하여 물 공급에 영향을 덜 받는 것으로 생각된다. 특히, 물 공급 제한은 *Idi1*유전자발현에 영향을 전혀 미치지 않았다. Starvation에 의해서 유전자 *Scd1*의 발현은 cerebellum, thymus, lung, heart, muscle에서 하강하였고, 유전자 *Idi1*의 발현

은 cerebellum, thymus, lung, heart에서 starvation에 의해서 하강 발현하였다. 이 결과는 starvation에 의한 유전자발현조절이 liver에 국한된 것이라기보다는 개체의 항상성유지에 관련 많은 pathway가 관련되어있는 것으로 판단된다. 간헐 starvation에 의한 *Scd1*, *Idi1*유전자의 발현양상을 관찰하였다. 2일간 starvation 군과 2일간 starvation후 1일간 먹이를 공급한 것과 2일간 starvation+1일간 먹이를 공급+2일간 starvation한 군으로 나누었다. 유전자 *Scd1*의 발현은 cerebellum, thymus에 국한하여 강한 발현변화를 보였다. 이 결과로 장기간의 간헐 starvation은 glucose소비가 많은 brain과 면역기능 조절에 중요한 thymus의 정상기능에 영향을 미칠 수 있는 것으로 보인다. 유전자 *Idi1*의 발현은 간헐 starvation에 크게 연관된 발현형태를 보이지는 않았다. 유전자 *Scd1*의 경우는 ♀보다가 ♂이 민감한 반응을 보이는 것으로 보아 ♀/♂의 성 특이적인 대사에 starvation과 NaCl이 밀접한 관계가 있는 것으로 보인다. 유전자 *Idi1*의 발현은 ♀/♂에서 특이적인 발현변화가 관찰되지 않았다. Starvation시 물 공급도 중요하지만 개체의 항상성유지에 NaCl 공급이 중요한 결과를 얻었다.

References

- Attie, A. D., Flowers, M. T., Flowers, J. B., Groen, A. K., Kuipers, F. and Ntambi, J. M. 2007. Stearoyl-CoA desaturase deficiency, hypercholesterolemia, cholestasis, and diabetes. *Nutr Rev* **65**, S35-38.
- Berthelot, K., Estevez, Y., Deffieux, A. and Peruch, F. 2012. Isopentenyl diphosphate isomerase: A checkpoint to isoprenoid biosynthesis. *Biochimie* **94**, 1621-1634.
- Flowers, M. T. and Ntambi, J. M. 2008. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol* **19**, 248-256.
- Lauressegues, E., Bert, E., Duriez, P., Hum, D., Majd, Z., Staels, B. and Cussac, D. 2012. Does endoplasmic reticulum stress participate in APD-induced hepatic metabolic dysregulation? *Neuropharmacology* **62**, 784-796.
- MacDonald, A., Rocha, J. C., van Rijn, M. and Feillet, F. 2011. Nutrition in phenylketonuria. *Mol Genet Metab* **104**, S10-18.
- Masoro, E. J. 2000. Caloric restriction and aging: an update. *Exp Gerontol* **35**, 299-305.
- Masoro, E. J. 2005. Overview of caloric restriction and aging. *Mech Ageing Dev* **126**, 913-922.
- Ntambi, J. M., Miyazaki, M. and Dobrzyn, A. 2004. Regulation of stearoyl-CoA desaturase expression. *Lipids* **39**, 1061-1065.
- Okada, K., Kasahara, H., Yamaguchi, S., Kawaide, H., Kamiya, Y., Nojiri, H. and Yamane, H. 2008. Genetic evidence for the role of isopentenyl diphosphate isomerases in the mevalonate pathway and plant development in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **49**, 604-616.

10. Park, J., Kwon, Y. -S., Lee, E. and Kwon, K. 2014. Expression analysis of two genes (*Gat1* and *Mat1*) up-regulated by starvation stress. *J Life Sci* **24**, 686-693.
11. Pond, W. G., Ellis, K. J. and Schoknecht, P. 1992. Response of blood serum constituents to production of and recovery from a kwashiorkor-like syndrome in the young pig. *Prac Soc Exp Biol Med* **200**, 555-561.
12. Schutz, Y. 2011. Protein turnover, ureagenesis and gluconeogenesis. *Int J Vitam Nutr Res* **81**, 101-107.
13. Steinberg, S. J., Raymond, G. V., Braverman, N. E., Moser, A. B. and Moster, H. W. 2006. Peroxisome Biogenesis Disorders, Zellweger Syndrome Spectrum. GeneReviews. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=pbd>.
14. Zheng, W. 1., Sun, F., Bartlam, M., Li, X., Li, R. and Rao, Z. 2007. The crystal structure of human iso pentenyl diphosphate isomerase at 1.7 Å resolution reveals its catalytic mechanism in isoprenoid biosynthesis. *J Mol Biol* **366**, 1447-1458.

초록 : 영양고갈-스트레스에 의해서 하강발현하는 유전자(*Scd1*과 *Idi1*)의 분석

조준호¹ · 권영숙² · 김동일³ · 김복조⁴ · 권기상^{4*}

(¹인제대학교 해운대백병원 응급의학과, ²중부대학교 간호학과, ³경운대학교 보건바이오학과, ⁴경운대학교 임상병리학과)

Starvation에 의해서 down-regulation 되는 유전자 10개를 얻었다(*Comt*, *RGN*, *Scd1*, *Temt*, *Idi1*, *Fabp5*, *Car3*, *Cyp2c70*, *Pinx1*, *Poldip3*). 이들은 starvation에 의한 대사변화의 대부분은 liver와 관련된 것으로 볼 수 있다. Starvation중에 물 공급은 암수 동일하게 apoptosis, autophagy, endoplasmic reticulum quality control (ERQC)유도에 영향을 미치지 않았다. 이 같이 starvation에 의해서 down-regulation되는 유전자발현조절이 liver에 국한된 것이라기보다는 개체의 항상성유지에 관련 많은 pathway가 관련되어있는 것으로 판단된다. 장기간의 간헐 starvation은 glucose소비가 많은 brain과 면역기능조절에 중요한 thymus의 정상기능에 영향을 미칠 수 있는 것으로 보인다. 유전자 *Scd1*의 경우는 우보다가 ♂이 민감한 반응을 보이는 것으로 보아 우/♂의 성 특이적인 대사에 starvation과 NaCl이 밀접한 관계가 있는 것으로 보인다. Starvation시 물 공급도 중요하지만 개체의 항상성유지에 NaCl공급이 중요하다는 결과를 얻었다.