

박 사 학 위 논 문

당뇨병 모델쥐에서 **Aquaporin** 유전자
발현에 미치는 **Rosiglitazone**의 영향에
관한 연구



제 주 대 학 교 대 학 원

생 명 과 학 과

오 유 성

2004년 12월

당뇨병 모델쥐에서 **Aquaporin** 유전자
발현에 미치는 **Rosiglitazone**의 영향에
관한 연구

지도교수 오 문 유

오 유 성

이 논문을 이학박사학위 논문으로 제출함

2004년 12월

오유성의 이학박사학위 논문을 인준함.



심사위원장 _____

위 원 _____

위 원 _____

위 원 _____

위 원 _____

제주대학교 대학원

2004년 12월

The Effect of Rosiglitazone on Aquaporin Gene Expression in Diabetes Model (OLETF) Rats

You Sung Oh

(Supervised by Professor Moon You Oh)

**A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for
the Degree of**

DOCTOR OF PHILOSOPHY



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Date Approved

**Department of Life Science
Graduate School, Cheju National University
December, 2004**

ABSTRACT

The effect of rosiglitazone on aquaporin (AQP) gene expression was investigated in animal model, Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. To clarify any significant effect of the regulation of aquaporins on metabolic syndrome, AQP9 protein expression was evaluated by immunoblot analysis in the human hepatoblastoma cell lines (HepG 2) which were separately pretreated with insulin, rosiglitazone, wy14643, oleic acid, eicosapentanoic acid, and metformin. The OLETF rats dieted with rosiglitazone got more body weight than the control rats. Moreover, they were significant to manifest the symptom of hyperinsulinemia unlike the control Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) rats. To evaluate the role of aquaglyceroporins (AQP3, AQP7 and AQP9) and glycerol kinase (GyK) the expression of three kinds of the aquaglyceroporins and GyK genes were analyzed using RT-PCR in several kinds of tissues- liver, mesenteric and epididymal fats, and kidney (cortex, outer medullar and inner medullar)— of the LETO, OLETF and rosiglitazone-treated OLETF rats. In the liver, the expression levels of AQP9 and GyK were not significantly increased in the rosiglitazone-treated OLETF rats. In the kidney, the expression levels of AQP7 and GyK were not significantly different in the LETO, OLETF and rosiglitazone-treated OLETF rats.

These results indicate that rosiglitazone may play an important role in the glycerol metabolism pathway by regulation of the gene expression of aquaglyceroporins and glycerol kinase in the adipose tissues. Rosiglitazone

treatment also increased the expression level of AQP3 gene in the kidney to some extent. This result suggest that AQP3 may contribute to retention of the body fluid in the kidney.

Key words : aquaporin (AQP2), aquaglyceroporin (AQP3, AQP7, AQP9), glycerol kinase (GyK), rosiglitazone, LETO (Long-Evans Tokushima Otsuka), Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF)



목 차

영문초록	i
목 차	iii
표 목 차	v
그림목차	vi
I. 서 론	1
1. 연구배경	
2. 연구목적	
II. 재료 및 방법	7
1. <i>In Vitro</i> 실험	
1-1. 세포 배양	
1-2. 배양세포에서의 단백질 분리 및 정량	
1-3. Immunoblotting	
2. 동물 실험	
2-1. 혈장분석	
2-2. 조직에서의 단백질 분리 및 정량	
2-3. Immunoblotting을 이용한 AQP 단백질 확인	
2-4. Total RAN 분리 및 RT-PCR	



III. 결 과	14
1. HepG2 세포에서 AQP9단백질 발현에 미치는 여러 약제의 영향	
2. OLETF 쥐에서 rosiglitazone의 효과	
2-1. Aquaglyceroporins mRNA 발현에 미치는 rosiglitazone의 영향	
2-2. 신장에서 AQP2와 AQP3 발현에 미치는 rosiglitazone의 영향	
2-3. 신장에서 GyK와 AQP7 mRNA 발현에 미치는 rosiglitazone 의 영향	
IV. 고 찰	49
V. 참고문헌	55
요 약	



표 목차

Table 1. Primer sets used for RT-PCR analysis in Long Evans Tokushima Otsuka (LETO) rats and Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats	13
Table 2. The effect of rosiglitazone on body weights, glucose, free fatty acid, and insulin levels of the plasma in rats	24
Table 3. Summary of rosiglitazone effects on the expression of AQPs and GyK in ROSI-OLETF	48



그림 목차

Figure 1. Protein expression of AQP9 in HepG2 cells treated with insulin	16
Figure 2. Protein expression of AQP9 in HepG2 cells treated with glycerol	17
Figure 3. Protein expression of AQP9 in HepG2 cells treated with rosiglitazone	18
Figure 4. Protein expression of AQP9 in HepG2 cells treated with wy14643	19
Figure 5. Protein expression of AQP9 in HepG2 cells treated with oleic acid	20
Figure 6. Protein expression of AQP9 in HepG2 cells treated with eicosapentanoic acid	21
Figure 7. Protein expression of AQP9 in HepG2 cells treated with metformin	22
Figure 8. AQP9 mRNA expression levels in the liver tissue	27

Figure 9. AQP3 mRNA expression levels in the liver tissue	28
Figure 10. GyK mRNA expression levels in the liver tissue	29
Figure 11. AQP7 mRNA expression levels in the mesenteric fat tissue ·	30
Figure 12. AQP3 mRNA expression levels in the mesenteric fat tissue ·	31
Figure 13. GyK mRNA expression levels in the mesenteric fat tissue ···	32
Figure 14. AQP7 mRNA expression levels in the epididymal fat tissue	33
Figure 15. AQP3 mRNA expression levels in the epididymal fat tissue	34
Figure 16. GyK mRNA expression levels in the epididymal fat tissue ··	35
Figure 17. The effect of rosiglitazone in the kidney tissue (AQP3 protein)	38
Figure 18. The effect of rosiglitazone in the renal cortex membrane fraction (AQP3 protein)	39
Figure 19. The effects of rosiglitazone in renal outer medullar membrane fraction (AQP3 protein)	40

Figure 20. The effect of rosiglitazone in the renal outer medullar membrane fraction (AQP2 protein)	41
Figure 21. GyK mRNA expression levels in the renal cortex tissue	42
Figure 22. AQP7 mRNA expression levels in the renal cortex tissue	43
Figure 23. GyK mRNA expression levels in the renal outer medullar tissue	44
Figure 24. AQP7 mRNA expression levels in the renal outer medullar tissue	45
Figure 25. GyK mRNA expression levels in the renal inner medullar tissue	46
Figure 26. AQP7 mRNA expression levels in the renal inner medullar tissue	47



I. 서 론

1. 연구 배경

생명체를 구성하는 세포는 막으로 둘러싸여 있으며 세포막은 지질이중층 구조를 갖는다. 세포막은 세포 내외에서 물을 포함한 물질의 이동에 관여하며 생명체의 생명활동을 유지하는 데 중요한 역할을 한다 (Matsuzaki *et al.*, 2002).

Aquaporin (AQP)은 세포막에 존재하면서 물 투과에 관여하는 단백질이다. 물 채널로 알려진 AQP은 사람의 적혈구 세포막에서 발견되었으며, 골수 세포로부터 cDNA library를 만들어 그 유전자와 단백질의 구조를 밝혔으며, 28kDa의 세포막 내재단백질, AQP1이라 명명했다. 현재까지 AQP0에서 AQP10 까지 11개의 AQP이 다양한 세포 또는 조직에서 발견되었다 (Agre and Kozono 2003). 그리고 AQP의 기본 구조는 약 340여개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 6개의 α -helix 구조를 갖는 부분은 이중막에 내재하며, 3개의 아미노산 {asparagine-proline-alanine (NPA)}으로 구성된 두 부분이 막 내외의 환경에 의해 수송이 이루어질 때 pore를 이루어 AQP이 물 또는 물질을 수송하는 기능을 수행하도록 한다 (Nielsen *et al.*, 2002). AQP은 물 뿐만 아니라 글리세롤, 요소 등의 물질 수송에도 관여하는 데, 이 그룹을 Aquaglyceroporin이라 불리며, AQP3, AQP7, AQP9, AQP10가 여기에 속한다 (Agre *et al.*, 1993).

포유동물의 신장은 몸 전체 체액의 균형을 유지시키는 기능을 한다. 신장에는 AQP1, -2, -3, -4, -6, -7, -8, 7개의 AQP이 존재한다고 알려져 있다 (Nielsen *et al.*, 2002). AQP2는 신장에서 바소프레신 (vasopressin) 의존적으로

발현되는데, AQP2의 과발현 (over-expression)은 체액의 보유 (fluid retention) 와 관련이 있으며, 울혈성 심부전증 (congestive heart failure), 간경변증 (cirrhosis) 또는 임신성 부종 (pregnancy)과 관계가 깊다. Deen 등 (1994)은 AQP2 유전자의 결함이 nephrogenic diabetes insipidus (NDI)라고 불리는 유전병과 관계가 있음을 처음으로 밝혔다. 또한 AQP2 단백질의 126 번째 아미노산인 트레오닌 (Thr)이 메치오닌 (Met)으로 치환된 돌연변이는 상염색체성 열성유전을 하며 심각한 다뇨증 (polyuria)을 유발한다는 보고도 있다 (Yang *et al.*, 2001). AQP3은 상피조직에 넓게 분포 되어 있다. 특히 비뇨기관, 소화기관, 호흡기관 그리고 피부의 표피 부분에서 수분 손실의 가능성이 있는 환경에서 물의 항상성을 유지시키는 중요한 기능을 한다 (Matsuzaki *et al.*, 2002). 신장에서 AQP3은 피질과 외질 부위에 주로 존재하며 집합관 (collecting duct) 주세포, 기저외측의 세포막 (basolateral cell membrane)에서 수분의 출구로 항이뇨작용을 수행한다 (Strange and Spring, 1987). 생쥐에서 밝혀진 바에 의하면 AQP4 유전자의 결함이 오줌의 농축에 결함을 초래한다 (Ma *et al.*, 2000). 그리고 AQP6은 집합관의 삼입세포에서 세포사이의 액포에 H⁺-ATPase와 함께 존재하며, 음이온 (anion)에 의해 투과되고 HgCl₂와 낮은 수소이온 농도 (pH)에 의해 활성화 된다 (Yasui *et al.*, 1999). AQP5은 침샘과 눈물샘에 분포되어 있으며, 최근에는 자가면역질환 (autoimmune disease)의 일종인 쇼그렌 증후군 (Sjogren's syndrome)환자에서 AQP5의 단백질 발현에 결함이 발견되었다 (Tsubota *et al.*, 2001). AQP7은 지방세포, 심장, 신장, 소장 등에서 발현된다 (Kuriyama *et al.*, 1997). 특히 지방세포에서 중성지방 분해산물로 생성되는 글리세롤을 세포 밖으로 보내는 데 관여한다. AQP7에 의해 방출된 글리세롤은 간세포에 존재하는 AQP9을 통해 받아들여 간에서 당 신생 (gluconeogenesis)을 위한 기질로 사용된다 (Kishida *et al.*, 2000). AQP9은 간 뿐만 아니라 백혈구, 폐, 비장, 그리고 골수에서도 발현된다 (Tsukaguchi *et al.*, 1988). AQP7과 AQP9는 음식

후에 각각 지방조직과 간에서 발현이 증가하며 인슐린에 의해 발현이 억제된다 (Kuriyama *et al.*, 2002). 지방세포에서 중성지방이 hormone-sensitive lipase (HSL)에 의해 유리지방산과 글리세롤로 분해되어 혈중으로 유리되면 간 또는 신장에서 glycerol kinase (GyK)에 의해 당 신생의 중요한 기질로 사용된다 (Klein *et al.*, 1990). 그러나 지방세포에서는 글리세롤을 인산화시키는 GyK의 활성이 거의 없기 때문에 글리세롤이 다시 인산화되어 이용되지 못하고 거의 세포 밖으로 유리된다 (Baba *et al.*, 1995). 또한 대사증후군 모델에서는 고인슐린혈증 (hyperinsulinemia)에도 불구하고 간에서 AQP9와 지방에서 AQP7의 발현이 증가한다고 보고 하였다 (Kuriyama *et al.*, 2002).

이상에서 설명한 AQP들은 각각 다른 기관 또는 조직에서 생리적인 역할과 중요성이 입증되고 있으며, 특히 간과 지방세포에서 글리세롤 대사에 관여하여 체내 포도당 농도의 항상성 조절에 영향을 준다고 보고하였다 (Landon and Masato, 2002).

체내 포도당의 80~90%는 골격근에서 이용된다 (DeFronzo *et al.*, 1985). 골격근에서 포도당 이용의 감소는 세포 내로의 포도당 운반과정 (glucose transport), 포도당의 인산화과정, 당원으로의 합성단계 (glycogen synthesis) 등 여러 단계의 장애에 기인할 수 있는데, 이 중 당원 합성과정이 인슐린 저항성 상태에서 양적으로 가장 뚜렷하게 감소 된다 (Wright, 1998). 한편 골격근에서의 포도당 운반과정, 당원 합성과정 등이 insulin receptor substrate-1 (IRS-1) 인산화와 phosphatidyl inositol-3 kinase (PI3K)와 같은 세포내 인슐린 신호전달 체계의 조절을 받고 이들 신호 전달체계의 활성이 비만 및 제 2형 당뇨병 환자의 골격근에서 감소 되어있음이 밝혀졌다 (Kim *et al.*, 1999).

Randle 등 (1963)은 근육 내 지방산 산화가 증가되면 포도당 산화가 감소된다고 하였고, 혈중 유리지방산 농도의 증가에 따라 근육 내 지방산 산화가 증가되는 것이 인슐린 저항성의 원인이라고 제안하였다. 이 가설에 의하면 지방산 산화가 증가됨으로서 미토콘드리아의 acetyl-CoA/CoA 비를 증가시켜서

피루브산 탈수소효소 (pyruvate dehydrogenase)의 활성이 억제되어 포도당 산화를 억제하고, 세포 내에 증가된 citrate는 phosphofructokinase를 억제하여 포도당-6-인산이 축적되어, 결과적으로 포도당의 세포 내 유입을 억제한다는 것이다. 이 가설은 지방을 직접 정맥에 투여하는 실험 또는 고지방 식이를 통한 실험들에서 입증 되었다 (Kim *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1988). 그리고 미토콘드리아는 세포내에서 산소를 이용해서 에너지를 생성하는 소기관으로서 지방산 산화의 대부분이 여기서 일어난다. 당뇨병 환자의 백혈구 미토콘드리아 양은 감소되어 있으며, 이와 같은 현상은 당뇨병 발생에 선행한다고 알려져 있다 (Lee *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2003). 이후 인슐린 저항성과 미토콘드리아 기능 이상의 관계에 대한 연구들이 보고 되었는데 Petersen 등 (2003)은 미토콘드리아의 산화적 인산화 (oxidative phosphorylation) 기능이 인슐린 저항성을 보이는 노인들에서 40% 정도 저하 되어 있음을 보고 하였고, 당뇨병환자의 직계 가족에서 미토콘드리아 기능이 감소되어 있음을 보고 하였다 (Petersen *et al.*, 2004). 그리고 미토콘드리아에서 지방산 산화를 조절하는 인자들로는 Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α , δ , γ (PPAR α , PPAR δ , PPAR γ) coactivator-1 (PGC-1) 및 AMP-activated protein kinase (AMPK) 등이 있다. 이 중 잘 알려져 있는 PPAR α 는 핵 수용체의 하나로서 지방산 수송단백질 및 long-chain acyl-CoA synthase 발현을 유도하여 미토콘드리아 내로 지방산 흡수를 증가시키고 acetyl-CoA oxidase 발현을 증가시켜 지방산 산화를 증가시킨다 (Ferre, 2004).

현재, Thiazolidinedione (TZD)은 인슐린 저항성을 개선 시키는 제2형 당뇨병의 새로운 치료제로 사용되고 있다. TZD는 지방세포와 골격근 내 인슐린 저항성을 개선하는 효과가 있으며 포도당 수송을 증가시켜 혈당강하 작용이 나타난다고 알려져 있다. TZD의 작용기전은 분명하지는 않지만 주로 지방세포에 풍부한 PPAR γ 리간드가 핵 수용체와 결합하여 GLUT4 (glucose transport 4) 포도당 수송체의 합성을 증가시키고 지방세포의 분화를 활성화

함으로써 인슐린 저항성을 개선시킨다고 알려져 있다 (Fonseca *et al.*, 2000). 그리고 PPAR α 는 간에서 미토콘드리아내의 β 산화 과정과 케톤 생성 과정을 증가시키고, 지방산 생성을 감소시키며, 초저밀도 지단백콜레스테롤 생산을 감소시킨다 (Gulick *et al.*, 1994; Maragoudakis *et al.*, 1971; Lamb, 1993). TZD이 혈당강하 효과와 함께 이상지질혈증, 혈액응고능 이상 등에도 효과를 보이는 기전은 인슐린 저항성 개선에 따른 것으로 해석할 수 있다 (Kim *et al.*, 2003). TZD가 개발되기 전에는 biguanide계 약물인 metformin이 인슐린 저항성을 개선시킨다고 알려져 있는데, metformin은 간에서 당 신생을 감소시키고 말초조직에서 당 흡수를 증가시켜 간접적으로 혈당조절 및 인슐린 저항성을 개선한다 (Zhou *et al.*, 2001).

본 실험에 사용한 OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) 쥐는 제2형 당뇨병 또는 비만의 동물모델로 널리 쓰이고 있다. OLETF 쥐는 생후 18주 이후에 고혈당이 발생하고 당뇨병이 발생하면 만성적으로 진행되며, 비만을 동반하고 췌장 β 세포에 염증소견을 보인다. 또한 OLETF 쥐는 비만을 동반하는 제2형 당뇨병의 좋은 모델로서 고인슐린혈증, 고혈당증, 인슐린 저항성을 나타내고 복부지방이 증가하는 특징이 있다. 그리고 OLETF 쥐에서 당뇨병을 유발하는 유전자는 X-염색체와 관련이 있으며 이 유전자를 ODB-1이라 명명하였다 (Hirashima *et al.*, 1995). 또한 당뇨병을 유발하는 유전자 ODB-2는 14번 염색체에 위치하며, 혈당을 높이는 작용을 한다. 따라서 ODB-1 과 ODB-2 모두 당뇨병을 유발하는데 필수적인 유전자로 알려져 있다 (Hirashima *et al.*, 1996).

2. 연구 목적

세계적으로 비만인구가 급격히 증가하면서 많은 건강문제를 낳고 있다. 비만한 사람들은 당뇨병, 고혈압, 이상지질혈증 (dyslipidemia)에 걸릴 위험이 높은 것으로 알려지고 있다 (WHO 2000). Reaven (1988)이 인슐린 저항성 증후군 (X증후군)을 소개하면서 인슐린 저항성 (insulin resistance)이 알려졌다. 최근에는 고혈압 환자에서도 당질 및 지질대사의 장애와 함께 인슐린 저항성이 있음이 입증되었다 (DeFronzo *et al.*, 1991; Saltiel *et al.*, 1996). 인슐린 저항성에 따른 고인슐린 혈증 (hyperinsulinemia), 내당능 장애 (Impaired glucose tolerance: IGT)와 제2형 당뇨병, 이상지질혈증, 고혈압 등 일련의 질환은 모두 죽상경화증 (atherosclerosis)의 위험인자라는 관점에서 상호 연관성이 있는 질환군이라는 대사증후군 (metabolic syndrome)의 개념이 보편화되고 있다 (DeFronzo *et al.*, 1991). 최근 우리나라에서도 대사증후군이 사회적 관심사로 떠오르고 있다. 비만과 이에 동반된 인슐린 저항성이 대사증후군을 발생시키는 중요한 부분을 차지하고 있기 때문이다. 그리고 제2형 당뇨병은 인슐린 저항성과 췌장 β 세포의 인슐린 분비 장애에 의한 것으로 알려져 있다 (DeFronzo *et al.*, 1997). 제2형 당뇨병은 지방조직에 의한 비만이 중요한 요소이고 정상적인 인슐린 표적세포에서 신호 전달 과정 중, 지방조직에서 분비되는 다양한 물질에 의해 그 신호전달 과정이 억제 된다는 점에서 인슐린 저항성과의 관계 규명이 필요하다. 그리고 대사증후군에서 AQP7과 AQP9 발현에 이상조절 현상이 일어나는 이유가 아직 밝혀진 바 없으며, 대사증후군과 관련하여 AQP 발현에 관한 연구도 이루어지지 않았다.

현재 다양한 세포와 조직에서 AQP이 여러 질병과 관련된 많은 연구결과가 보고 되고 있지만 아직 미흡한 상태이다. 본 연구는 대사증후군 및 제2형 당뇨병 모델인 OLETF 쥐에서 rosiglitazone의 치료 효과와 관련하여 AQP유전자의 발현 양상을 분석함으로써 질병과 AQP의 관련성에 대한 기초 자료를 제공하고자 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. *In vitro* 실험

1-1. 세포배양

HepG2 세포 (human hepatoblastonema cell line)는 한국 세포주 은행으로부터 제공 받아 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 10% fetal bovine serum (FBS)이 포함된 low-glucose (1.0g/L) Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) 배지에서 5% CO₂ 와 37°C 조건에서 배양하였다. 세포는 2일 마다 새로운 배지로 갈아주고, T-75 flask에 세포가 70-80% 차지할 때까지 배양하고 2일 동안 6 well plate에 계대 배양을 한 후 혈청을 제거한 배지에서 16시간 배양 시킨 후 다음 약제를 다양한 농도로 24시간 처리하였다. Insulin 0, 10, 100, 1000 nM/ml; glycerol 0, 100, 200, 500, 1000 µM/ml rosiglitazone 0, 10, 50, 100 µM/ml ; wy14643 0, 10, 50, 100 µM/ml; oleic acid 0, 250, 500 ,750 µM/ml; eicosapentaenoic acid 0, 25, 50, 75, 100 µM/ml; metform 0, 1, 1.5, 2 mM/ml.

1-2. 배양 세포에서의 단백질 분리 및 정량

배양된 세포는 차가운 용해 완충액 (lysis buffer)-(50 mM Tris-HCl, 1% nonidet P-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM aprotinin, 1 mM leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM NaF, 1 mM pepstain A)에서 파쇄한 후 4°C, 15,000 x

g에서 15분 동안 원심분리한 후 상정액을 얻어 BCA protein assay reagent kit (Pierce Chemical, USA)를 이용하여 단백질을 정량하였다. 단백질과 동량의 SDS sample buffer에 2-mercaptoethanol을 2% 첨가하여 90°C에서 5분 간 단백질을 변성시켰다.

1-3. Immunoblotting

40 µg의 단백질을 4-20% gradient gel (TEFCO, Japan)에서 80 mA로 1.5 시간 동안 전기영동 한 후 PVDF membrane에 gel을 25 mA로 2시간 동안 electrotransfer 시켰다. 단백질이 전이된 membrane을 blocking buffer [5% nonfat dry milk을 함유한 Tris-buffered saline (TBS)-0.1% Tween-20 (TBS-T)]를 사용하여 1시간 동안 실온에서 blocking 시켰다. 일차 항체 AQP9 (Alpha Diagnostic International, USA)을 1:1000 의 비율로 희석하여 4°C에서 overnight 반응시켰다. 그 후 biotinylated anti-rabbit IgG (Vector) 2 차 항체를 1:2,000 에서 1:5,000 비율로 희석하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 membrane을 TBS-T buffer로 15분씩 2번, 5분씩 2번 세척하였다. PVDF membrane에 전이된 AQP9 단백질은 chemiluminescence detection system (ECL Plus; Biosciences)을 사용하여 암실에서 X-ray film에 노출시켜 확인 하였다. 확인된 단백질은 Image analysis program (TINA 2.0)을 이용하여 분석하였다.

2. 동물실험

동물실험에 사용된 Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) 쥐

수컷 12마리와 Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) 수컷 6 마리는 일본 Otsuka 제약회사로부터 제공받았다. 실험동물은 항온 (22±2℃), 항습 (50%) 시설이 갖추어진 사육장에서 명암주기 (각각 12시간, 아침8시부터 저녁 8시까지 조명)를 맞추어 물과 사료를 자유롭게 먹도록 하여 사육하였다. 매주 혈당을 측정하여 정상 대조군인 LETO 쥐에 비하여 혈당이 유의하게 차이가 나기 시작한 22주부터 실험군 (OLETF 쥐)에게 rosiglitazone을 투여하였다. Rosiglitazone은 0.01% 비율로 사료에 혼합하여 pellet을 만들어 24주 까지 총 2주 간 식이하였다. 실험 종료된 실험동물은 12시간 금식시킨 후 희생시키기 전에 체중과 혈당을 측정하였다. 실험동물을 희생시킨 후 바로 혈액을 저온 유지된 EDTA 채혈튜브에 취하여 얼음에 방치시킨 후 4℃에서 3,000 x g로 15분 동안 원심분리한 후 혈장을 분리하여 분석 할 때까지 -80℃ 냉동고에 보관하였다. 그리고 간, 신장, 장간막 지방, 고환 주위의 지방을 취하여 액체 질소에 급냉 시킨 후 분석 할 때까지 -80℃ 냉동고에 보관하였다.



2-1. 혈장분석

혈당은 혈액채취 직후 간이 혈당측정기(Accutrend Sensor, Roche Diagnostic, USA)에 소량의 전혈 (약 5 µg 정도)을 떨어뜨려 확인한 후 효소법을 이용하여 혈청 포도당 농도를 측정 (Glucose analyzer 2, BECKMAN, CA, USA)하였고, 인슐린 농도는 RIA 방법 (Rat insulin RIA kit, Linco Research Inc., USA)을 이용하였다. 그리고 유리지방산 농도는 ACS-ACOD 효소법 (NEFA ZYME-S, Aeken, Japan)으로 측정하였다. Rosiglitazone은 Glaxo Smith Kline Pharmaceuticals (USA)로부터 구입하였다.

2-2. 조직에서의 단백질 분리 및 정량

냉동된 신장을 먼저 정확히 반으로 자른 후 피질, 외질, 수질 부분을 분리하였다. 각각의 조직을 lysis buffer [250 mM sucrose (Sigma), 10 mM triethanolamine (Sigma), 1 g/ml leupeptin (Bachem, USA) and 0.1 mg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma-Aldrich) pH 7.6]에 넣은 후 polytron homogenizer를 이용하여 균질화 시키고 1,000 x *g*에서 15 분간 원심분리 후 상정액을 얻어 200,000 x *g*에서 1시간 동안 초원심분리하여 상정액을 버리고 각각의 membrane fraction (pellet)을 얻었다. 막 성분이 들어있는 pellet에 lysis buffer 1 ml을 넣어 혼탁화한 후 단백질을 얻었다. 단백질은 BCA protein assay reagent kit (Pierce Chemical, USA)를 이용하여 정량하였고, 단백질과 동량의 SDS sample buffer에 2-mercaptoethanol을 2% 첨가하여 90°C 에서 5분 간 단백질을 변성시켰다. 그리고 나머지 한 쪽의 신장조직에서는 피질, 외질, 수질의 각 부분을 균등한 비율로 자른 후, 각 조직 조각을 별도로 lysis buffer에 넣고 polytron homogenizer를 사용하여 균질화 시킨 후 4°C, 15,000 x *g*에서 15분 간 원심분리하여 얻은 상정액을 단백질 분석에 사용하였다.

2-3. Immunoblotting을 이용한 AQP 단백질 확인

40 µg의 단백질을 4-20% gradient gel (TEFCO, Japan) 또는 12.5% SDS-polyacrylamide gel에서 80 mA로 1.5시간 동안 전기영동한 후 gel을 25 mA에서 2시간 PVDF membrane에 electrotransfer 시켰다. 단백질이 전이된 membrane을 blocking buffer [5% nonfat dry milk을 함유한 Tris-buffered saline (TBS)-0.1% Tween-20 (TBS-T)] 를 사용하여 1시간 동안 실온에서

blocking 시켰다. 일차 항체 AQP2, AQP3 (Alpha Diagnostic International, USA)를 1:500 에서 1:1000 의 비율로 희석하여 4℃에서 overnight 반응시켰다. 그 후 biotinylated anti-rabbit IgG (Vector) 2차 항체를 1:2000 에서 1:5,000 비율로 희석하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 membrane을 TBS-T buffer로 15분씩 2번, 5분씩 2번 세척하여 chemiluminescence detection system (ECL Plus; Biosciences)을 사용하여 암실에서 X-ray film에 노출시켜 AQP2와 AQP3 단백질을 확인하였다. 확인된 각각의 단백질은 Image analysis program (TINA 2.0)을 이용하여 분석하였다.

2-4. Total RNA 분리 및 RT-PCR

간과 신장 (피질, 외질, 수질)조직을 100 mg정도의 조각으로 잘라서 Trizol reagent (Invitrogen, Life Technologies)를 사용하여 kit가 제공하는 방법에 따라 total RNA를 분리하고 260 nm 흡광도에서 RNA를 정량하였다.

지방의 total RNA 분리는 RNeasy Lipid Tissue kit (Qiagen, USA)를 사용하였으며, kit가 제공하는 방법을 따라서 분리하였고 260 nm 흡광도에서 RNA를 정량하였다. cDNA는 1 µg의 total RNA와 Oligo (dT)₁₅ 0.5 µg/µl, Nuclease-Free Water로 총 5 µl의 부피가 되게 만든 후, 70℃에서 5분 간 열을 가한 다음 곧바로 얼음에 5분 간 방치하였다. cDNA 합성은 미리 준비한 역전사 반응 혼합액 [Nuclease-Free Water, imProm-IITM 5X reaction buffer, 10mM dNTP (final concentration 0.5 mM), recombinant RAasin^R ribonuclease inhibitor, imProm-IITM reverse transcriptase]과 섞어서 25℃에서 5분 간 반응시킨 후 42℃에서 60분간 합성하였다. 그리고 나서 70℃에서 15분 동안 가열하여 반응을 중지 시킨 후 PCR을 수행하였고, 나머지 cDNA는 -20℃ 냉동고에 보관하였다

PCR은 denaturation (94℃에서 1분), annealing (50-60℃에서 1분), extension (72℃에서 1분) 으로 하여 총 25-33 cycles 수행하였다. PCR 산물은 product size에 따라 1-3% agarose gel에서 전기 영동하여 확인하였다. 그리고 각각의 product는 Image analysis program (TINA 2.0)을 이용하여 분석하였다.



Table 1. Primer sets used for RT-PCR analysis in Long Evans Tokushima Otsuka (LETO)rat and Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF)rat

Gene	Primer (forward; reverse)	Amplicon size (base pair)	Reference
Aquaporin 3	5'-AAACTAGCAGCTCAAGGGAAC-3' 5'-TCCCACCCCTATTCCCTAAAAC-3'	367	Huebert <i>et al.</i> (2002)
Aquaporin 7	5'-ATGGCCGGTTCTGTGCTG-3' 5'-TCTAAGAACCCTGTGGTGG-3'	810	Calamita <i>et al.</i> (2001)
Aquaporin 9	5'-CCAAGATGCCTTCTGAGAAG-3' 5'-CCACTACATGATGACACTGAGC-3'	897	Damiano <i>et al.</i> (2001)
Glycerol kinase	5'-GGAGACCAGCCCTGTAAAGCT-3' 5'-GTCCACTGCTCCCACCAATG-3'	101	Guan <i>et al.</i> (2002)
β -actin	5'-CAGATCATGTTTGAGACCTT-3' 5'-CGGATGTCMACGTCACACTT-3'	509	Damiano <i>et al.</i> (2001)

III. 결 과

1. HepG2 세포에서 AQP9 단백질 발현에 미치는 여러 약제의 영향

인슐린을 HepG2 세포에 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1000 nM의 농도로 처리하였을 때 AQP9 단백질의 발현은 10 nM 농도에서 가장 증가하였고, 그 이상의 농도에서는 오히려 그 발현이 감소되었다 (Figure 1). 간에서 AQP9을 통해 글리세롤을 받아들여 당신생의 기질로 사용되는 데, HepG2 세포에서 세포 외부의 글리세롤의 농도변화 (100 μ M, 200 μ M, 500 μ M, 1000 μ M)에 따른 AQP9 단백질 발현은 큰 변화를 보이지 않았다 (Figure 2).

제2형 당뇨병의 치료제로 사용되는 PPAR α 리간드와 PPAR γ 리간드가 HepG2 세포에서 AQP9 단백질 발현에 어떠한 영향을 미치는지 Rosiglitazone 과 wy14643을 처리하여 확인하였다. rosiglitazone을 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M 농도로 처리 했을 때, 농도가 높을수록 AQP9 단백질 발현이 증가하여 100 μ M의 농도에서 발현이 가장 증가 하였다 (Figure 3). 그리고 wy14643은 50 μ M 농도에서 발현이 가장 증가 하였으며, 100 μ M농도 에서는 오히려 그 발현이 감소 하였다 (Figure 4).

유리지방산은 세포에서 인슐린의 반응을 저해한다고 알려져 있으며 oleic acid (OA)도 그러한 불포화 지방산이다. OA를 HepG2 세포에 250 μ M, 500 μ M, 750 μ M 처리 했을 때 AQP9 단백질이 250 μ M에서 500 μ M까지 현저한 증가 보였으나 750 μ M농도에서는 현저한 감소를 보였다 (Figure 5). 그리고 eicosapentanoic acid (EPA)는 다중 불포화지방산으로서, 여러 호르몬의 전구체로서 또는 혈중의 콜레스테롤을 낮추는 기능 등으로 우리 몸에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 이에 대해 HepG2 세포에서 AQP9 단백질 발현

은 대조구 보다는 증가하였지만 EPA 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M의 농도 변화에 대해 AQP9 단백질 발현에는 큰 차이가 없었다 (Figure 6).

metformin은 경구용 혈당강하제로서 오랫동안 임상에서 사용하는 약제이다. 주로 간세포에서 포도당의 생성을 억제하는 기전으로 현재에는 PPAR α 또는 PPAR γ 리간드와 함께 제2형 당뇨병의 치료제로 쓰인다. HepG2 세포에 0.5 mM, 1.0 mM, 1.5 mM, 2.0 mM의 농도로 처리 했을 때 1.5 mM에서 발현이 증가 하였다 (Figure 6).



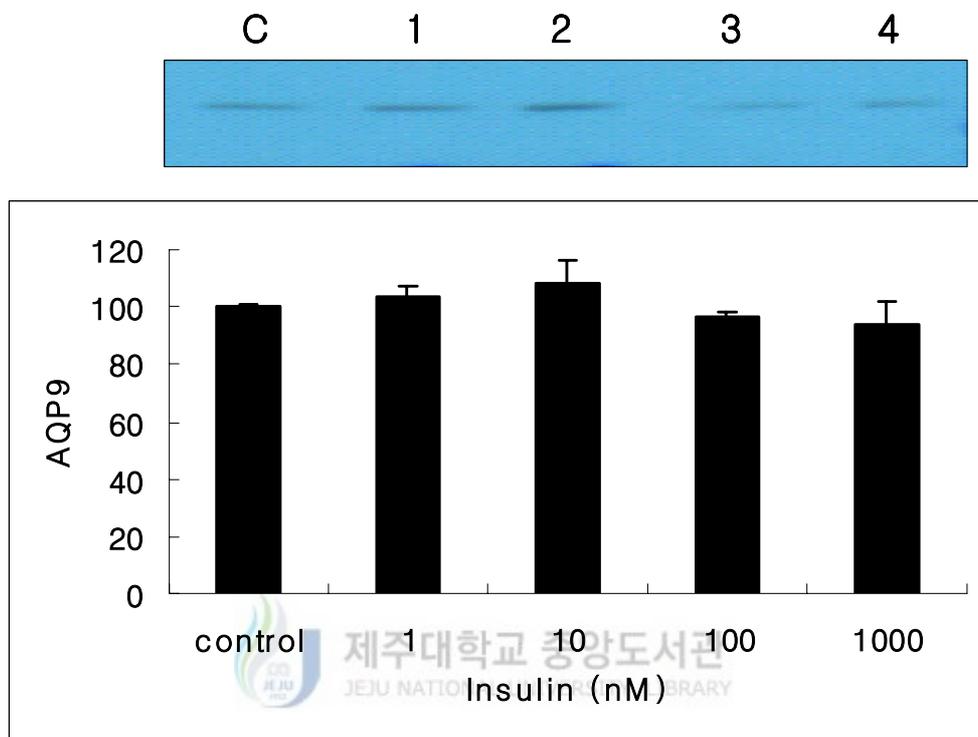


Figure 1. Protein expression of AQP9 in HepG2 cells treated with insulin. Fully grown cells were serum-starved for 16h, then the cells were incubated for 24h with insulin at various concentrations. The protein was detected near 28 kDa. Data were analyzed by image analyser.

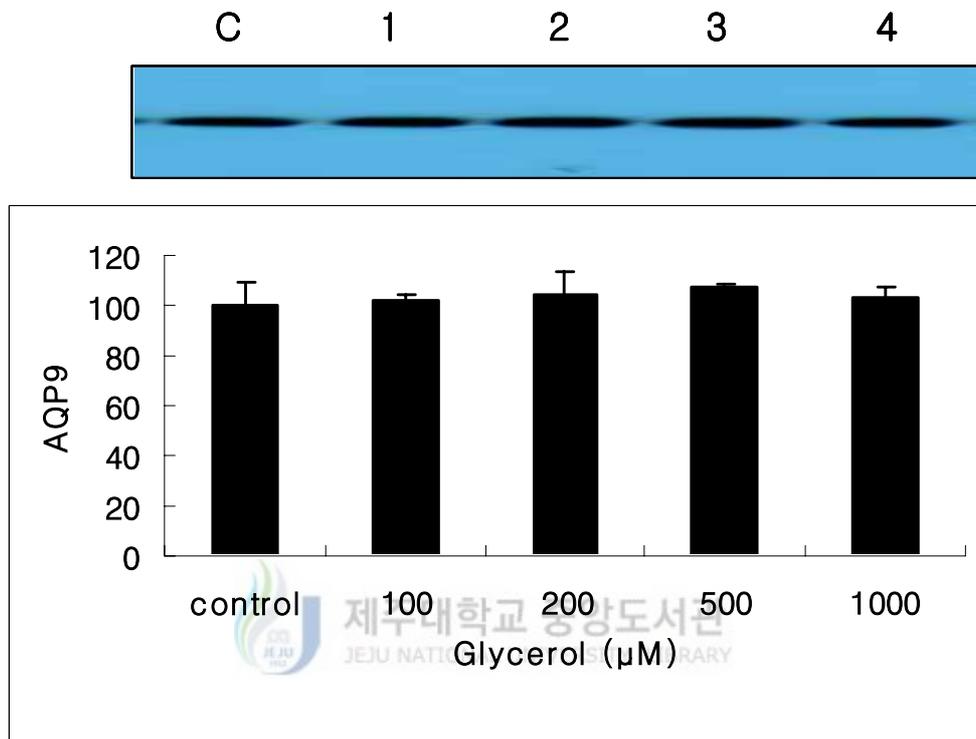


Figure 2. Protein expression of AQP9 in HepG2 cells treated with glycerol. Fully grown cells were serum-starved for 16h, then the cells were incubated for 24h with glycerol at various concentrations. The protein was detected near 28 kDa. Data were analyzed by image analyser.

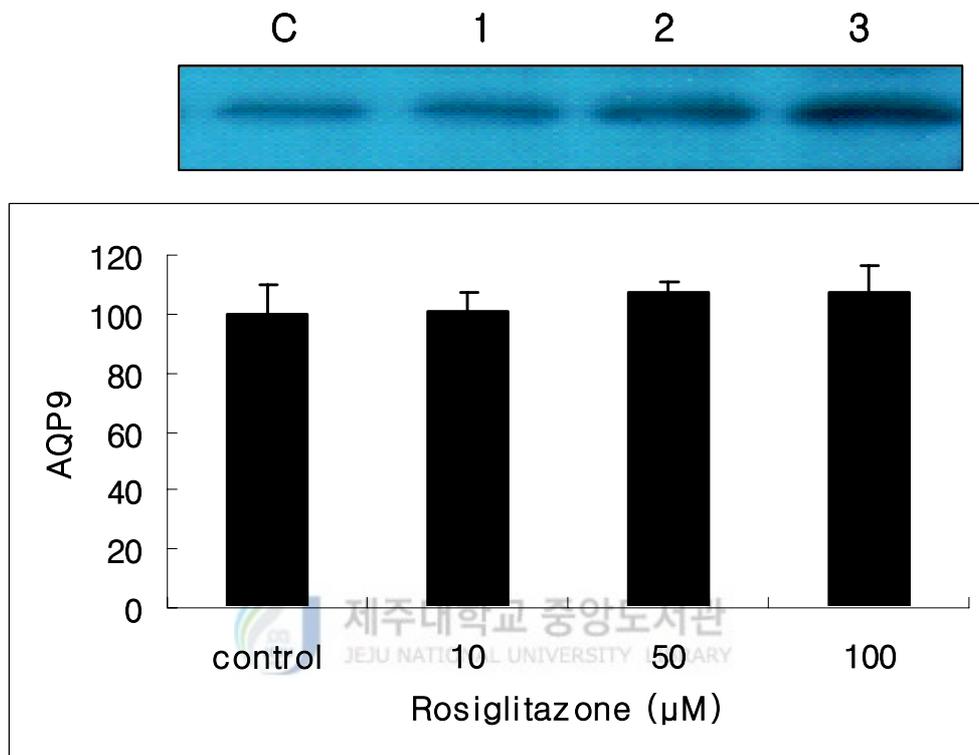


Figure 3. Protein expression of AQP9 in HepG2 cells treated with rosiglitazone. Fully grown cells were serum-starved for 16h, then the cells were incubated for 24h with rosiglitazone at various concentrations. The protein was detected near 28 kDa. Data were analyzed by image analyser.

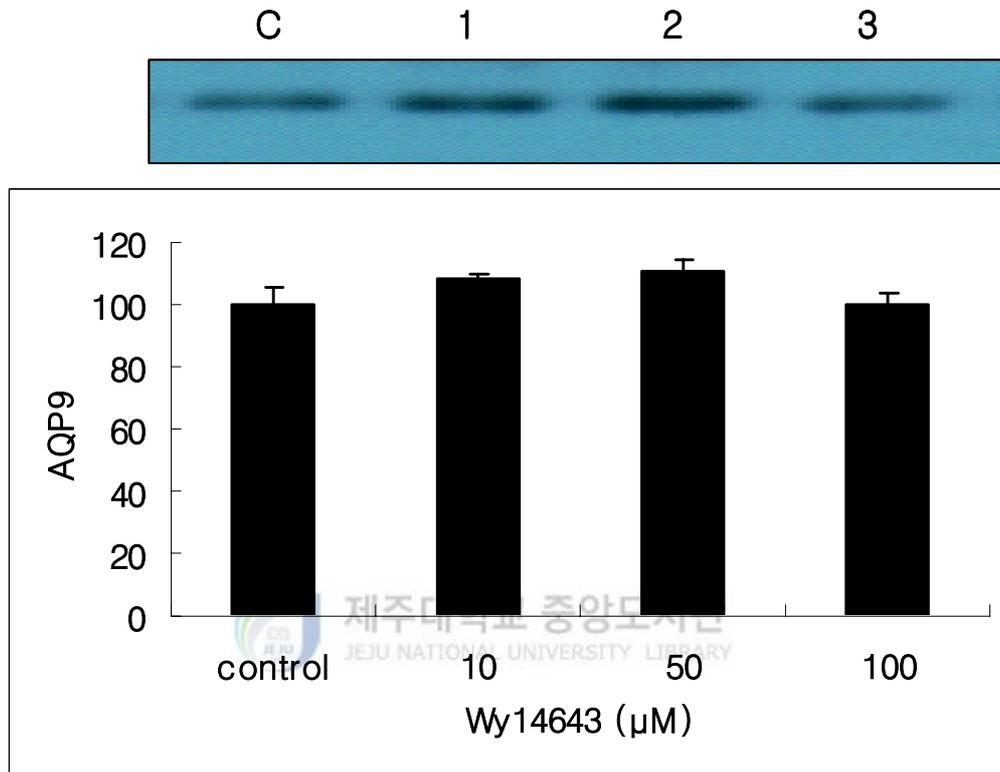


Figure 4. Protein expression of AQP9 in HepG2 cells treated with wy14643. Fully grown cells were serum-starved for 16h, then the cells were incubated for 24h with wy14643 at various concentrations. The protein was detected near 28 kDa. Data were analyzed by image analyser.

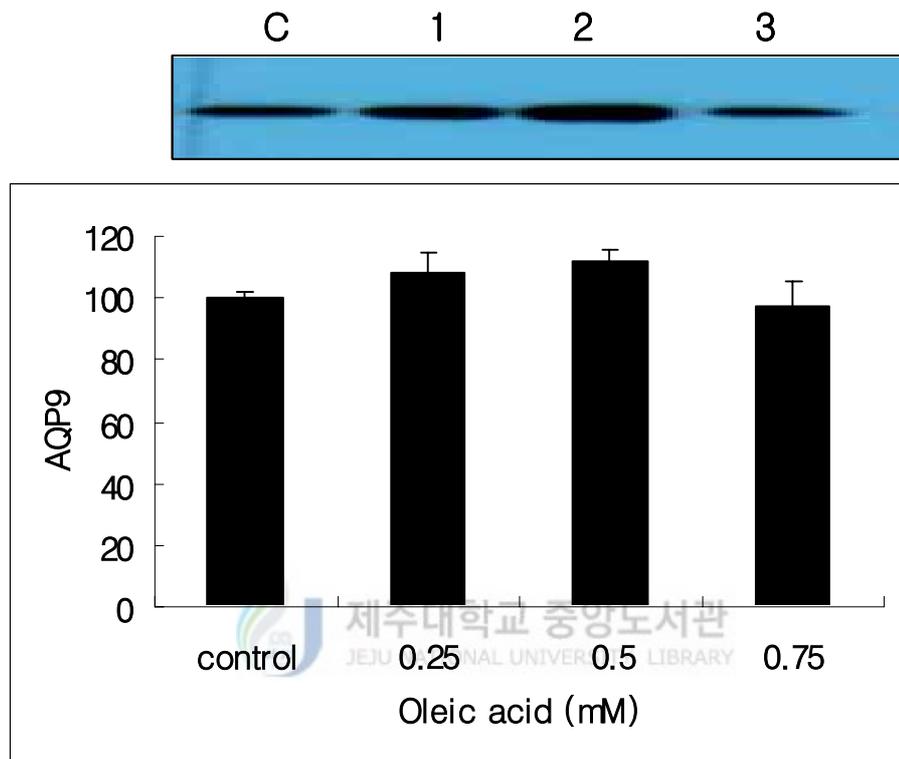


Figure 5. Protein expression of AQP9 in HepG2 cells treated with oleic acid (OA). Fully grown cells were serum-starved for 16h, then the cells were incubated for 24h with oleic acid (OA) at various concentrations. The protein was detected near 28 kDa. Data were analyzed by image analyser.

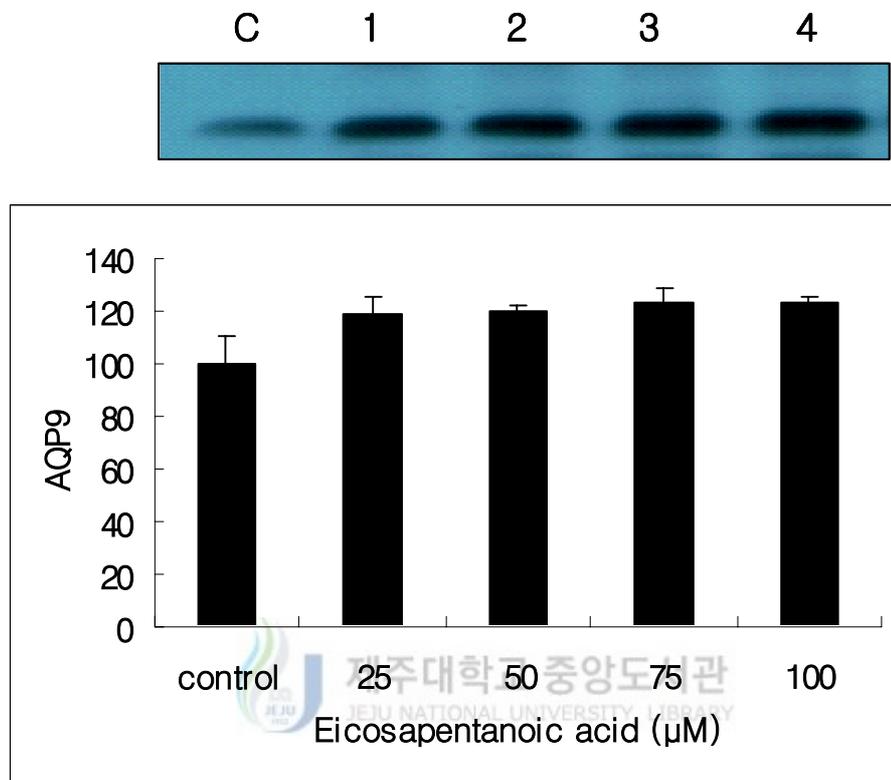


Figure 6. Protein expression of AQP9 in HepG2 cells treated with eicosapentanoic acid (EPA). Fully grown cells were serum-starved for 16h, then the cells were incubated for 24h with eicosapentanoic acid (EPA) at various concentrations. The protein was detected near 28 kDa. Data were analyzed by image analyser.

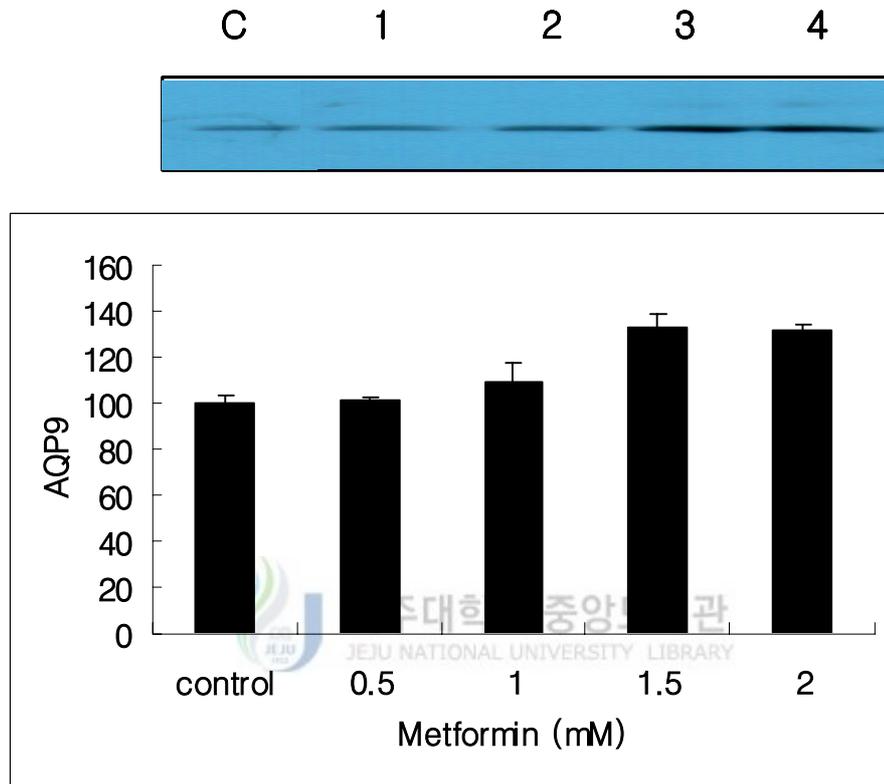


Figure 7. Protein expression of AQP9 in HepG2 cells treated with metformin. Fully grown cells were serum-starved for 16h, then the cells were incubated for 24h with metformin at various concentrations. The protein was detected near 28 kDa. Data were analyzed by image analyser.

2. OLETF 쥐에서 rosiglitazone의 효과

LETO 쥐 수컷 6마리, OLETF 쥐 수컷 6마리와 rosiglitazone을 먹인 OLETF 쥐 수컷 6마리를 3 group으로 나누어 사육하였다. 일주일에 한번씩 혈당을 측정하고, 혈당이 오르기 시작한 후 22주부터 rosiglitazone을 일반 사료에 0.01%로 섞어서 24주까지 2주간 마음껏 먹게 했다. 그 후 체중은 LETO 쥐 group의 평균 체중이 480g 이었고, OLETF 쥐 group은 평균 체중이 598g, rosiglitazone을 먹은 OLETF 쥐 group은 평균 체중이 607g로 측정되었다. OLETF 쥐는 왕성한 식욕에 의해 복부비만으로 이름을 알 수 있었는데, 체중은 일반 사료만 먹인 OLETF 쥐 group 보다 rosiglitazone을 먹인 OLETF 쥐 group에서 약간 증가함을 보였다(Table 2). 그리고 혈장의 포도당의 농도는 rosiglitazone을 먹인 OLETF 쥐 group에서 대조구 OLETF 쥐 group 보다 감소하여 거의 정상 수준까지 떨어졌다. 또한 혈장에서 측정된 유리지방산 농도와 인슐린의 농도는 2주 동안 rosiglitazone을 먹인 OLETF 쥐 group에서 대조구 OLETF 쥐 group 보다 유의적인 감소 ($P < 0.05$)를 보여 인슐린 저항성이 개선됨을 보여 주었다.

Table 2. The effect of rosiglitazone on the gain of body weights, glucose, free fatty acid, and insulin levels of the plasma in rats

	Experimental group		
	LETO (n=6)	OLETF (n=6)	ROSI-OLETF (n=6)
Body weight (g)	488.0 ± 5.3	598.3 ± 3.8*	607.3 ± 17.9
Plasma glucose (mg/dL)	96.0 ± 3.0	117.5 ± 6.2*	104.2 ± 5.3*
Free fatty acid (mg/dL)	447.6 ± 20.1	589.0 ± 58.6	379.0 ± 83.3*
Plasma insulin (μU/mL)	92.7 ± 17.8	219.1 ± 6.6*	55.8 ± 10.3**

Values are mean ± SE(standard error), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2-1. Aquaglyceroporin mRNA 발현에 미치는 rosiglitazone의 영향

실험동물 OLETF 쥐에 rosiglitazone (0.01%)을 2주 동안 먹었을 때 인슐린 저항성이 현저히 개선됨을 확인 하였다 (Table 2). 따라서 분자적인 관점에서 Aquaglyceroporin과 관련하여 어떠한 기작에 의해 조절되는지 알아보기 위해 LETO 쥐, OLETF 쥐, rosiglitazone을 먹인 OLETF 쥐에서 간, 장간막 지방 과 고환주위 지방을 떼내어 total RNA를 분리하여 AQP3, AQP7, AQP9의 mRNA 발현을 분석하였다.

간에서 AQP9 mRNA 발현은 세 group 간의 유의적인 차이는 없었지만 rosiglitazone을 먹인 OLETF 쥐 group에서 AQP9 mRNA 발현이 약간 증가함을 보였다 (Figure 8). 그리고 AQP3 mRNA 발현도 AQP9 mRNA 발현 양상과 유사함을 보여주었다 (Figure 9). 또한 간의 rosiglitazone 효과에 의한 GyK mRNA 발현은 rosiglitazone 먹인 OLETF 쥐에서 약간 발현이 감소함을 보였다 (Figure 10).

그러나 지방조직에서는 rosiglitazone 효과에 의한 GyK의 mRNA 유전자 발현에 직접적인 영향을 보였다. 특히 장간막 지방조직에서 AQP7 mRNA 유전자 발현은 rosiglitazone을 먹인 OLETF 쥐 group에서 유의적인 증가를 보였다 (Figure 11). 현재까지 지방세포에는 AQP7 특이적으로 존재한다고 알려지고 있다. 그러나 본 실험에서는 AQP3이 AQP7과 같은 양상으로 발현되었다 (Figure 12). 그리고 장간막 지방조직에서 GyK mRNA 유전자 발현은 rosiglitazone을 먹인 OLETF 쥐 group에서 유의적인 증가를 보였다 (Figure 13). 고환 주위의 지방조직에서는 rosiglitazone 효과에 의한 AQP3 과 AQP7 mRNA 유전자 발현은 세 group에서 유의적인 차이가 없었다 (Figure 14 와 15). 그러나 GyK mRNA 유전자 발현은 rosiglitazone 먹인 OLETF 쥐 group에서 유의적인 증가를 보였다 (Figure 16). 두 지방조직에서 rosiglitazone에 의한 AQP3과 AQP7 mRNA 발현은 장간막 지방조직에서 유의적인 증가를

보였지만 고환주위의 지방조직에서는 AQP3 과 AQP7 mRNA 발현이 세 group에서 유의적인 차이가 없었다. 그리고 GyK mRNA 발현은 두 부분의 지방조직에서 rosiglitazone 먹인 OLETF 쥐 group에서 유의적인 증가를 보였다.



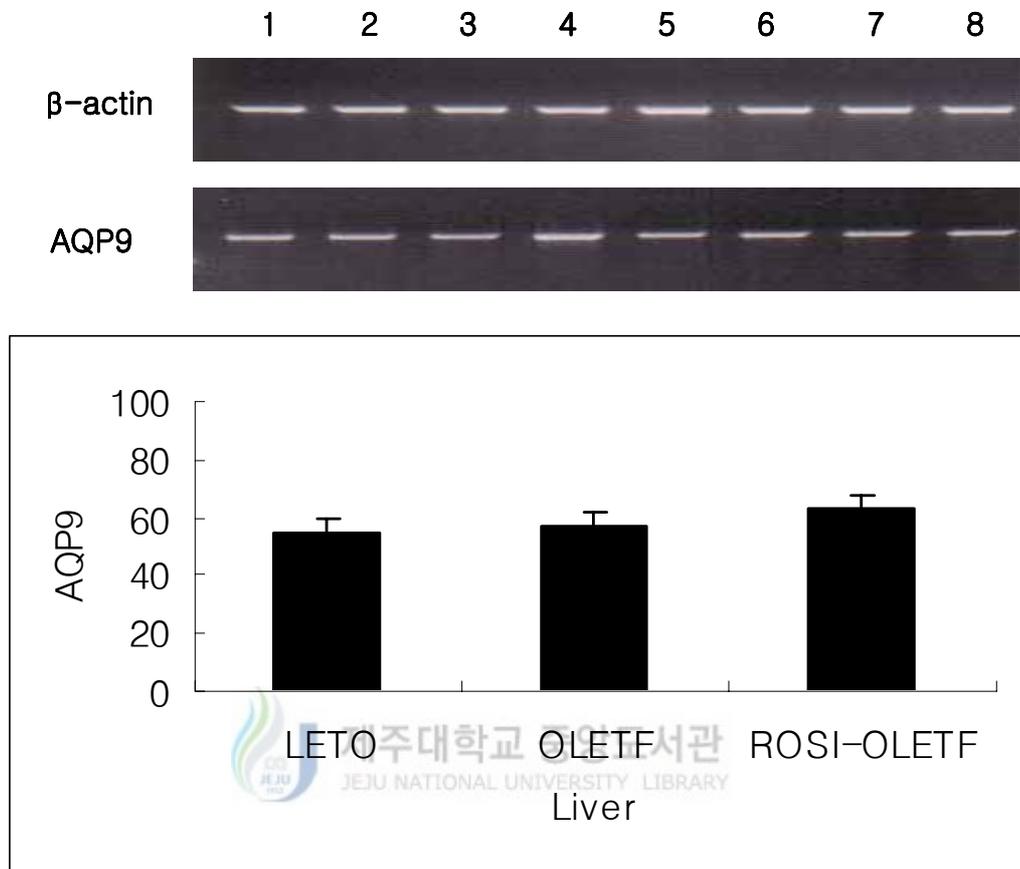


Figure 8. AQP9 mRNA expression levels in the liver tissue of the experimental animals. The expression levels were corrected by dividing with β -actin mRNA expression levels as the internal control. The lanes as follows : 1-3; LETO, 4-6; OLETF, 7-8; ROSI-OLETF.

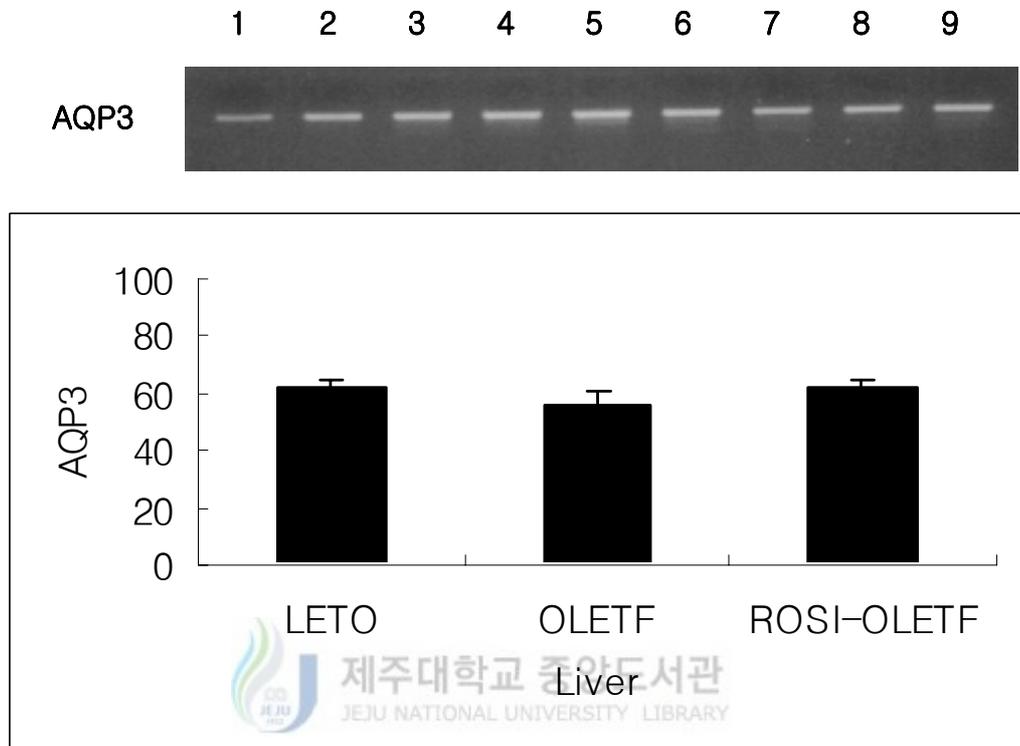


Figure 9. AQP3 mRNA expression levels in the liver tissue of the experimental animals. The expression levels were corrected by dividing with β -actin mRNA expression levels as the internal control. The lanes as follows : 1-3; LETO, 4-6; OLETF, 7-9; ROSI-OLETF.

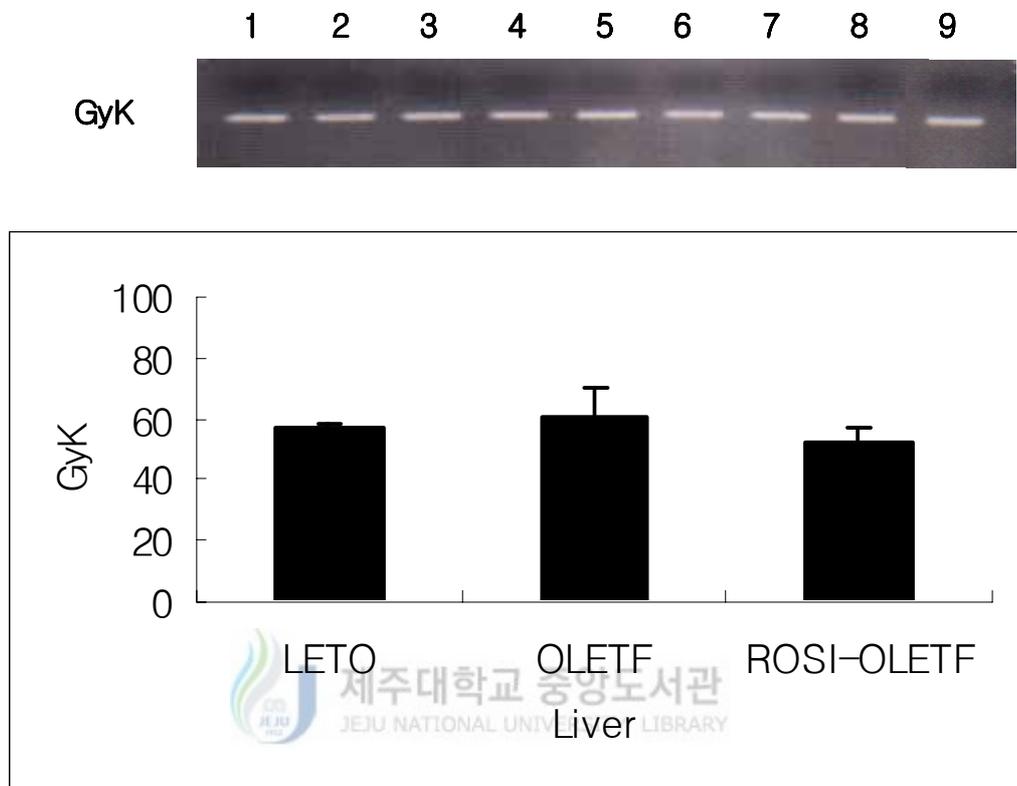


Figure 10. GyK mRNA expression levels in the liver tissue of the experimental animals. The expression levels were corrected by dividing with β -actin mRNA expression levels as the internal control. The lanes as follows : 1-3; LETO, 4-6; OLETF, 7-9; ROSI-OLETF.

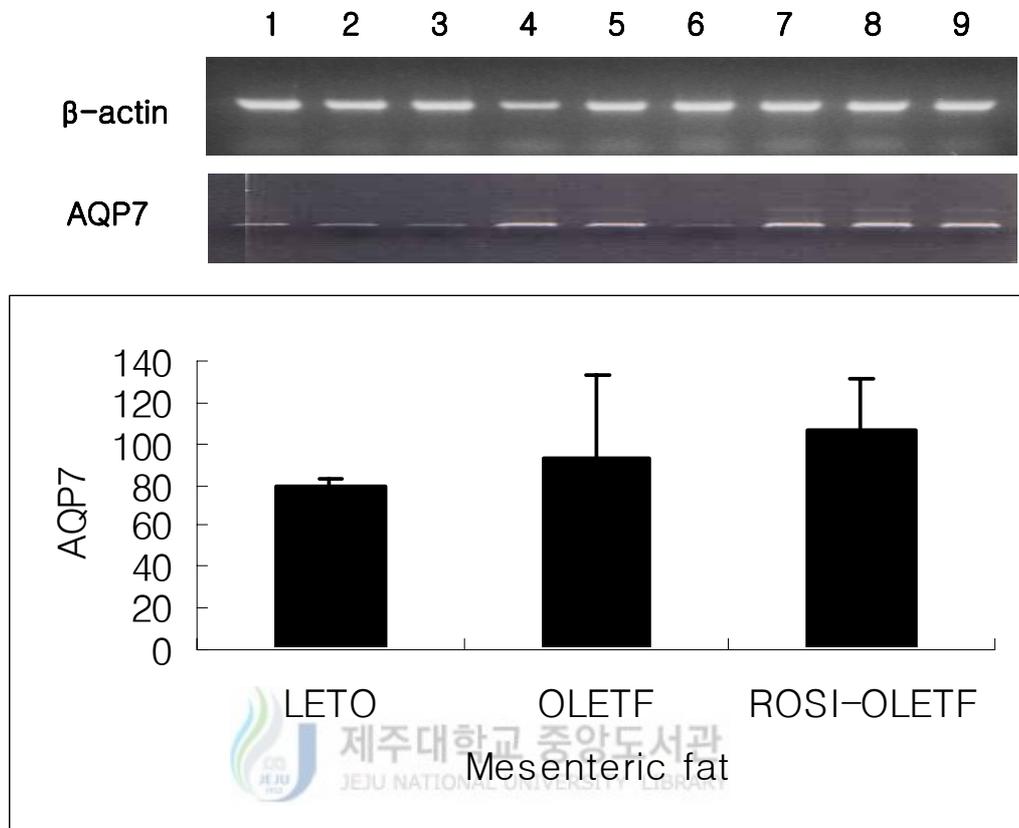


Figure 11. AQP7 mRNA expression levels in the mesenteric fat tissue of the experimental animals. The expression levels were corrected by dividing with β -actin mRNA expression levels as the internal control. The lanes as follows : 1-3; LETO, 4-6; OLETF, 7-9; ROSI-OLETF.

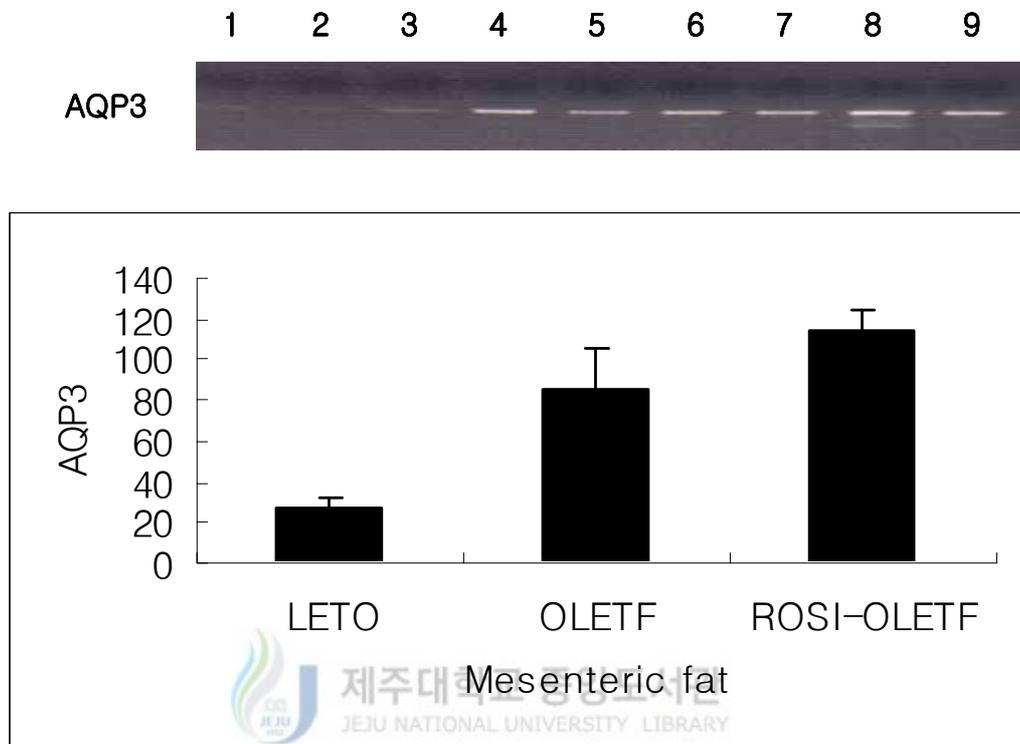


Figure 12. AQP3 mRNA expression levels in the mesenteric fat tissue of the experimental animals. The expression levels were corrected by dividing with β -actin mRNA expression levels as the internal control. The lanes as follows : 1-3; LETO, 4-6; OLETF, 7-9; ROSI-OLETF.

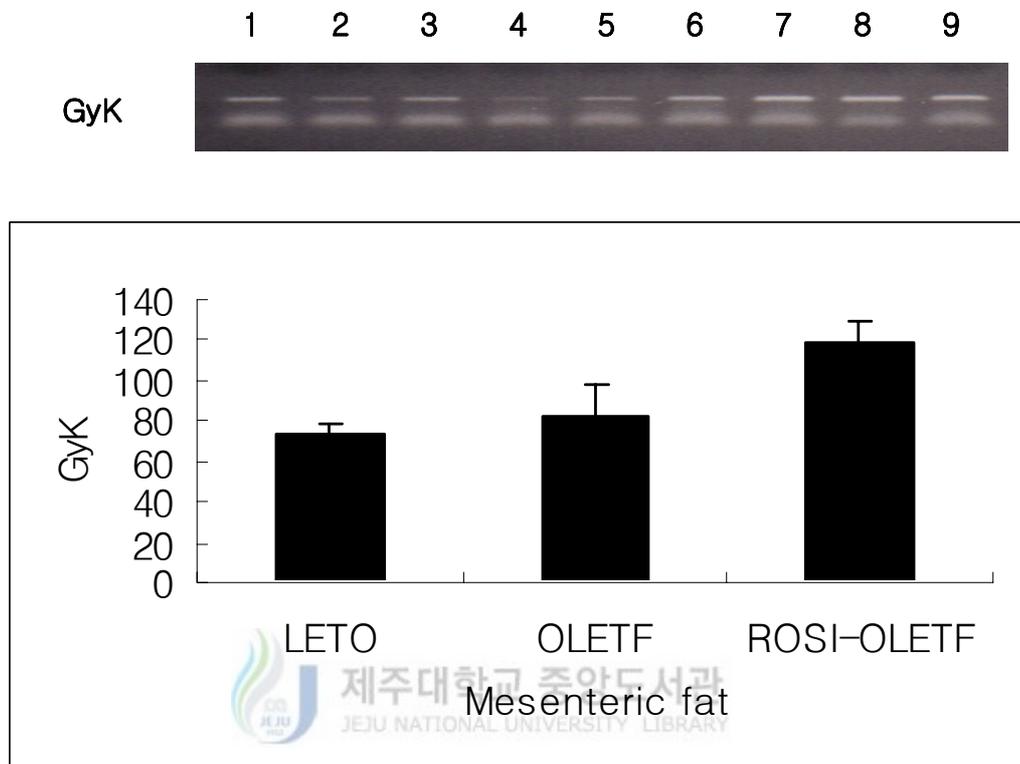


Figure 13. GyK mRNA expression levels in the mesenteric fat tissue of the experimental animals. The expression levels were corrected by dividing with β -actin mRNA expression levels as the internal control. The lanes as follows : 1-3; LETO, 4-6; OLETF, 7-9; ROSI-OLETF.

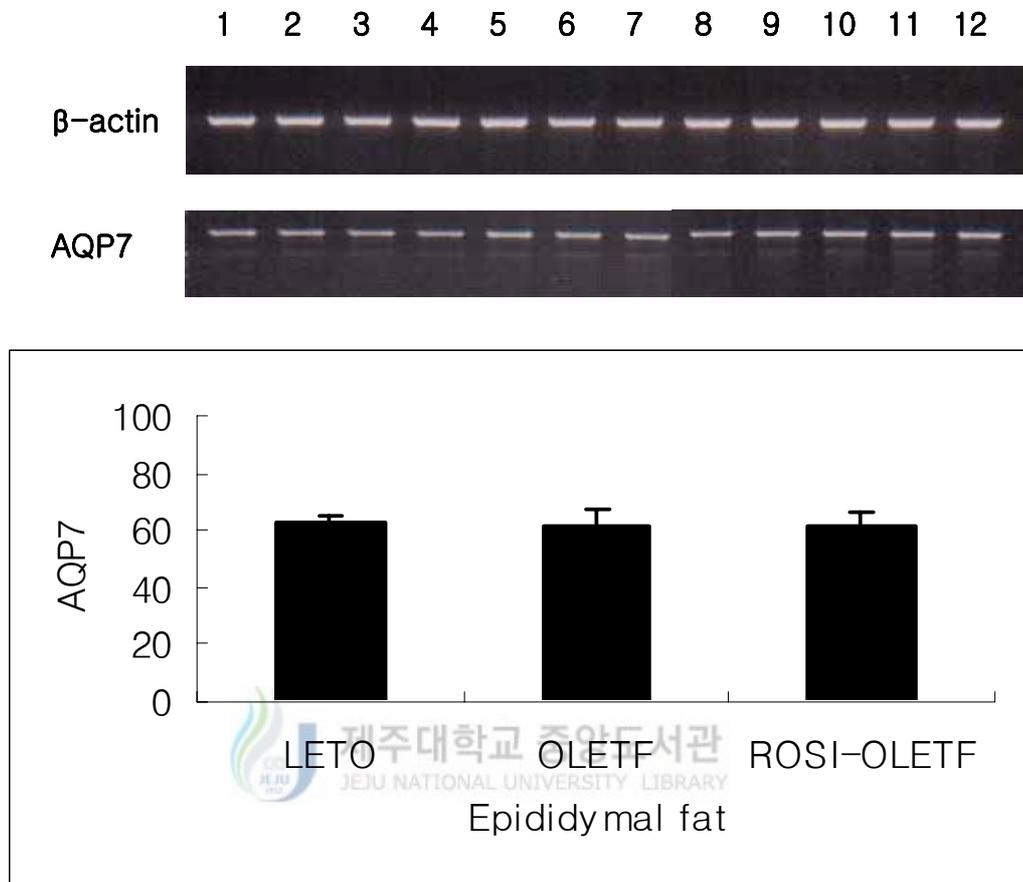


Figure 14. AQP7 mRNA expression levels in the epididymal fat tissue of the experimental animals. The expression levels were corrected by dividing with β -actin mRNA expression levels as the internal control. The lanes as follows : 1-4; LETO, 5-8; OLETF, 9-12; ROSI-OLETF.

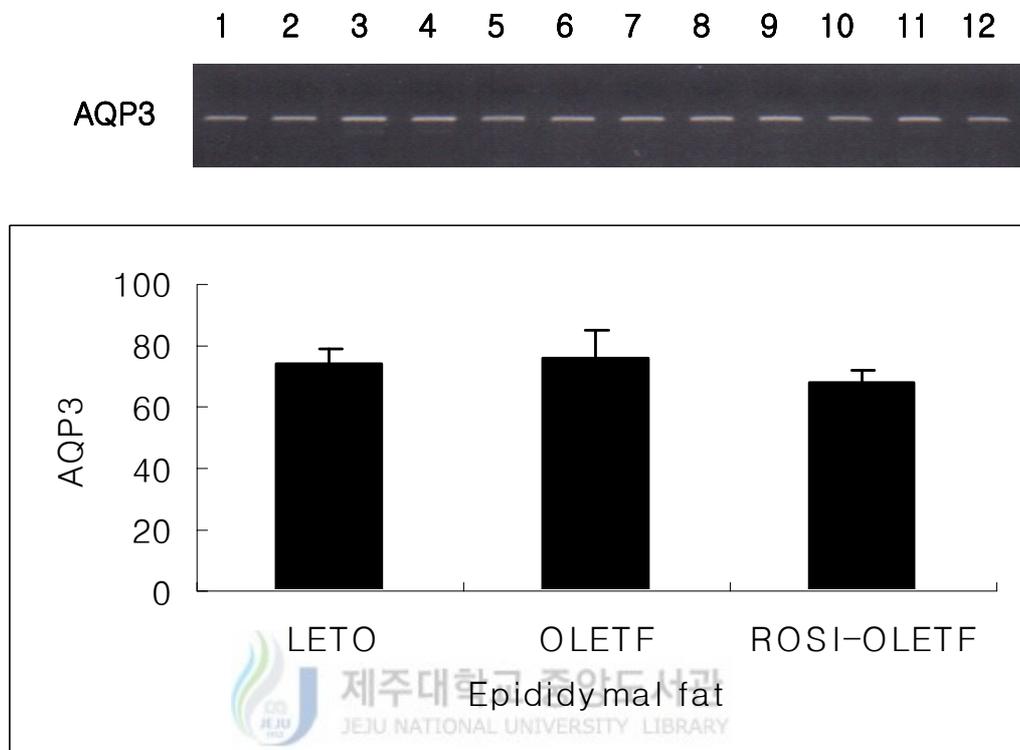


Figure 15. AQP3 mRNA expression levels in the epididymal fat tissue of the experimental animals. The expression levels were corrected by dividing with β -actin mRNA expression levels as the internal control. The lanes as follows : 1-4; LETO, 5-8; OLETF, 9-12; ROSI-OLETF.

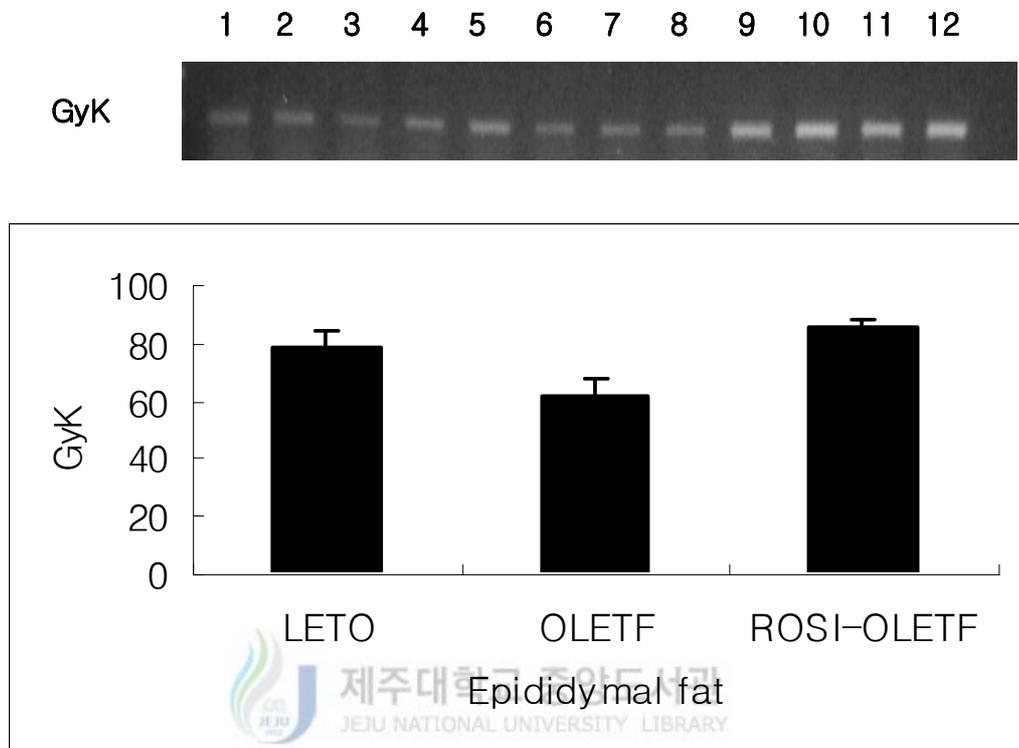


Figure 16. GyK mRNA expression levels in the epididymal fat tissue of the experimental animals. The expression levels were corrected by dividing with β -actin mRNA expression levels as the internal control. The lanes as follows : 1-4; LETO, 5-8; OLETF, 9-12; ROSI-OLETF.

2-2. 신장에서 AQP2와 AQP3 발현에 미치는 rosiglitazone의 영향

우선 신장 전체 조직에서 rosiglitazone 효과에 의한 AQP3 단백질의 발현을 immunoblot에 의해 확인 하였다. AQP3 단백질은 당화된 형태로 발현되어 그 크기는 35kDa 정도로 나타났다 (Figure 17). rosiglitazone을 먹인 OLETF 쥐 group에서 대조구 OLETF 쥐 group 보다 AQP3 단백질의 발현이 증가하였지만 LETO 쥐 group 보다는 현저히 낮았다. 그러나 신장조직에서 피질 부분만 분리하여 이를 초원심분리하여 얻은 막단백질 부분은 확인한 결과 AQP3 단백질 발현은 rosiglitazone을 먹인 OLETF 쥐 group에서 유의적인 증가를 보였다 (Figure 18). 그리고 외질 부분의 막단백질 부분에서 AQP3 단백질 발현은 당화된 형태와 비당화된 형태로 발현되어 그 크기는 각각 35kDa와 28kDa 정도로 나타났다 (Figure 19). rosiglitazone을 먹인 OLETF 쥐 group에서 AQP3 단백질 발현이 증가함을 보였다. AQP2는 주로 물의 수송에 관여한다. 신장에서 외질 부분만 분리하여 이를 초원심분리하여 얻은 막단백질 부분에서 AQP2의 단백질 발현은 당화된 형태와 비당화된 형태로 발현되어 그 크기는 각각 35kDa와 28kDa 정도로 나타났다 (Figure 20). rosiglitazone을 먹인 OLETF 쥐 group에서 약간 AQP2 단백질의 발현이 증가함을 보였다 (Figure 20).

2-3. 신장에서 GyK와 AQP7 mRNA 발현에 미치는 rosiglitazone의 영향

rosiglitazone이 신장에서 GyK와 AQP7 mRNA 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인 하였다. 신장 피질 부분의 total RNA에서 RT-PCR에 의한 GyK mRNA 발현은 rosiglitazone 먹이지 않은 OLETF 쥐 group에서 그 발현이 증가함을 보였다 (Figure 21). GyK mRNA 발현은 rosiglitazone을 먹인

OLETF 쥐 group에서 개체 간의 차이가 많았다. 그림 23은 신장, 외질 부분의 total RNA에서 RT-PCR에 의한 GyK mRNA 발현을 보였다. 세 group 사이에서 GyK mRNA 발현에 차이는 보이지 않았다 (Figure 23). 그리고 신장, 외질 부분의 total RNA에서 RT-PCR에 의한 AQP7 mRNA 발현은 신장, 피질 부분에서 보다 발현이 낮음을 나타내고 있다 (Figure 24). 신장의 내질 부위에서는rosiglitazone 먹인 OLETF 쥐 group에서 GyK의 mRNA 발현이 약간 감소함을 보였다 (Figure 25). 그리고 AQP7 mRNA 발현은 신장의 피질과 외질부분 보다 현저하게 낮음을 보였다 (Figure 26).

LETO 쥐, OLETF 쥐, ROSI-OLETF 쥐의 세 group사이에 간, 지방 그리고 신장에서 특이적으로 발현되는 AQP에 대한 rosiglitazone의 영향을 Table 3에 요약하였다.



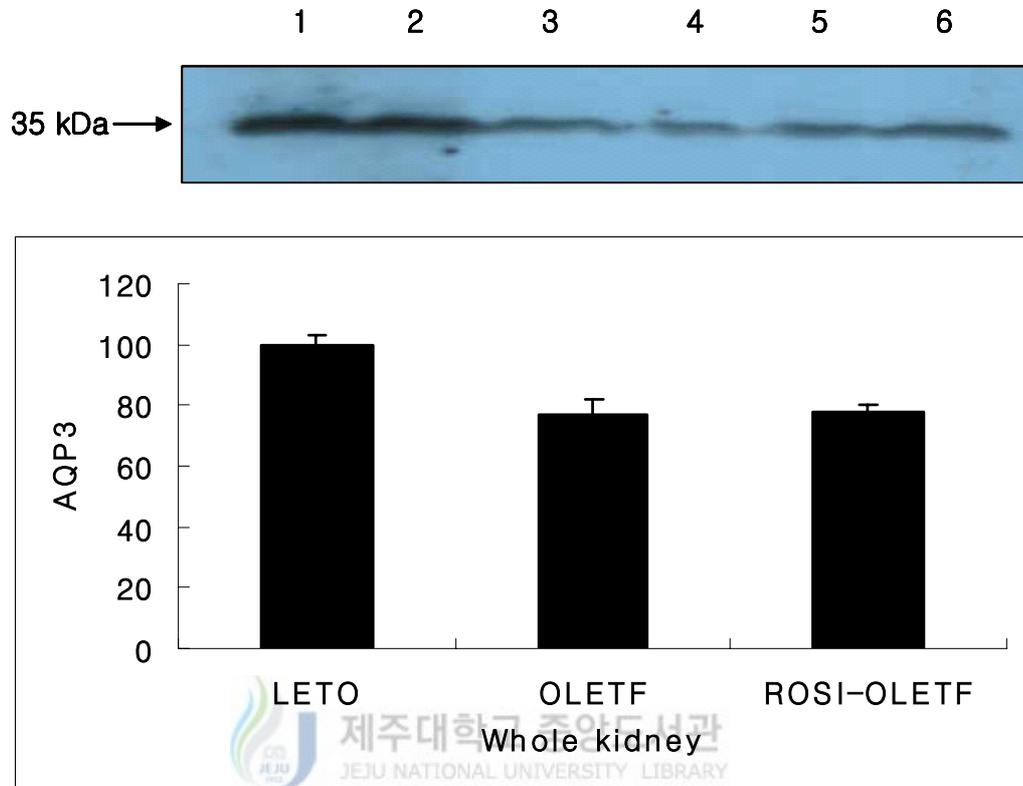


Figure 17. The effect of rosiglitazone on AQP3 expression in the kidney. The glycosylated form of AQP3 was detected near 35kDa. Data were analyzed by image analyser. The lanes as follows: 1-2; LETO, 3-4; OLETF, 5-6; ROSI-OLETF.

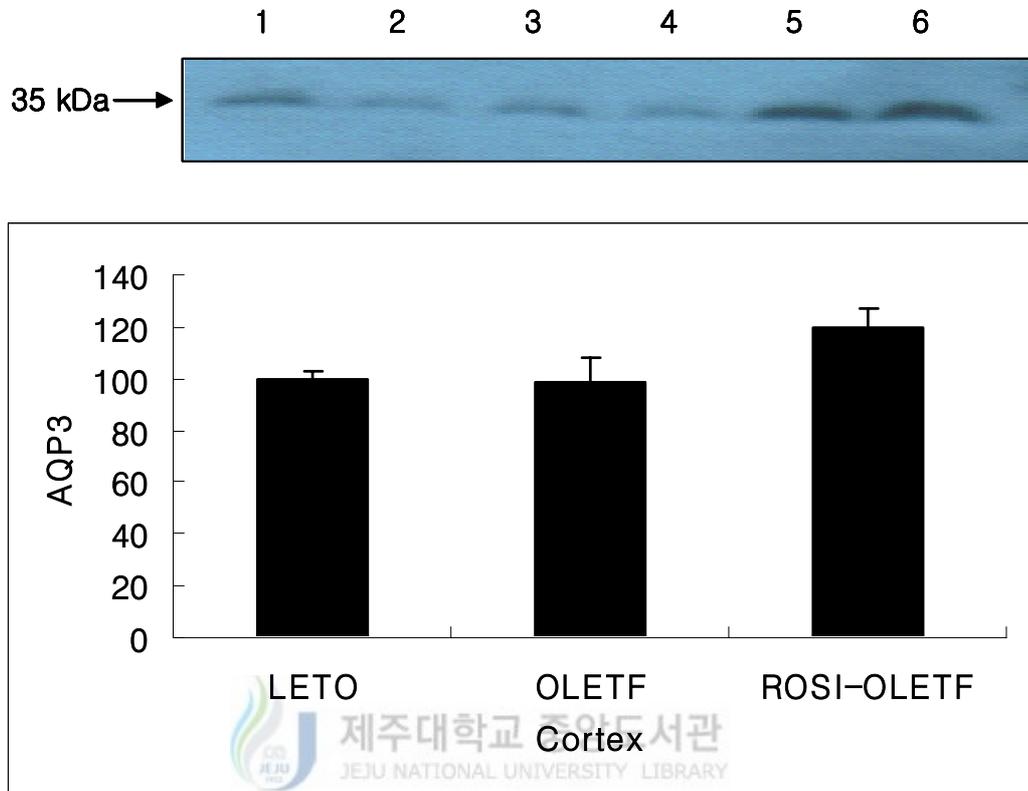


Figure 18. The effect of rosiglitazone on AQP3 expression in the renal cortex membrane fraction. The glycosylated form of AQP3 was detected near 35kDa. Data were analyzed by image analyser. The lanes as follows: 1-2; LETO, 3-4; OLETF, 5-6; ROSI-OLETF.

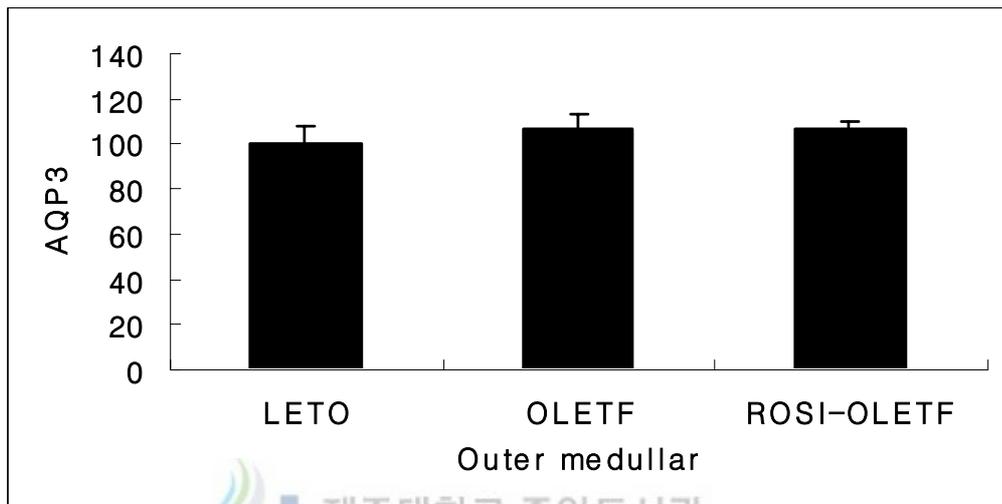
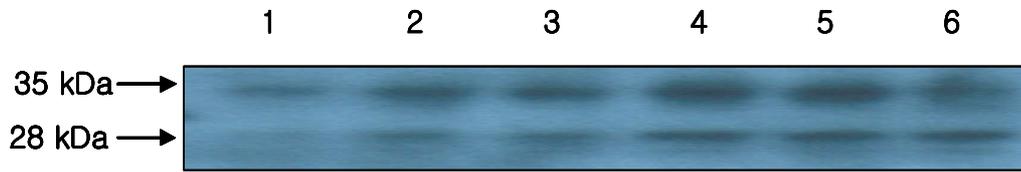


Figure 19. The effect of rosiglitazone on AQP3 expression in the renal outer medullar membrane fraction. The level was evaluated with the sum of the non-glycosylated (28 kDa) and glycosylated form (35 kDa) of AQP3. Data were analyzed by image analyser. The lanes as follows: 1-2; LETO, 3-4; OLETF, 5-6; ROSI-OLETF.

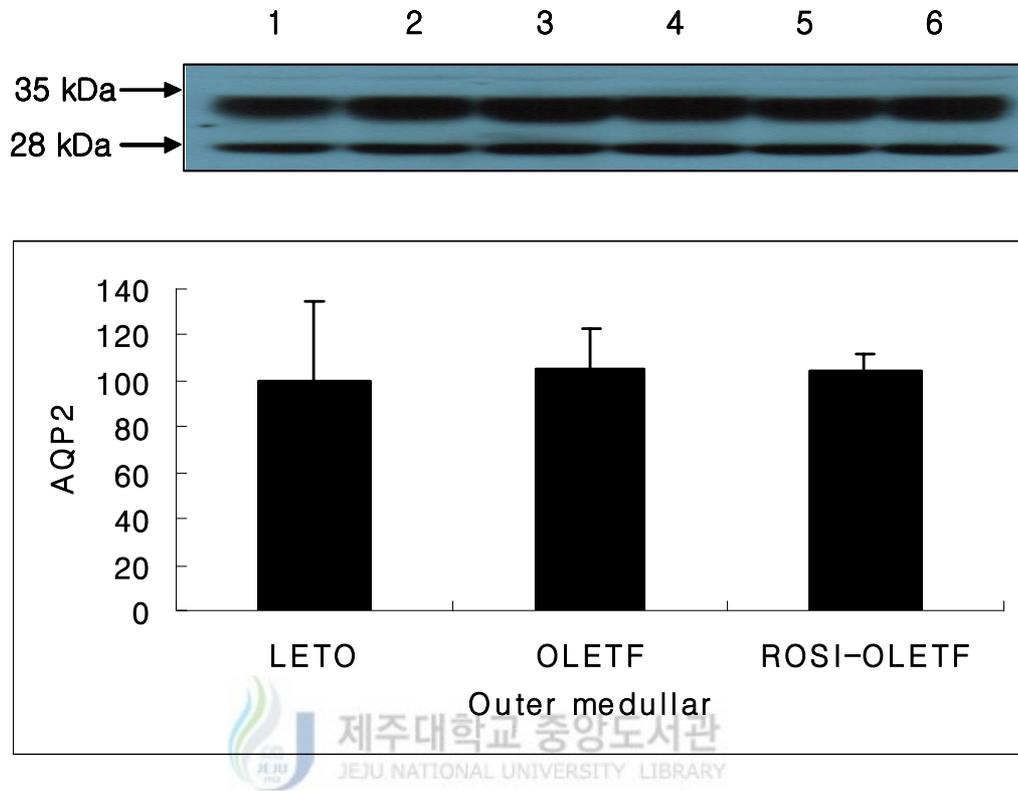


Figure 20. The effect of rosiglitazone on AQP2 expression in the renal outer medullar membrane fraction. The level was evaluated with the sum of the non-glycosylated (28 kDa) and glycosylated form (35 kDa) of AQP2. Data were analyzed by image analyser. The lanes as follows: 1-2; LETO, 3-4; OLETF, 5-6; ROSI-OLETF.

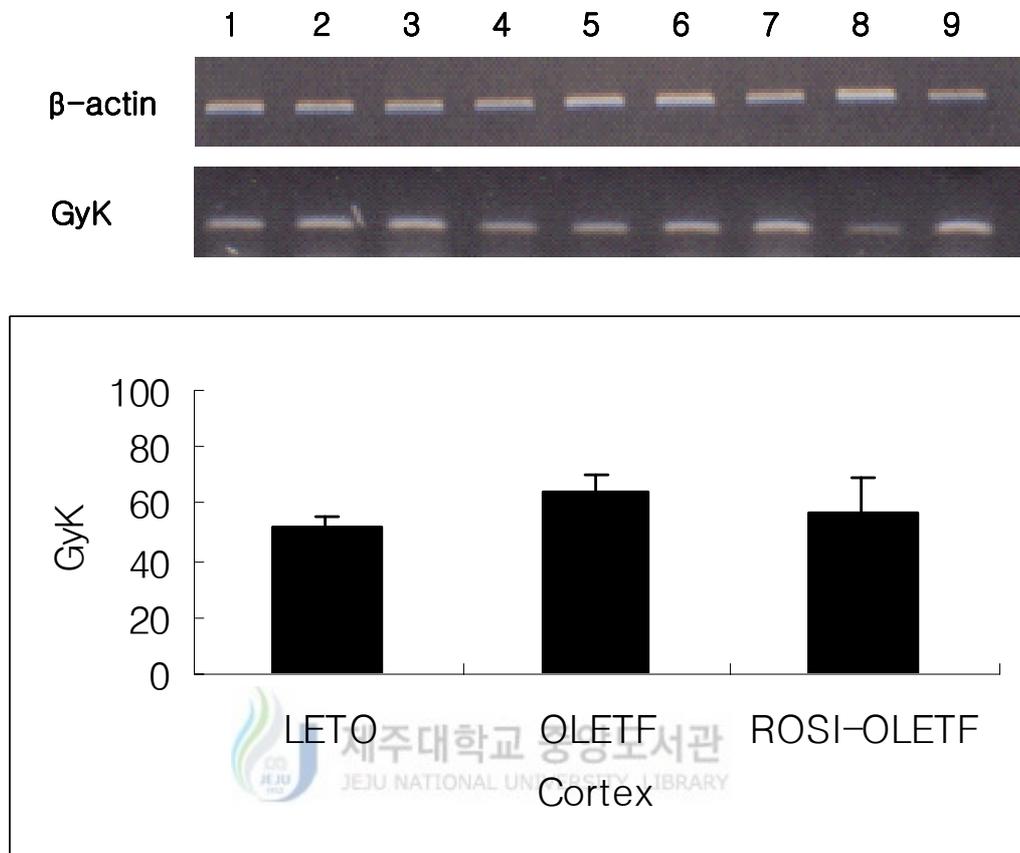


Figure 21. GyK mRNA expression levels in the renal cortex tissue. The expression levels were corrected by dividing with β -actin mRNA expression levels as the internal control. The lanes as follows : 1-3; LETO, 4-6; OLETF, 7-9; ROSI-OLETF.

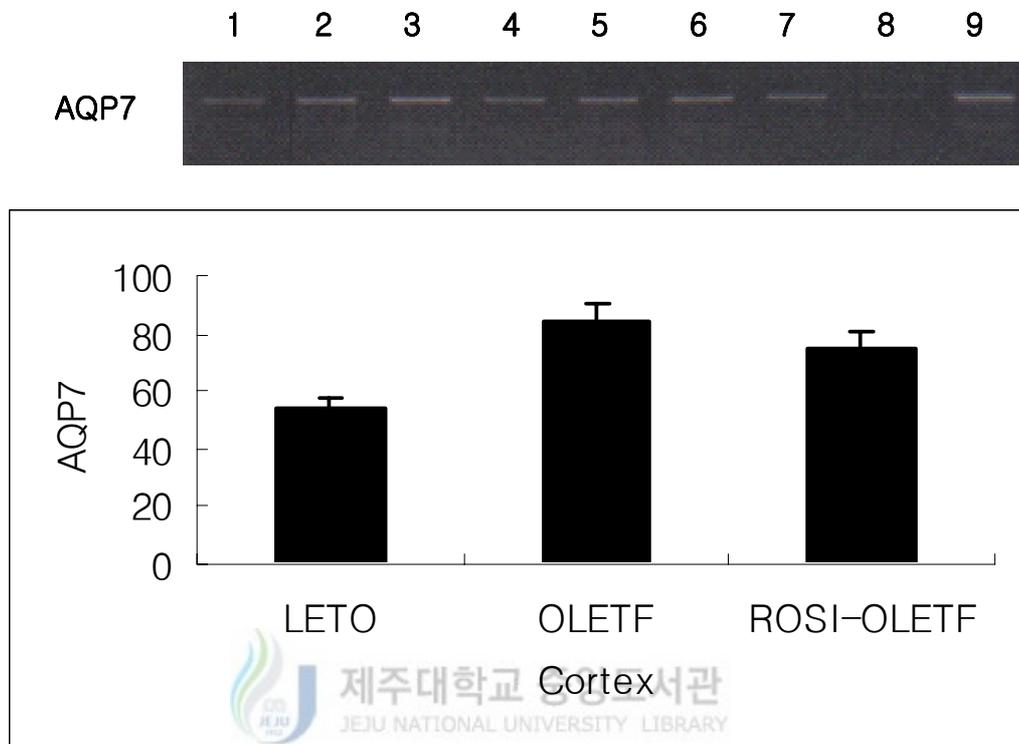


Figure 22. GyK AQP7 expression levels in the renal cortex tissue. The expression levels were corrected by dividing with β -actin mRNA expression levels as the internal control. The lanes as follows : 1-3; LETO, 4-6; OLETF, 7-9; ROSI-OLETF.

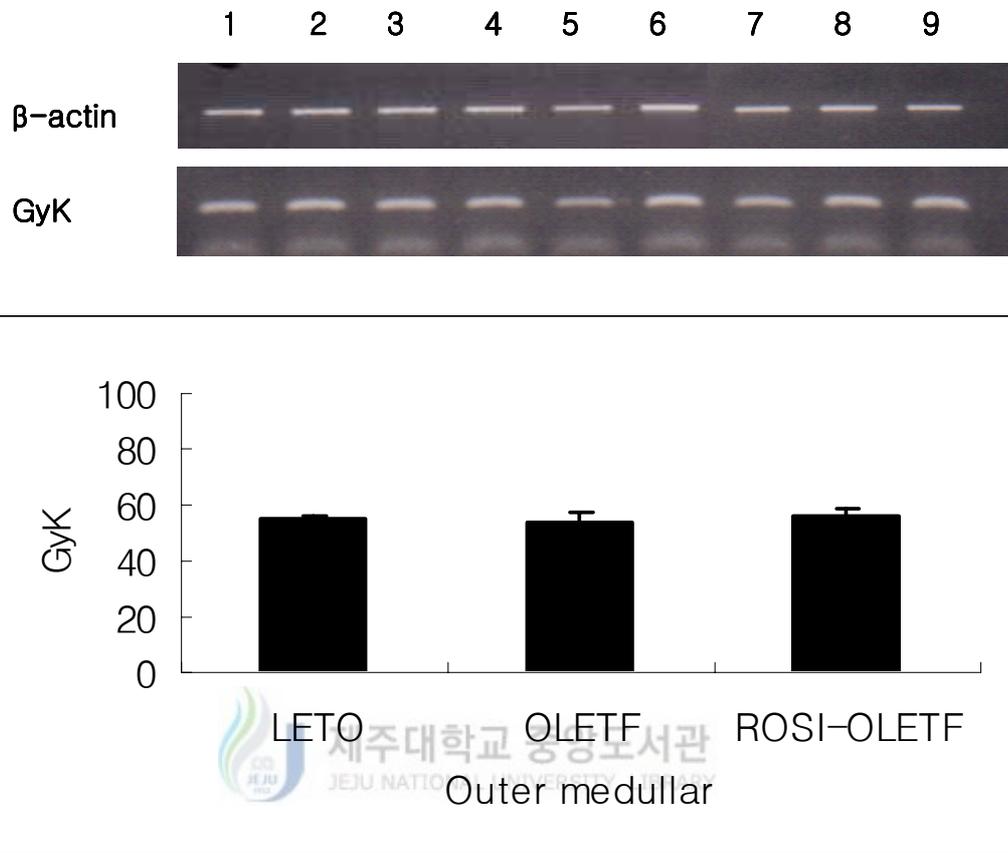


Figure 23. GyK mRNA expression levels in the renal outer medullar tissue. The expression levels were corrected by dividing with β -actin mRNA expression levels as the internal control. The lanes as follows : 1-3; LETO, 4-6; OLETF, 7-9; ROSI-OLETF.

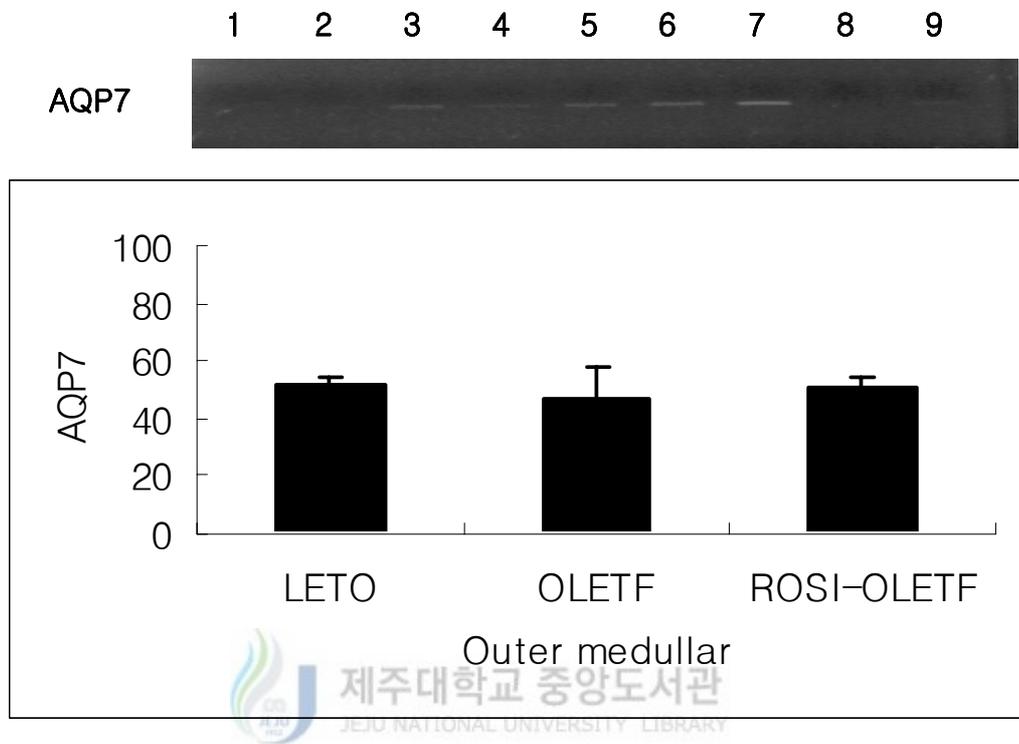


Figure 24. AQP7 mRNA expression levels in the renal outer medullar tissue. The expression levels were corrected by dividing with β -actin mRNA expression levels as the internal control. The lanes as follows : 1-3; LETO, 4-6; OLETF, 7-9; ROSI-OLETF.

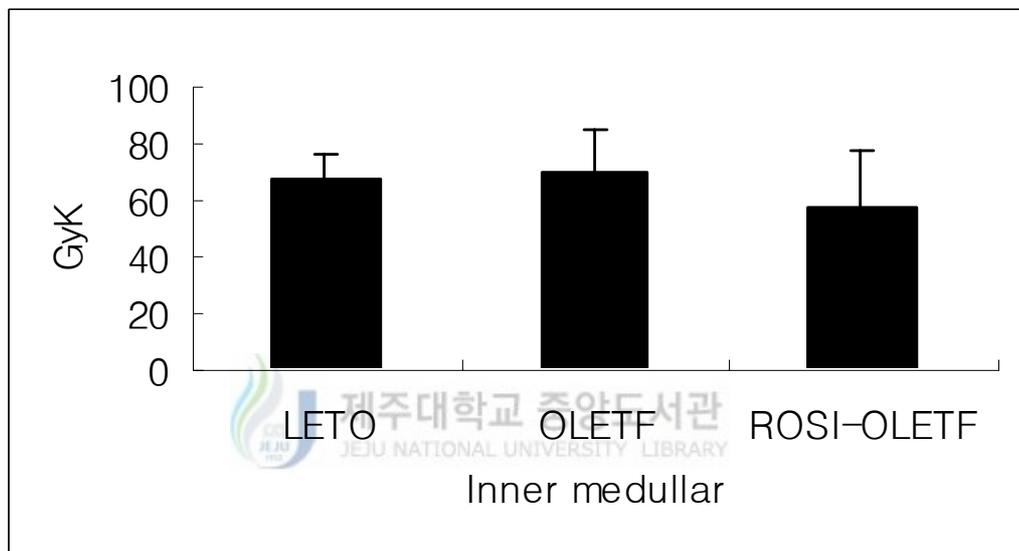
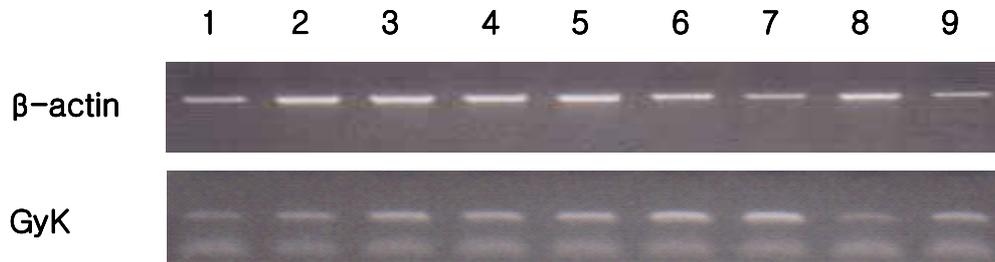


Figure 25. GyK mRNA expression levels in the renal inner medullar tissue. The expression levels were corrected by dividing with β -actin mRNA expression levels as the internal control. The lanes as follows : 1-3; LETO, 4-6; OLETF, 7-9; ROSI-OLETF.

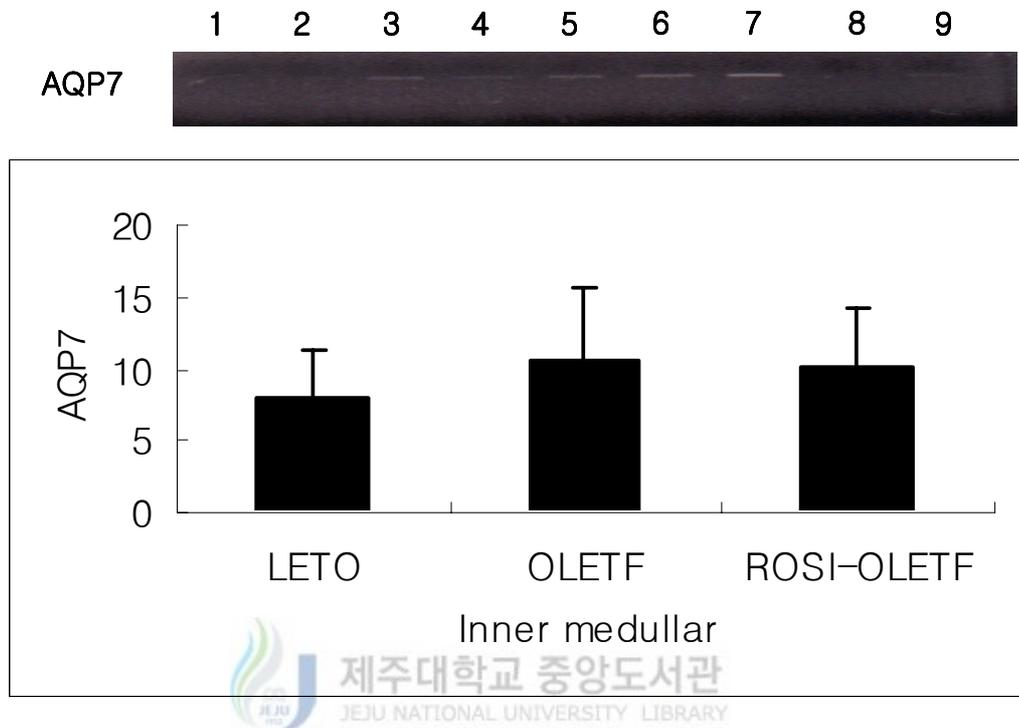


Figure 26. AQP7 mRNA expression levels in the renal inner medullar tissue. The expression levels were corrected by dividing with β -actin mRNA expression levels as the internal control. The lanes as follows : 1-3; LETO, 4-6; OLETF, 7-9; ROSI-OLETF.

Table 3. Summary of rosiglitazone effects on the expression of AQPs and GyK in ROSI-OLETF

		<u>AQP2</u>	<u>AQP3</u>	<u>AQP7</u>	<u>AQP9</u>	<u>GyK</u>
		(C, T)	(C, T)	(C, T)	(C, T)	(C, T)
Liver			+ +	- -	+ +	+ +
Fat	Mesenteric		+ +*	+ +*	- -	+ +*
	Epididymal		+ +	+ +	- -	+ +*
Kidney	Cortex		+ +	+ +	- -	+ +
	Outer medullar		+ +	+ +*	+ +	+ +
	Inner medullar			+ +	- -	+ +

+; mRNA expression, -; non-expression, * $P < 0.05$

C; control (OLETF) T; treatment (ROSI-OLETF)

IV. 고 찰

지방조직은 단순히 칼로리를 초과 섭취하면 중성지방의 형태로 저장되고 필요할 때 에너지 소모를 도와주는 조직으로만 생각되어 왔다. 그러나 비만 환자에서 다양한 대사성 질환에 대한 이병율이 증가 된다는 사실은 지방세포에서 여러 adipocytokines의 분비와 관련이 있는 것으로 알려지고 있어 최근에는 지방조직이 내분비 기관으로서 다양한 호르몬 매개체를 분비하여 인슐린 저항성을 유발한다고 보고 되어 있다 (Ashima *et al.*, 2000). 특히 복부지방 축적과 인슐린 저항성이 밀접한 연관성을 보이는 것은 연구들에 의해 확인되었고 (Bjontorp, 1988; Kissebah, 1994), 이는 복부비만과 제2형 당뇨병 및 관상동맥 질환을 잇는 중요한 연결고리로 이해되고 있다 (Kissebah, 1994; Abate, 2000). 그러나 비만과 제2형 당뇨병 사이의 기전에는 아직도 많은 의문점들이 남아있다.

지방조직에서는 다양한 생리적인 조건과 제한된 음식섭취 또는 물리적인 운동에 의해 중성지방이 유리지방산과 글리세롤로 분해된다 (Ramsay, 1996). 특히 복부비만에서 많은 양의 유리지방산이 간으로 유입되면, 간에서 중성지방이 합성되어 지방간에 이르며, 고중성지방혈증 (hypertriglyceridemia)를 만든다 (Baynes *et al.*, 1991; Large, 1998). 금식 상태의 간에서 일어나는 포도당 생성의 50-90%는 글리세롤을 기질로 이용한다. 그러나 많은 양의 글리세롤이 간으로 유입되면 지방이 쌓이고, 비만인 경우에 당뇨병으로 발전된다 (Baba *et al.*, 1995).

분자적인 관점에서, 글리세롤을 분비하고 받아들이는 과정에 AQP에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. AQP은 동식물 뿐만 아니라 미생물에서도 존재하는 막통로 (water-selective membrane channel)로서 세포막에서 선택

적 수분 투과성에 관여한다. 현재까지 발견된 AQP은 기능적 연구를 통해 크게 두 그룹으로 분류할 수 있다. 즉 선택적 수분통로인 AQP과 수분 뿐만 아니라 글리세롤, 요소 등의 세포막 투과에 관여하는 Aquaglyceroporin이 그것인 바 AQP3, -7, -9, -10이 Aquaglyceroporin에 속한다 (Agre and Kozono, 2003). 본 연구에서는 제2형 당뇨병 치료약제인 rosiglitazone이 OLTEF 쥐에서 AQP2, AQP3, AQP7, AQP9의 발현양상에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다.

우선 사람의 간암 세포주인 HepG2 세포에서 AQP9이 당뇨병 치료에 쓰이는 다양한 약제에 대하여 어떠한 발현 양상을 보이는지 조사하였다. AQP9은 간에서 특이하게 발현되는 글리세롤 채널로 알려져 있다 (Kuriyama *et al.*, 2002). HepG2 세포에 insulin을 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1000 nM의 농도로 처리했을 때 10 nM의 농도에서 AQP9의 발현이 가장 증가되었고 100 nM과 1000 nM의 농도에서는 현저히 감소함을 보였다 (Figure 1). Kuriyama 등 (2002)에 의하면 간에 특이적으로 존재하는 글리세롤 채널인 AQP9과 지방에 특이적으로 존재하는 AQP7은 동시에 조절되며, AQP9 유전자의 promoter 부위에는 insulin response element (IRS)가 존재하며 이 부위를 통해 인슐린에 대한 음성적 조절이 이루어진다고 보고하였다. 본 실험에서 글리세롤의 농도 변화에 따른 AQP9 발현 (Figure 2)의 차이는 없었지만 고농도의 인슐린 (100 nM과 1000 nM) 처리시 AQP9의 발현이 감소하였다 (Figure 1). 이는 HepG2 세포에서도 AQP9 유전자 발현이 IRS에 의해 음성적 조절이 이루어진 결과라 사료된다.

지방조직에서 중성지방의 분해산물인 글리세롤이 AQP7에 의해 방출되면 간에서 AQP9에 의해 유입되며, 인슐린에 의해 음성적 조절된다. 그러나 인슐린 저항성인 상태에서는 지방에서 AQP7에 의해 글리세롤을 많이 방출하고 간에는 AQP9에 의해 글리세롤을 많이 받아들여 포도당을 많이 합성하게 된다 (Kuriyama *et al.*, 2002). 그리고 혈중에 유리지방산의 증가는 인슐린 저항

성과 밀접한 관계가 있다. Figure 5에서 보는 바와 같이 HepG2 세포에서 OA에 의한 AQP9 발현이 0.5 mM까지는 농도 의존적으로 증가하였으나 0.75 mM에서는 현저히 그 발현이 감소하였다. 본 실험에 사용된 OA가 세포막에서 콜레스테롤을 방출시키는 methyl- β -cyclodextrin으로 맞추어진 특성에 의해 현저한 발현 양상을 보였음을 지용성 OA를 처리하여 확인 되었다. 따라서 HepG2 세포에서 유리지방산에 의한 AQP9 발현 증가가 간의 인슐린 저항성과 관련한 설명에는 미흡하다.

Thiazolidinedione (TZD) 계열의 인슐린 저항성 개선제인 rosiglitazone과 wy14643은 작용기전이 서로 다르다 (Patsouris *et al.*, 2004). 본 실험에서는 PPAR γ 리간드인 rosiglitazone이 HepG2 세포에서 100 μ M에서 증가시키는 양상을 보였다. 그리고 wy14643은 50 μ M에서 AQP9 발현이 가장 증가하였다. 이는 간세포에는 PPAR α 인자가 많이 존재하는 데 그 핵수용체인 PPAR α 리간드인 wy14643이 rosiglitazone 보다 적은 농도에서 AQP9 발현이 증가함은 실제 간 세포에서도 PPAR α 또는 PPAR γ 리간드는 각각 다르게 작용할 것임을 추측할 수 있다.

동물실험에 사용한 rosiglitazone은 OLTEF 쥐에서 인슐린 저항성을 현저히 개선시켰다 (Table 2). rosiglitazone과 같은 TZD 계열의 약제인 troglitazone은 Obese Zucker Rats에서 전체 지방조직의 양에는 변화가 없지만 작은 지방세포의 수를 증가시킨다 (Okuno *et al.*, 1998). 그리고 troglitazone은 중성지방을 감소시키지만 rosiglitazone은 별 영향을 주지 않는다 (Leslie *et al.*, 2001). 본실험에서 rosiglitazone은 OLTEF 쥐의 체중을 약간 증가시켰다 (Table 2). 그리고 Guan (2002) 등에 의하면 TZD 계열의 약제가 유리지방산의 순환을 감소시켜 골격근 또는 인슐린의 표적이 되는 조직에서 인슐린의 작용을 저해한다고 보고 하였다. 또한 TZD, 즉 PPAR γ 리간드는 지방세포에서 GyK 유전자의 발현을 증가시킨다고 했다. 이것은 지방세포에서는 GyK 유전자 활성이 거의 없어서 지방세포에서 중성지방이 분해되

고 글리세롤과 유리지방산으로 부터 재합성하는 불필요한 회로를 피한다는 일반적인 사실과 대조된다. TZD에 의해 GyK 유전자가 활성화되어 글리세롤을 중성지방으로의 합성을 촉진시키고 지방세포로부터 유리지방산의 분비를 감소시킨다. 이것은 TZD 계열의 약제가 인슐린 저항성을 개선시켜 혈중 유리지방산의 농도를 감소시킨 효과에 의한 것이다 (Guan *et al.*, 2002).

본 실험에서도 rosiglitazone에 의해 장간막 지방과 고환주위의 지방에서 GyK 유전자 발현이 유의하게 증가함을 보였다 (Figure 13과 16). 그리고 글리세롤을 방출하는 AQP7 유전자의 발현은 장간막 지방에서만 유의적인 증가를 보였다 (Figure 11). PPAR γ 리간드에 의해 유리지방산이 감소되고 글리세롤의 방출이 증가됨은 복부지방에서 PPAR γ 리간드에 대한 반응이 더 크다는 것을 알 수 있다 (Tordjman *et al.*, 2003).

Aquaporin adipose (AQPap)는 사람의 지방에 존재하는 글리세롤 채널로서 현재까지 3개의 AQPap 유사 유전자 (~95%)가 발견되었으며 사람에서는 그 발현이 약하다고 알려져 있다 (Kondo *et al.*, 2002). 그러나 본 실험에서는 두 지방에서 AQP3 유전자가 AQP7과 유사한 양상으로 발현됨을 확인했다 (Figure 11과 12). 또한 사람에서 AQPap와 AQP3 유전자는 같은 염색체에서 매우 가까운 위치 (Chr 9p13.3-p21.1)에 존재 한다고 밝혀졌다. 본 실험에서 발현된 AQP3 유전자를 분석해 본 결과 AQP7 유전자와는 달랐으나, AQP3 유전자의 1/3 정도만 분석했기 때문에 전체 유전자에 대한 비교 분석 등의 추가 정보가 요구된다.

본 실험에서 rosiglitazone에 의해 지방에서 GyK, AQP3 과 AQP7 유전자의 발현이 유의하게 증가되었지만, 간에서는 GyK, AQP3 과 AQP9 유전자 발현에 유의적인 차이는 없었다. 이것은 PPAR γ 리간드가 지방세포에서 글리세롤 대사를 조절하는 반면 PPAR α 리간드인 wy14643은 간에서 GyK를 활성화시키고 AQP3 과 AQP9에 의해 글리세롤 대사가 조절 된다고 설명할 수 있다 (Patsouris *et al.*, 2004). 다양한 당뇨병 모델 동물에서 PPAR α 리간드는

포도당 생성을 감소시키거나 소비를 촉진시킴으로써 포도당 항상성을 개선시키며 (Chou 2002), 최근에는 포도당 생성 유전자인 phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)와 포도당 6-인산 (glucose 6-phosphatase)이 dexamethasone에 의해 유도되는 것은 PPAR α 에 의존한다는 보고가 있다 (Bernal 2003). 그러나 PEPCK와 glucose 6-phosphatase는 PPAR α 에 직접적으로 관련하는 유전자는 아니다 (Patsouris *et al.*, 2004). 따라서 PPAR α 조절 기작에 대해선 아직도 많은 부분이 밝혀져야 할 것이다.

PPAR γ 리간드 역시 제2형 당뇨병 치료제로서 효과적으로 사용되지만 체액의 보유와 부종과 관계가 있다. 그 원인에 대해서는 아직 알려진 바 없다. Song 등 (2004)은 rosiglitazone이 신장에서 나트륨과 물의 재흡수 되는 경로를 촉진시키고, 정상 쥐에서 혈압을 낮게 하는 효과가 있다고 했다. 또한 전체 신장 조직에서 AQP1, AQP2, AQP3을 immunoblots한 결과 AQP1은 rosiglitazone에 의한 효과가 별로 없었지만 AQP2와 AQP3은 신장의 피질과 외질 부위에서 현저한 발현 증가를 보인다고 했다.

본 실험에서는 전체 신장에서 AQP3의 발현은 rosiglitazone을 먹인 OLTEF 쥐에서 증가함을 보였지만 정상 비만쥐 (LETO) 보다는 낮은 발현을 보였다. 그러나 신장의 피질과 외질 부위 막단백질에서의 AQP3은 rosiglitazone을 먹인 OLTEF 쥐에서 그 발현이 유의적인 증가를 보였다. 그리고 신장 외질부위의 막단백질에서 AQP2 발현에는 별 영향을 주지 않았다. 본 실험에서는 rosiglitazone을 1mg/100g을 2주 간 투여하였고, Song 등 (2004)은 rosiglitazone을 94mg/kg의 양을 3일 간 투여한 결과이다. 따라서 rosiglitazone 투여량에 의해 AQP2와 AQP3 발현 양상에 영향을 줄 수 있다고 사료된다.

신장에서는 AQP1, AQP2, AQP3, AQP4, AQP7, AQP8이 발현된다 (Nielsen *et al.*, 2002). AQP2와 AQP3은 오줌을 만드는데 필수적으로 관여하며, AQP7과 AQP8은 수분 재흡수에 관여하여 체내 물의 항상성을 조절한다

(Nielsen *et al.*, 2002). 본 실험에서 신장의 AQP7 mRNA 발현은 rosiglitazone에 의해 거의 영향을 받지 않았으며 (Figure 24) 신장의 피질부위에서 수질부로 갈수록 낮은 발현 양상을 나타내었다 (Figure 26). AQP7은 주로 신장의 피질과 외질 부위에 존재하여 수분 재흡수에 관여하는 것으로 사료된다.

최근 생쥐와 사람에서 AQP1이 세뇨관에서의 역할이 확인 되었는데 AQP1의 결실(deletion)에 의해 당뇨병의 원인이 되며 기저막과 하행지 혈관에서 수분 투과력을 감소시킨다고 보고 하였다 (Ma, *et al.*, 1998).

신장의 주 기능은 사구체를 통하여 체액을 (~180 l/day) 오줌 (~1 l/day)으로 만드는 것이다. 이런 과정에서 AQPs의 기능은 필수적이다 (Agre and Kozono 2003). 따라서 체액의 균형 또는 불균형에 의한 AQPs의 생리적, 병리학적인 기능에 대한 분자적 관점에서 지속적인 연구가 절실히 요망된다.

본 실험에서는 rosiglitazone이 OLTEF 쥐의 인슐린 저항성을 개선시킴을 확인하였고, 분자적 관점에서 AQPs 발현을 보았다. 그리고 rosiglitazone의 부작용인 체중 증가와 부종 원인을 일부 설명할 수 있는 근거를 AQP과 GyK 관점에서 기초 자료로 제시할 수 있다고 사료된다.

V. 참 고 문 헌

- Abate N., 2000. Obesity and cardiovascular disease-Pathogenic role of the metabolic syndrome and therapeutic implications. *Journal of Diabetes and Its Complications*. **14**: 154-174.
- Agre P. and D. Kozono, 2003. Aquaporin water channels : *molecular mechanisms for human diseases*. *FEBS Letters* **555**: 72-78.
- Agre P., S. Sasaki and M. J. Chrispeels, 1993. Aquaporins: a family of water channel proteins. *Am. J. Physiol. Renal. Fluid. Electrolyte. Physiol.* **265**: F461.
- Ashima R. S. and J. S. Flier, 2000. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol. Metabol.* **11**: 372-332.
- Baba H., X. J. Zhang and R. R. Wolfe, 1995. Glycerol gluconeogenesis in fasting human. *Nutrition* **11**: 149-153.
- Baynes C., A. D. Henderson, C. L. Hughes, W. Richmond, D. G. Johnston and R. S. Elkeles, 1991. Determinants of mild fasting hypertriglyceridaemia in non-insulin-dependent diabetes. *J. Intern. Med.* **229**: 267-273.

- Bernal M. C., 2003. Dexamethasone induction of hypertension and diabetes is PPAR-alpha dependent in LDL receptor-null mice. *Nat. Med.* **9**:1069-1075.
- Bjöntorp P., 1988. Abdominal obesity and the development of noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metabol. Rev.* **4**: 615-622.
- Calamita G., M. Amelia, B. Antonella and S. Maria, 2001. Possible involvement of aquaporin-7 and -8 in rat testis development and spermatogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**: 619-625.
- Chou C. J., M. Haluzik, C. Gregory, K. R. Dietz, C. Vinson, O. Gavrilova and M. L. Reitman, 2002. Wy14643, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) agonist, improves hepatic and muscle steatosis and reverses insulin resistance in lipoatrophic A-ZIP/F-1 mice. *J. Biol. Chem.* **277**: 24484-24489.
- Damiano A., E. Zotta, J. Goldstein, I. Reisin and C. Ibarra, 2001. Water channel proteins AQP3 and AQP9 are present in syncytiotrophoblast of human term placenta *Placenta* **22**: 776-781.
- Deen P. M., M. A. Verdijk, N. V. Knoers, B. Wieringa, L. A. Monnens, C. H. Van os and B. A. Van oost, 1994. Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine. *Science* **264(5155)** : 92-95

DeFronzo R. A. and E. Ferrannini, 1991. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* **14**:173-194.

DeFronzo R. A., 1997. Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular complications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev.* **5**: 177-269.

Ferre P., 2004. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes* **53(Suppl 1)**: S43-S50.

Fonseca V., J. Rosenstock, R. Patwardhan and A. Salzman, 2000. Effect of metformin and rosiglitazone combination therapy in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial. *JAMA* **283**: 1695-1702.

Gulick T., S. Cresci, T. Caira, D. D. Moore and D. P. Kelly, 1994. The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 11020-11016.

Guan H. P., Li, Y., Jensen, M. V., Newgard, C. B., Stepan, C. M. and M. A. Lazer, 2002. A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nat. Med.* **8**: 1122-1128.

- Hirashima T., K. Kawano, S. Mori, K. Matsumoto and T. Natori, 1995. A diabetogenic gene(ODB-1) assigned to the X-chromosome in OLETF rats. *Diabetes Res. Clin Pract.* **27**: 91-96.
- Hirashima T., K. Kawano,, S. Mori, K. Matsumoto and T. Natori, 1996. A diabetogenic gen, ODB2, identified on chromosome 14 of the OLETF rat and its synergistic action with ODB1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **224**: 420-425.
- Huebert R. C., P. L. Splinter, F. Garcia, R. A. Marinelli and N. F. LaRusso, 2002. Expression and localization of aquaporin water channels in rats hepatocytes. *J. Bio. Chem.* **277** : 22710- 22717.
- Kim J. K., J. K. Wi and J. H. Youn, 1996. Metabolic impairment precedes insulin resistance in skeletal muscle during high-fat feeding in rats. *Diabetes* **45**: 651-658.
- Kim C. H., M. S. Kim, J. Y. Youn, H. S. Park, H. S. Song, K. H. Song, J. Y. Park and K. U. Lee, 2003. Lipolysis in skeletal muscle is decreased in high-fat-fed rats. *Metabolism* **52**: 1586-1592.
- Kim Y. B., S. E. Nikoulina, T. P. Ciaraldi, T. P. Henry, R. R. Henry and B. B. Kahn, 1999. Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* **104**: 733-741.

Kishida K., H. Kuriyama, T. Funahashi, I. Shimomura, S. Kihara, N. Ouchi, M. Nishida, H. Nishizawa, M. M. Takahashi, K. Hotta, T. Nakamura, S. Yamashita, Y. Tochino and Y. Matsuzawa, 2000. Aquaporin adipose, a putative glycerol channel in adipocytes. *J. Biol. Chem.* **275**: 20896-20902.

Kishida K., I. Shimomura, H. Kondo, H. Kuriyama, Y. Makino, H. Nishizawa, N. Maeda, M. Matsuda, N. Ouchi, S. Kihara, Y. Kurachi, T. Funahashi and Y. Matsuzawa, 2001. Genomic Structure and Insulin-mediated Repression of the Aquaporin Adipose(AQPap), Adipose-specific Glycerol Channel. *J. Biol. Chem.* **276**: 36251-36260.

Kissebah A. H. and G. R. Krakower, 1994. Regional adiposity and morbidity. *Physiol. Rev.* **74**: 761-811.

Klein S., O. B. Holland, and R. R. Wolf, 1990. Importance of blood glucose concentration in regulating lipolysis during fasting in humans. *Am. J. Physiol.* **258**: E32-E39.

Kondo H., I. Shimomura, K. Kishida, H. Kuriyama, Y. Makino, H. Nishizawa, M. Matsuda, N. Maeda, H. Nagaretani, S. Kihara, Y. Kurashi, T. Nakamura, T. Funahashi and Y. Matsuzawa, 2002. Human aquaporin adipose (AQPap) gene. Genomic structure, promoter analysis and functional mutation. *Eur. J. Biochem.* **269**: 1814-1826.

Kuriyama H., I. Shimomura, K. Kishida, H. Kondo, N. Furuyama, H. Nishizawa, N. Maeda, M. Matsuda, H. Nagaretani, S. Kihara, T. Nakamura, Y. Tochino, T. Funahashi and Y. Matsuzawa, 2002. Coordinated regulation of fat-specific and liver-specific glycerol channels, aquaporin adipose and aquaporin 9. *Diabetes* **51**: 2915-2921.

Kuriyama H., S. Kawamoto, N. Ishida, I. Ohno, S. Mita, Y. Matsuzawa, K. Matsubara and K. Okubo, 1997. Molecular Cloning and Expression of a Novel Human Aquaporin from Adipose Tissue with Glycerol Permeability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241**: 53-58

Landon S. K. and M. Yasui, 2002. Aquaporins and disease : lessons from mice to humans. *TRENDS in Endocrinology & Metabolism* **13**: 355-360.

Lamb R. G., J. C. Koch and S. R. Bush, 1993. An enzymatic explanation of the differential effects of oleate and gemfibrozil on cultured hepatocyte triacylglycerol and phosphatidylcholine biosynthesis and secretion. *Biochim. Biophys. Acta* **165**: 299-305.

Large V. and P. Arner, 1998. Regulation of lipolysis in humans : pathophysiological modulation in obesity, diabetes, and hyperlipidaemia. *Diabetes Metab.* **24**: 409-418.

- Lee H. K. 1999. Evidence that the mitochondrial genome is the thrifty genome. *Diabetes. Res. Clin. Pract.* **45(2-3)**: 127-135.
- Lee K. U., H. K. Lee, C. S. Koh and H. K. Min, 1988. Artificial induction of intravascular lipolysis by lipid-heparin infusion leads to insulin resistance in man. *Diabetologia* **31**: 285-290.
- Leslie J., J. DeGroot and L. Jameson, 2001. Thiazolidinediones in endocrinology(4th ed), **58**: 826-827.
- Ma T., Y. Song, B. Yang, A. Gillespie, E. J. Carlson, C. J. Epstein and A. S. Verkman, 2000. Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking aquaporin-3 water channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** 4386-4391
- Matsuzaki T., Y. Tajika, N. Tserentsoodol, T. Suzuki, T. Aoki, H. Hagiwara and K. Takata, 2002. Aquaporins : a water channel family. *Anat. Sci. Int.* **77**: 85-93.
- Maragoudakis M. E. and H. Hankin, 1971. On the mode of action of lipid-lowering agent. V. kinetics of the inhibition in vitro of rat acetyl coenzyme A carboxylase. *J. Biol. Chem.* **246**: 348-358.
- Nielsen S., J. Frokiaer, D. Marples, T. H. Kwon, P. Agre and M. A. Knepper, 2002. Aquaporins in the kidney : From Molecules to Medicine. *Physiol. Rev.* **82** :205-244.

Okuno A., H. Tamemoto, K. Tobe, K. Ueki, Y. Mori, K. Iwamoto, K. Umesono, Y. Akanuma, T. Fujiwara, H. Horikoshi, Y. Yazaki and T. Kadowaki, 1998. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in Obese Zucker Rats. *J. Clin. Invest.* **101**: 1354-1361.

Park K. S., S. K. Kim, M. S. Kim, E. Y. Cho, J. H. Lee, K. U. Lee, Y. K. Park and H. K. Lee, 2003. Fetal and early postnatal protein malnutrition cause long-term changes in rat liver and muscle mitochondria. *J. Nutr.* **133**: 3085-3090.

Patsouris D., S. Mandard, P. J. Voshol, P. Escher, N. S. Tan, L. M. Havekes, W. Koenig, W. Marz, S. Tafuri, W. Wahli, M. Muller and S. Kersten, 2004. PPAR α governs glycerol metabolism. *J. Clin. Invest.* **114**: 94-103.

Petersen K.F., D. Befroy, S. Dufour, J. Dziura, C. Ariyan, D. L. Rothman, L. Dipietro, G. W. Cline and G. I. Shulman, 2003. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* **16**; **300(5622)**: 1140-1142.

Petersen K.F., S. Dufour, D. Befroy, R. Garcia and G. I. Shulman, 2004. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* **12**; **350(7)**: 664-671.

- Ramsay T. G., 1996. Fat cells. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* **25**, 847-870.
- Randle P. J., P. B. Garland, C. N. Hales and E. A. Newsholm, 1963. The glucose-fatty acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* **1**:785-789,
- Reaven G., 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* **37**: 1595-1607.
- Saltiel A. R. and J. M. Olefsky, 1996. Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetes* **45**: 1661-1669.
- Song J., M. A. Knepper, X. Hu, J. G. Verbalis and C. A. Ecelbarger, 2004. Rosiglitazone Activates Renal Sodium- and Water-Reabsorptive Pathways and Lowers Blood Pressure in Normal Rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **308**: 426-433
- Strange K. and K. R. Spring, 1987. Cell membrane water permeability of rabbit cortical collecting duct. *J. Membr. Biol.* **96(1)** : 27-43.
- Tordjman J., W. Khazen, B. Antoine, G. Chauvet, J. Quette, F. Fouque, E. G. Beale, C. Benelli and C. Forest, 2003. Regulation of glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase by fatty acids, retionic acids and thiazolidinediones : potential relevance to type 2 diabetes. *Biochimie.* **85**: 1213-1218.

- Tsubota K., S. Hirai, L. S. King, P. Agre, N. Ishida, 2001. Defective cellular trafficking of lacrimal gland aquaporin-5 Sjogren's syndrome. *Lancet*. **357**: 688-689.
- Tsukaguchi H., C. Shayakul, U. V. Berger, B. Mackenzie, S. Devidas, W. B. Guggino, A. Van Hoek and M. A. Hediger, 1998. Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel. *J. Biol. Chem.* **273**: 24737-24743.
- WHO Western Pacific Region. 2000. The asian-pacific perspective: Redefining obesity and its treatment.
- Wright K. S., H. Beck-Nielsen, O. G. Kolterman and L. J. Mandarino, 1998. Decreased activation of skeletal muscle glycogen synthase by mixed-meal ingestion in NIDDM. *Diabetes* **37**:436-446.
- Yang B., A. Gillespie, E. J. Carlson, C. J. Epstein and A. S. Verkman, 2001 . Neonatal mortality in an aquaporin-2 knock-in mouse model of recessive nephrogenic diabetes insipidus *J. Biol. Chem.* **276** :2775-2779.
- Yasui M., T-H Kwon, M. A. Knepper, S. Nielsen and P. Agre, 1999. Aquaporin-6: An intracellular vesicle water channel protein in renal epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 5808-5813.

Zhou G., R. Myers and Y. Li, 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* **108(8)**: 1167-1174.



요 약

대사증후군에서 AQP의 조절을 설명하기 위하여, 당뇨병 모델쥐 (OLETF)에서 rosiglitazone의 효과와 관련하여 AQP의 유전자의 발현을 분석하였다. 사람의 간암 세포주 (HepG2 cell)에서 insulin, rosiglitazone, wy14643, oleic acid, eicosapentanoic acid, metformin을 처리하여 immunoblot 방법으로 AQP9단백질 발현을 확인 하였다. 그리고 OLETF쥐에게 rosiglitazone을 먹인 후 체중은 대조구 보다 rosiglitazone을 먹인 OLETF쥐의 그룹이 증가하였다. 고인슐린혈증 또한 대조구 (LETO) 보다 현저한 호전을 보였다. aquaglyceroporin 과 glycerol kinase (GyK)의 역할을 간, 지방 (장간막, 고환 주위) 그리고 신장 (피질, 외질, 수질부위)에서 RT-PCR방법에 의해서 aquaglyceroporin-AQP3, AQP7, AQP9 와 GyK를 세 그룹 (LETO, OLETF, rosiglitazone을 먹인 OLETF)에서 분석하였다. 그 결과 GyK의 유전자 발현은 rosiglitazone을 먹인 OLETF쥐 그룹에서 대조구 보다 더 높게 나타났다. 그리고 AQP3, AQP7의 발현은 장간막 지방에서 rosiglitazone을 먹인 OLETF 쥐 그룹에서 대조구 보다 더 높게 나타났으나, 고환주위의 지방에서는 세 그룹에서 차이가 없었다. 간에서 AQP9 과 GyK는 rosiglitazone을 먹인 OLETF 쥐 그룹에서 약간 증가하는 경향을 보였으며. 신장에서는 세 그룹 (LETO, OLETF, rosiglitazone을 먹인 OLETF)에서 AQP7과 GyK의 유전자 발현이 유의적인 차이가 없었다.

이상의 결과들에서 rosiglitazone은 지방조직에서 aquaglyceroporin 과 glycerol kinase의 유전자 발현 조절에 관여하여, 글리세롤 대사 경로의 중요한 역할을 한다고 추정할 수 있다. 그리고 rosiglitazone을 먹인 OLETF 쥐의 신장에서 AQP3의 발현 증가는 신장에서 체액 보유와 관련이 있다고 설명할 수 있다.

감사의 글

본 논문을 완성하는데 도움을 주신 많은 분들께 이 지면을 통해 감사의 마음을 전합니다.

먼저 긴 시간 동안 학문의 끈을 이을 수 있도록 이끌어 주신 오문유 교수님께 감사드립니다. 지금 생각해 보면 지도교수님은 저의 든든한 후원자였던 것 같습니다.

본 논문의 실험을 할 기회를 주신 의과대학 이대호 교수님께 진심으로 감사의 마음을 전합니다. 또한 의과대학 조직학 교실에서 실험할 수 있도록 기꺼이 배려해 주신 이영기 교수님, 실험을 수행하는데 많은 도움을 주신 박덕배 교수님께 깊은 감사의 마음을 전합니다.

바쁘신 가운데 에서도 미흡한 논문을 세심하게 심사해 주신 김세재 교수님, 김원택 교수님, 제주 교육대학의 홍승호 교수님, 그리고 제주하이테크 산업진흥원의 김기욱 팀장님께 깊은 감사의 마음을 전합니다.

많은 시간이 지난 것 같은데 여전히 같은 열정으로 학문에 정진하시는 우리과 이용필 교수님, 오덕철 교수님, 김문홍 교수님, 이화자 교수님, 고석찬 교수님께 감사의 마음을 전합니다

실험동물 사육에 도움을 주신 식품영양학과 강정숙 교수님 그리고 학생들에게도 감사의 마음을 전합니다.

의과대학 조직학교실에서 실험하는 동안 많은 도움을 주신 강신해 선생님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 송지훈 후배에게 고마움을 전합니다. 또한 기생충학 교실을 귀찮게 들락거려도 항상 반겨주신 정영배 교수님, 그리고 김지영 후배에게도 감사드립니다.

처음 실험을 시작하는 것과 다름없는 저에게 많은 용기와 도움을 주신 김영미, 임희경, 강윤석 연구원을 비롯한 여러 연구원 선생님들, 대학원생 안춘산 선생님, 의과대학 조교선생님들, 그리고 여러 교수님들께 진심으로 고마움

을 전합니다.

격려와 도움을 아끼지 않은 정용환 박사, 한상현 박사 그리고 오주형 후배, 강민철 후배 그리고 학부생 후배들에게 감사의 마음을 전합니다. 또한 멀리서 기뻐해 주시는 고미희 언니에게 깊은 감사를 드립니다

어느새 세 아이의 엄마가 되어버린 제가 일을 할 수 있었던 것은 한적한 시골길 길목에 서 있는 고목과 같은 부모님이 계셨기에 가능했던 것 같습니다. 밤이나 낮이나 눈이 많이 쌓인 날이나 언제나 한걸음에 달려오셔서 기꺼이 아이들을 돌봐주신 어머님께 어찌 감사함을 다할 수 있겠습니까? 부모님께 든든한 자식이 되도록 노력하겠습니다.

마음속으로 큰 박수를 보내주신 서귀포 아버지 항상 마음으로 도와주신 어머니, 그리고 언니 동생 가족들에게 고마운 마음을 전합니다.

가까이는 없지만 가족이란 끈으로 묶여있어 항상 든든한 효진이네, 수연이네, 수빈이네, 그리고 막내 지호네에게 감사의 마음을 전합니다.

끝으로 든든한 큰딸 유진, 언니 동생에게 항상 양보하는 예쁜 유나, 그리고 건강하게 자라는 한구, 이제 같은 방향으로 서로 격려하고 위로하며 나아가갈 남편에게 감사드리며, 이 조그만 결실을 함께하고 싶습니다.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY