



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

생활과학석사학위논문

비만 마우스에서
식이변화로 유도된 체지방량 감소가
비타민 D 대사에 미치는 영향

**The effect of fat mass reduction in obese mice
induced by diet modulation on vitamin D metabolism**

2016 년 8 월

서울대학교 대학원

식품영양학과

정 영 선

국 문 초 록

비만 마우스에서 식이변화로 유도된 체지방량 감소가 비타민 D 대사에 미치는 영향

서울대학교 대학원

식품영양학과

정 영 선

고지방 식이로 유도된 비만에서 주요 비타민 D 대사체인 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D)와 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25(OH)₂D)의 조절 이상이 관찰되었다. 본 연구에서는 이와 같은 비타민 D 대사의 변화가 식이 조절을 통한 체지방량 감소에 따라 회복될 수 있는지에 대하여 연구하였다. 5 주령의 C57BL/6 마우스를 식이 유형에 따라 세 군으로 임의배정 하였다. LL 군은 열량의 10%를 지방으로 공급하는 대조 식이를 31 주간 섭취하였고, HH 군은 열량의 60%를 지방으로 공급하는 고지방 식이를 31 주간 섭취하였으며, HL 군은 처음 15 주는 고지방 식이를 섭취하다가 이후 16 주 동안은 대조 식이로 변경하여 섭취하였다. 희생

후 비타민 D 대사체와 비타민 D 조절에 관여하는 호르몬의 양을 효소면역 분석 방법으로 측정하였고 간과 신장 조직에서 비타민 D 대사에 관여하는 유전자의 발현량을 real time PCR 로 측정하였다. 신장에서 1,25(OH)₂D 를 생성하는 1-hydroxylase 단백질 수준을 Western blot 으로 측정하였다. HL 군의 체중과 체지방량은 HH 군보다 유의적으로 낮았으며 LL 군에 근접한 수준이었다. 혈청 1,25(OH)₂D 농도는 LL 군에 비해 HH 군에서 유의적으로 높았으며, HL 군의 1,25(OH)₂D 농도는 HH 군의 1,25(OH)₂D 농도의 71% 수준으로 낮았다. 혈청 parathyroid hormone (PTH) 농도는 군 간 차이가 유의적인 수준에는 미치지 않았으나 경향성이 있었으며 ($P = 0.055$), 체지방량과 유의적인 양의 상관관계가 있었다 ($r = 0.622$). 신장의 1-hydroxylase (*Cyp27b1*) mRNA 수준은 LL 군과 HL 군에 비해 HH 군에서 유의적으로 높았다. 신장의 24-hydroxylase (*Cyp24a1*) mRNA 수준은 유의적인 차이가 없었으나 신장의 vitamin D receptor (*Vdr*) mRNA 수준과 유의적인 양의 상관관계가 있었다 ($r = 0.636$). 혈청 25(OH)D 와 간의 25-hydroxylase mRNA 수준에는 유의적인 차이가 관찰되지 않았다. 25(OH)D 를 재흡수하는 신장의 megalin (*Lrp2*) mRNA 수준은 군간 차이가 유의적인 수준에는 미치지 못하였으나 경향성이 있었으며 ($P = 0.071$), 체지방량과 유의적인 음의 상관관계를 나타내었다 ($r = -0.538$). 이와 같은 결과에 근거하였을 때 식이변화에 의해 체지방량이 감소하면 고지방 식이로 유도된 비만에서 나타난 비타민 D 대사 변화가 일부 회복될 수 있음을 확인하였다.

주요어: 비만, 식이변화, 체지방 감소, 비타민 D, 부갑상샘 호르몬

학 번: 2014-20361

목 차

국문 초록.....	i
목 차.....	iv
표 목 차.....	vi
그림 목 차.....	vii
약어 목록.....	viii
I. 서 론.....	1
II. 문헌 고찰.....	4
1. 비만과 비타민 D	4
2. 비타민 D의 대사 과정	7
3. 1,25-dihydroxyvitamin D의 조절.....	1 2
4. Vitamin D receptor	1 4
5. 체중 조절에 의한 비타민 D 대사 변화.....	1 6
III. 연구 방법.....	1 8
1. 실험 동물	1 8
2. 실험식이	2 1
3. 혈액 분석	2 3
4. 조직 내 RNA 추출, cDNA 합성 및 real-time PCR.....	2 9
5. 단백질 추출 및 Western blot analysis	3 2

6. 통계분석	3 4
IV. 실험 결과	3 5
1. 체중과 체지방량 변화	3 5
2. 혈액 분석 결과	3 8
3. 간 조직의 25-hydroxylase mRNA 수준	4 1
4. 신장 조직의 <i>Lrp2</i> mRNA 수준	4 3
5. 신장 조직의 1,25-dihydroxyvitamin D 조절	4 5
V. 고 찰	4 8
VI. 요약	5 3
참 고 문 헌	5 5
Abstract	6 3

표 목 차

Table 1. Composition of the experimental diets	2 2
Table 2. Primer Sequences for quantitative real-time PCR.....	3 1
Table 3. Body weight, weight change, fat mass, and lean mass of LL, HL, and HH groups.....	3 6

그림 목차

Figure 1. The metabolic pathway for vitamin D ¹ (Kitson and Roberts 2012)	1 1
Figure 2. Genomic mechanism of calcitriol action through the VDR ¹ (Feldman et al. 2014)	1 5
Figure 3. The experimental design	2 0
Figure 4. Body weight at 31 st week (A) and fat mass at 30 th week (B).....	3 7
Figure 5. Serum levels of 25(OH)D (A), 1,25(OH) ₂ D (B), PTH (C), and FGF23 (D).....	3 9
Figure 6. Correlation between serum 1,25(OH) ₂ D (A) or PTH (B) and body fat mass	4 0
Figure 7. Hepatic mRNA levels of vitamin D 25-hydroxylases	4 2
Figure 8. <i>Lrp2</i> mRNA levels in the kidney tissues (A), and correlation between <i>Lrp2</i> mRNA expression and fat mass at 30 th week (B)	4 4
Figure 9. The mRNA levels of genes related to vitamin D metabolism in kidney	4 6
Figure 10. Renal 1-hydroxylase protein levels	4 7

약 어 목 록

1.25(OH)₂D, 1,25-dihydroxyvitamin D

25(OH)D, 25-hydroxyvitamin D

DBP, vitamin D binding protein

EIA, enzyme immunoassay

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay

Gapdh, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

PTH, parathyroid hormone

RXR, retinoid X receptor

VDR, vitamin D receptor

VDRE, vitamin D receptor element

I. 서 론

비만인 사람들에게서 비타민 D 결핍 (혈청 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) 농도 20 ng/mL 또는 50 nmol/L 미만)이 더 흔하게 나타나는 것으로 알려져 있다 (Holick 2007). 최근에 발표된 메타분석 연구결과 (Pereira-Santos et al. 2015)에 의하면, 비만이 아닌 사람들에 비해 비만인 사람들의 비타민 D 결핍률이 35% 더 높은 것으로 나타났다. 비만에서 증가하는 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25(OH)₂D)에 의한 negative feedback 기전 (Theodoropoulos et al. 2003), 비타민 D의 지용성 성질로 인한 sequestration 이론 (Wortsman et al. 2000), 비타민 D가 혈액과 지방 조직에 일정 비율로 존재한다는 volumetric dilution 모델 (Drincic et al. 2012) 등이 그 원인으로 제시되고 있으나 아직 명확한 기전은 밝혀지지 않은 실정이다.

1-hydroxylase는 신장에서 25(OH)D를 생리활성을 가지는 1,25(OH)₂D로 전환시키는데, 1,25(OH)₂D는 칼슘 항상성 외에도 세포 증식과 분화, 염증, 포도당 항상성 또는 지방세포화 등의 조절에 관여한다 (Bikle 2009). 신장에서 1,25(OH)₂D의 생성은 parathyroid hormone (PTH) (Jones et al. 1998), fibroblast growth factor 23 (FGF23) (Shimada et al. 2004)와 1,25(OH)₂D (Wang et al. 2015)에 의해 엄격하게 조절된다. 그런데 비만인 사람들에서 1,25(OH)₂D의 비정상적인 조절이 관찰되었다. Bell et al. (1985)과 Grethen et al. (2011)은 비만인 사람들의 혈청 25(OH)D 수준은 낮은 반면 혈청 1,25(OH)₂D와 PTH 수준은 높았다고 보고하였다. 이러한 결과에 대하여 Bell et al.

(1985)은 비만으로 인한 secondary hyperparathyroidism 때문에 신장에서 1,25(OH)₂D 생성이 촉진된 것이라고 주장하였다. 한편, 비만인 사람들에게서 1,25(OH)₂D 수준이 저하되었거나 (Camozzi et al. 2016) 1,25(OH)₂D 수준과 BMI 사이에 음의 상관관계 (Konradsen et al. 2008)가 보고되었다. 해당 연구의 저자들은 1,25(OH)₂D 수준이 1,25(OH)₂D의 기질인 25(OH)D의 가용량에 더 의존한다고 설명하였다. 그러나 대부분의 연구가 25(OH)D에 집중되어 있으며 1,25(OH)₂D를 측정하는 연구가 많지 않아 이와 같은 연구들 사이의 차이를 설명하는데 어려움이 있었다.

비만에 의한 비타민 D 대사 변화가 체중 감량에 의해 회복될 수 있는지에 대한 연구도 진행된 바 있다. 비만 수술 후에는 많은 양의 체중 감량이 가능한데 대부분의 경우 수술 전의 비타민 D 결핍이 지속되었고 소수의 비만 환자들만 수술 후에 혈청 25(OH)D 수준이 개선되었다 (Signori et al. 2010; Sánchez-Hernández et al. 2005). 식이 조절에 의한 체중 감량이 비타민 D 대사에 미치는 영향에 대한 연구 결과들은 서로 일치하지 않았다. 일 년 간의 체중 감량 프로그램에 참여한 103명의 비만 남성들은 내장 지방량이 감소하였고 동시에 혈청 25(OH)D 농도가 26% 증가하였다 (Gangloff et al. 2015). 무릎 골관절염이 있는 비만 환자들에게 16주 간의 식이 제한을 통해 평균 14.0 kg (체지방량 평균 11.0 kg)의 체중 감량을 유도하였을 때 유의적인 25(OH)D의 증가와 PTH의 감소가 보고되었다 (Christensen et al. 2012). 그러나 비만 여성들이 평균 체중을 8.5 kg (체지방비 7.0% 저하) 감량하였을 때 혈청 PTH

수준은 유의적으로 감소한 반면 혈청 25(OH)D 수준에는 유의적인 변화가 없었다 (Holecki et al. 2008). 게다가 대부분의 연구들이 체지방량 감소에 따른 1,25(OH)₂D 농도 변화 여부는 보고하지 않았다.

이처럼 비만은 비타민 D 대사를 변화시키지만 대부분의 연구가 인체 연구에 국한되어 있어 원인 기전을 밝히는 데에는 어려움이 있었다. 또한 비타민 D 대사에 영향을 미치는 다양한 요인들로 인해 체지방량 감소에 따른 비타민 D 대사의 회복 가능성 여부도 불분명하였다. 따라서 본 연구에서는 고지방 식이로 비만을 유도한 마우스 모델에게 저지방 식이를 급여함으로써 체지방량을 감소시켰을 때 비만에 의한 비타민 D 대사 변화가 회복될 수 있는지를 알아보려고 하였다. 이를 위해 혈청 25(OH)D와 1,25(OH)₂D를 측정하여 비타민 D 수준을 확인하였고 간과 신장 조직에서 비타민 D 대사와 관련된 유전자의 발현을 측정하여 체지방량 변화에 따른 비타민 D 대사 변화의 기전을 살펴보고자 하였다.

II. 문헌 고찰

1. 비만과 비타민 D

비만은 체내에 과다하게 지방이 축적되어 있는 상태로 당뇨, 심혈관계 질환, 골다공증 등 다양한 합병증을 유발하여 사망률의 주요 원인으로 꼽힌다. 이런 비만과 비만의 합병증을 앓고 있는 사람들에게서 비타민 D 결핍 (혈청 25(OH)D 농도 20 ng/mL 미만)이 더 흔하게 나타나는 것으로 알려져 있다 (Vimaleswaran et al. 2013). Pereira-Santos et al. (2015)에 의하면 비타민 D 결핍의 발생 빈도가 비만인 사람들에게서 그렇지 않은 사람들보다 35% 더 높게 나타났다. 그러나 아직 어떤 기전으로 비만에서 비타민 D 결핍이 유발되는 것인지는 명확하게 밝혀지지 않았다.

많은 연구자들이 비만인 사람들에서 나타나는 비타민 D 결핍 유발 기전을 제시하였는데, 그 중 일반적으로 받아들여지고 있는 것은 다음과 같다. 비만인 사람들은 야외 활동을 많이 하지 않는데 이로 인해 체내에서 합성되는 비타민 D의 양이 적어 비타민 D 결핍이 발생할 수 있다. 비만한 경우 혈청 1,25(OH)₂D 수준이 증가함에 따라 negative feedback 기전에 의해 간에서 25(OH)D 합성이 저해되어 혈청 25(OH)D 농도가 감소했을 가능성도 제시되었다 (Bell et al. 1984; Theodoropoulos et al. 2003). Wortsman et al. (2000)은 지용성 비타민인 비타민 D가 지방조직에 저장된 후 이용되지 못하여 비만인 사람들의 혈중 비타민 D 농도가

낮아진다고 설명하였다. 최근에는 volumetric dilution 모델이 비만에서의 비타민 D 결핍을 설명하기 위해 도입되었다 (Drincic et al. 2012). 이론에 의하면, 체내로 유입된 비타민 D 는 일정한 비율로 혈액과 지방조직으로 분배되는데 체지방이 증가하면 혈액보다 지방조직으로 유입되는 비타민 D 의 양이 더 많아져서 비타민 D 결핍이 발생하게 된다.

비만은 혈중 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 의 농도 조절 결함과도 연관이 있는 것으로 보인다. 칼슘과 인 대사를 조절하는 비타민 D 의 활성형인 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 는 정상적인 상태에서 그 농도가 철저하게 조절된다. 그러나 비만인 사람들에서 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 의 합성을 촉진하는 PTH 와 함께 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 의 농도가 높게 나타난 것이 관찰되었다 (Bell et al. 1985; Grethen et al. 2011). Bell et al. (1985)은 비만에 의해 발생한 secondary hyperparathyroidism 때문에 신장에서 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 생성이 증가하게 된다고 주장하였다. 한편, Camozzi et al. (2016)은 비만인 사람들의 혈청 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 농도가 정상 체중인 사람들보다 낮았다고 보고하였으며, Konradsen et al. (2008)은 혈청 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 와 BMI 사이에 음의 상관관계를 관찰하였다. 해당 연구의 저자들은 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 수준은 PTH 보다 $25(\text{OH})\text{D}$ 수준에 의해 결정되며 비만에서 $25(\text{OH})\text{D}$ 가 감소함에 따라 이를 기질로 이용하는 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 합성 반응이 저하된다고 설명하였다. 이와 같이 비만과 관련된 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 의 변화는 연구들 간의 결과가 서로 일치하지 않았다. 게다가 혈청 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 의 측정 방법이 어렵고 $25(\text{OH})\text{D}$ 가 체내 비타민 D 함량을 대표하는 지표로 이용되기 때문에 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 을 관찰한 연구가 많지

않아 (Pourshahidi 2015) 비만과 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 의 관계를 밝히기는 더 어려운 실정이다. 비록 혈청 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 의 농도가 $25(\text{OH})\text{D}$ 농도의 1/1000 수준으로 낮아 비타민 D 영양상태를 반영하는 지표로 사용하기에는 어려움이 있지만 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 가 비타민 D의 활성형으로 다양한 조절 작용을 하며 비만인 사람들에게서 비정상적인 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 상태가 관찰된 만큼 비타민 D 대사 연구에서 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 에 대한 이해가 동반되어야 할 것으로 보인다.

2. 비타민 D의 대사 과정

비타민 D 는 급원 식품에도 들어 있지만 대부분은 햇빛을 받아 피부에서 합성하여 얻을 수 있다. 비타민 D₃ 는 체내에서 합성된 형태로 7-dehydrocholesterol 이 자외선 (UVB) 조사를 받아 연속적인 화학반응을 거치며 비타민 D₃ 로 전환된다. 비타민 D₃ 는 비타민 D₂ 와 함께 급원 식품을 통해서도 섭취할 수 있다. 피부에서 합성된 비타민 D 는 vitamin D binding protein (DBP)와 결합하여 간으로 이동하고, 소장에서 흡수된 비타민 D 는 chylomicron 의 형태로 간으로 이동한다 (Brannon et al. 2008). 간으로 이동한 비타민 D 는 간에 위치한 cytochrome P450-dependent enzyme 인 25-hydroxylase 에 의해 25(OH)D 로 활성화된다. 25(OH)D 는 신장에서 다시 cytochrome P450-dependent enzyme 인 1-hydroxylase 에 의해 1,25(OH)₂D 로 활성화된다. 25(OH)D 와 1,25(OH)₂D 는 신장에서 24-hydroxylase 에 의해 24,25(OH)D 또는 1,24,25(OH)₃D 로 전환된 뒤 일련의 과정을 거치며 활성을 잃거나 분해되어 체외로 배출된다 (Henry 2011). 이와 같은 비타민 D 대사과정을 **Figure 1** 에 나타내었다.

1) 25-hydroxylase

비타민 D 는 가장 먼저 간에서 25-hydroxylase 에 의해 25(OH)D 로 활성화된다. 간세포의 미토콘드리아와 소포체에는 25-hydroxylase 활성을 가지는 여러 종류의 25-hydroxylase 가 존재한다.

CYP27A1

CYP27A1 은 유일한 mitochondrial 25-hydroxylase 로 간 외에도 근육, 신장, 소장, 난소, 폐, 피부 등에서 발견된다 (Zhu and DeLuca 2012). CYP27A1 은 담즙 합성 경로의 critical step 을 촉매하는 효소로 처음 발견되었으며 비타민 D 뿐만 아니라 콜레스테롤 결사슬의 hydroxylation 에도 관여한다 (Henry 2011). *Cyp27a1*^{-/-} 마우스를 이용한 실험에서 담즙 합성은 유의적으로 감소한 반면, 혈청 25(OH)D 농도는 정상보다 높았다 (Rosen et al. 1998). 이와 같은 결과에 근거하였을 때, CYP27A1 의 25-hydroxylation 에 대한 기여도는 크지 않은 것으로 보인다..

CYP2R1

CYP2R1 은 microsomal 25-hydroxylase 로 간과 정소에서 주로 발견된다. 마우스나 랫드의 간에서 CYP2R1 은 CYP27A1 보다 적게 발견되지만 (Yamasaki et al. 2004) CYP27A1 보다 비타민 D 의 25-hydroxylation 에 더 많이 관여하는 것으로 알려져 있다. Human CYP2R1 과 CYP27A1 recombinant cell 을 이용한 연구에서 CYP2R1 은 CYP27A1 보다 비타민 D₃ 에 대한 affinity 가 7 배 높았고, 전체적인 활성은 26 배 더 높았다 (Shinkyō et al. 2004). CYP2R1 과 CYP27A1 유전자를 탈락시킨 마우스 연구에서 *Cyp27a1*^{-/-} 마우스의 혈청 25(OH)D 농도는 wild type (WT) 마우스보다 높았으나 *Cyp2r1*^{-/-} 마우스와 *Cyp2r1*^{-/-} *Cyp27a1*^{-/-} 마우스의 혈청 25(OH)D 는 WT 마우스의 50% 수준으로 낮았다 (Zhu et al. 2013). 또한, CYP2R1 은 CYP27A1 과 달리 비타민 D₂ 와 D₃ 를 모두 25(OH)D 로 hydroxylation 시킨다 (Henry 2011).

CYP2J3

CYP2J3 는 microsomal 25-hydroxylase 로 주로 간에서 발현되며 랫드의 간에서 처음 발견되었다. CYP2J3 는 랫드의 간에서 가장 많이 발현되는 25-hydroxylase 이며 CYP27A1 보다 10 배 가량 활성이 높게 나타났다 (Yamasaki et al. 2004). 인간의 간에서는 CYP2J2 가 발현되어 CYP2J3 와 동일한 작용을 하지만 랫드의 CYP2J3 보다 활성이 약한 것으로 알려졌다 (Aiba et al. 2006).

2) 1-hydroxylase (CYP27B1)

간에서 생성된 25(OH)D 는 신장에서 1-hydroxylase (CYP27B1)에 의해 1,25(OH)₂D 로 활성화된다. 1-hydroxylase 는 신장의 근위세뇨관에 주로 발현되어 혈청 1,25(OH)₂D 수준을 조절한다. 1-hydroxylase 는 원위세뇨관에서도 발현되는데, 원위세뇨관에 위치한 1-hydroxylase 는 autocrine 및 paracrine 작용을 하는 1,25(OH)₂D 를 생성하는 것으로 알려져 있다. 1-hydroxylase 의 작용은 비타민 D 대사 과정 중 가장 철저하게 조절되는 단계로 칼슘, 인, PTH, FGF23, 1,25(OH)₂D 등이 1-hydroxylase 조절에 관여한다 (Hewison et al. 2000).

1-hydroxylase 는 신장 외에도 뇌, 태반, 정소, 소장, 폐, 지방, 지방조직, 림프구, 대식세포, 부갑상샘, 조골세포, 연골세포 등에서도 발견되었다. 이러한 신장 외 조직이나 세포에서 발현된 1-hydroxylase 는 기존에

알려진 것과 다른 기전으로 조절되며 발현되는 세포에 특이적인 작용을 하는 것으로 밝혀졌다 (Adams and Hewison 2012).

3) 24-hydroxylase (CYP24A1)

24-hydroxylase는 multi-catalytic enzyme으로 25(OH)D 또는 1,25(OH)₂D의 C24 위치를 hydroxylation 시킨 후 연속적인 반응을 통해 calcitric acid 형태로 만들어 불활성화 시킨다 (Henry 2001). 24-hydroxylase의 affinity는 25(OH)D보다 1,25(OH)₂D에서 10 배 가량 더 높았다 (Omdahl et al. 2002). 이와 같은 결과는 혈중 1,25(OH)₂D 농도가 증가하였을 때, 24-hydroxylase가 호르몬처럼 작용하는 1,25(OH)₂D로부터 우리 몸을 보호하고 있음을 시사한다.

24-hydroxylase는 신장 근위세뇨관에서 가장 많은 양이 발현되지만 소장, 지방조직, 골세포, 포식세포, 림프구 등 거의 모든 세포에서 발현된다. 이러한 세포들에서 24-hydroxylase는 VDR의 주요한 응답유전자이기 때문에 VDR의 생체표지자로 이용된다 (Chow et al. 2013).

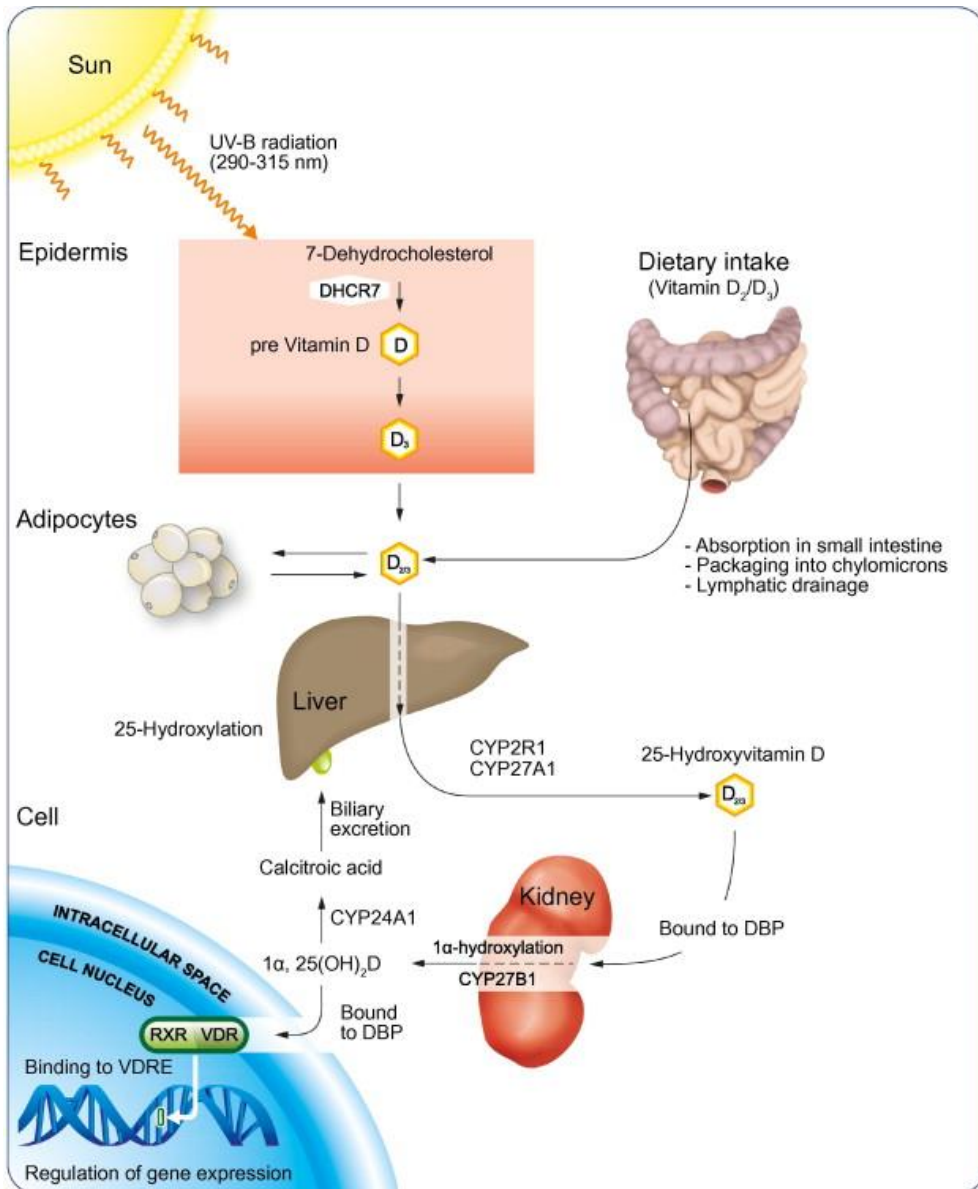


Figure 1. The metabolic pathway for vitamin D¹ (Kitson and Roberts 2012)

¹CYP2R1, CYP27A1: 25-hydroxylase; CYP24A1: 24-hydroxylase; CYP27B1: 1-hydroxylase; DBP: vitamin D binding protein; DHCR: 7-dehydrocholesterol reductase; RXR: retinoid X receptor; VDR: vitamin D binding protein; VDRE: vitamin D receptor element

3. 1,25-dihydroxyvitamin D의 조절

1,25(OH)₂D 농도는 매우 엄격하게 조절되는데, 혈중 칼슘이나 인 농도에 따라 PTH, FGF23, 1,25(OH)₂D 와 같은 인자들이 1-hydroxylase 와 24-hydroxylase 의 활성을 조절하여 혈중 1,25(OH)₂D 의 농도를 조절한다 (Christakos et al. 2016).

혈중 칼슘 농도가 감소하면 부갑상샘에서 분비된 PTH 가 1-hydroxylase 를 자극하여 1,25(OH)₂D 의 생성을 증가시킨다. PTH 는 신장 근위세뇨관에서 cAMP 의존적인 기전을 통해 1-hydroxylase 의 전사를 촉진하고 (Bajwa et al. 2008) 24-hydroxylase 의 전사를 억제하여 (Christakos et al. 2016) 혈중 1,25(OH)₂D 농도를 증가시킨다. PTH 의 자극으로 생성된 1,25(OH)₂D 는 직접적으로 부갑상샘에서 PTH 유전자의 전사를 저해하고 간접적으로 혈중 칼슘 농도를 조절하여 혈중 PTH 농도를 조절한다.

FGF23 은 혈중 인 함량이 높을 때 골세포에서 분비되어 인 항상성을 조절하는 호르몬이다. FGF23 은 근위세뇨관의 brush border membrane 에 위치한 sodium-phosphate cotransporter 의 발현을 억제하여 인의 재흡수를 감소시킨다 (Perwad et al. 2007). 동시에 FGF23 은 1-hydroxylase 를 억제하여 1,25(OH)₂D 생성을 저해하고 24-hydroxylase 를 촉진하여 1,25(OH)₂D 를 불활성화 시킨다 (Wohrle et al. 2011).

1,25(OH)₂D 는 negative feedback 기전으로 1,25(OH)₂D 의 생성을 억제한다. 신장에서 VDR 과 결합한 1,25(OH)₂D 는 1-hydroxylase 를 억제하고 24-hydroxylase 를 자극하여 혈중 1,25(OH)₂D 농도를 감소시킨다

(Omdahl et al. 2002). VDR knock out (KO) 마우스에게 1,25(OH)₂D 를 투여하였을 때, *Vdr*^{+/+}와 *Vdr*^{+/-} 마우스에서는 1-hydroxylase 발현량이 감소하였지만 *Vdr*^{-/-} 마우스에서는 발현량이 감소하지 않았다. 이와 같은 결과는 1,25(OH)₂D 가 VDR 과 결합하여 1-hydroxylase 의 발현을 억제한다는 것을 시사한다 (Takeyama et al. 1997). 그러나 1-hydroxylase 유전자의 promoter 에서 vitamin D response element (VDRE)가 발견되지 않아 1,25(OH)₂D-VDR 복합체는 간접적인 방법으로 1-hydroxylase 를 auto-regulation 하는 것으로 여겨지고 있다 (Brenza and DeLuca 2000).

4. Vitamin D receptor

1,25(OH)₂D 는 세포 내에 있는 VDR 과 결합하여 표적유전자의 전사를 조절할 수 있다 (Ding et al. 2012). 1,25(OH)₂D-VDR 복합체는 다시 retinoid X receptor (RXR)과 결합하여 heterodimer 를 형성한다. VDR-RXR heterodimer 는 핵에서 vitamin D-regulated gene 의 VDRE 에 결합하여 genomic response 를 일으킨다 (Haussler et al. 2013). 이러한 과정을 통해 VDR 은 229 개의 human 유전자를 조절한다 (Ramagopalan et al. 2010). 이와 같은 1,25(OH)₂D 의 작용 기전을 **Figure 2** 에 나타내었다.

VDR 은 신장 세노관, 부갑상샘세포, 소장 상피세포, 유방 상피세포, 췌장 β 세포, 조골세포, 연골세포, 각질세포, 단핵구, 림프구, 포식세포 등에서 발현된다. 칼슘과 인 항상성 조절과 무관한 세포들에서 VDR 이 발견됨에 따라 세포 분화와 증식 조절, 면역 및 염증 조절, 에너지 대사 조절과 같은 1,25(OH)₂D 의 다양한 기능이 알려지게 되었다. 또한 다양한 임상 연구를 통해 비타민 D 결핍이 구루병뿐만 아니라 당뇨병, 암, 심혈관계 질환, 자가면역질환 등과도 연관되어 있다는 것이 밝혀졌다 (Ding et al. 2012).

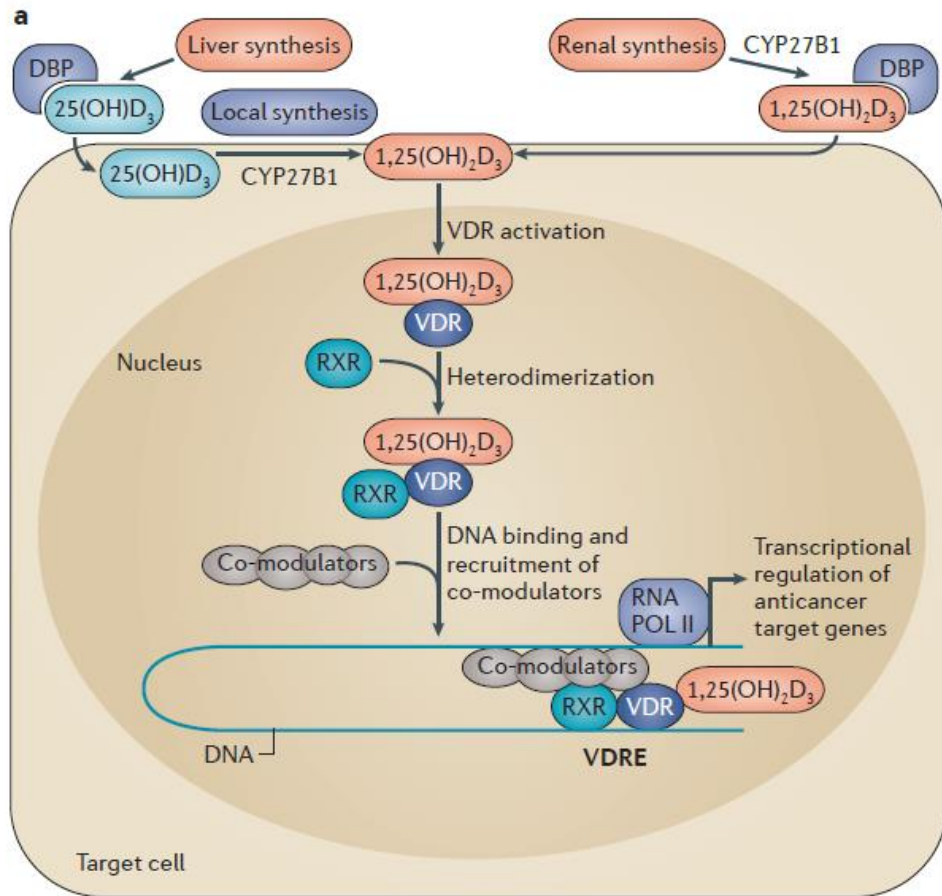


Figure 2. Genomic mechanism of calcitriol action through the VDR¹ (Feldman et al. 2014)

¹CYP27B1: 1-hydroxylase; DBP: vitamin D binding protein; RNA POL II : RNA polymerase II ; RXR: retinoid X receptor; VDR: vitamin D binding protein; VDRE: vitamin D receptor element

5. 체중 조절에 의한 비타민 D 대사 변화

최근에는 체중 감량에 따른 비타민 D 대사의 회복 가능성에 대한 관심도 커졌다. 비타민 D 는 지용성 성질로 인해 많은 양이 지방 조직에 저장된다고 보고된 바 있다. Heaney et al. (2009)은 25(OH)D 의 34%가 지방조직에 저장되고 30%가 혈액에, 20%가 근육에 저장된다고 보고하였다. 그러나 지방조직에 저장된 비타민 D 는 다른 곳에 있는 비타민 D 보다 더 천천히 혈액으로 흘러나오는 것으로 밝혀졌다 (Rosenstreich et al. 1971). 이와 같은 비타민 D 의 성질 때문에 체지방량이 감소하였을 때 지방조직에 저장되어 있던 비타민 D 가 혈액으로 이동하여 혈청 25(OH)D 수준을 증가시키는데 기여할지 또는 분해되어 배설될지는 불분명한 실정이다. 게다가 체중 감량 연구에서 1,25(OH)₂D 의 측정이 거의 이루어지지 않아 체중 감량 후 1,25(OH)₂D 변화 여부는 알 수 없었다.

비만수술 (bariatric surgery)은 체중을 감량하기 위한 가장 효과적인 방법으로 많은 연구들이 비만수술로 체중 감량을 유도한 뒤 비타민 D 영양상태를 비교하였다. 비만수술을 받은 병적인 비만 환자 64 명은 비만수술 후 혈청 25(OH)D 농도가 증가하고 PTH 농도가 감소하였다 (Sánchez-Hernández et al. 2005). 그러나 Ybarra et al. (2005)의 연구에서는 비만수술을 받은 사람과 그렇지 않은 사람들의 BMI 는 6 kg/m² 이상 차이가 났지만 혈청 25(OH)D 와 PTH 농도에는 유의적인 차이가 없었다. Peterson et al. (2016)의 literature review 에 의하면 비만수술 후에도 대부분의 비만 환자들에서 비타민 D 결핍이 지속되었다. 또한, 혈청

PTH 농도가 감소한 경우도 19 개 연구 중 3 개 연구에 불과하였다. 비만수술은 체지방량을 빠르게 감소시킬 수 있는 효과적인 방법이지만 비만수술 후 칼슘과 비타민 D 흡수가 저하되고 호르몬 환경이 변화됨에 따라 이와 같이 연구 결과에 차이가 발생하는 것으로 보인다.

체중 감량에 의한 효과를 연구하는데 있어 비만수술은 위와 같은 제한점을 가지지만 식이조절에 의한 체중 감량과 비타민 D 대사의 관계에 대한 연구는 많지 않았다. 게다가 연구 결과들이 서로 일치하지 않았다. 일 년간의 체중 감량 프로그램에 참여한 103 명의 비만 남성들은 유의적인 내장 지방 감량에 성공하였고 그 결과 혈청 25(OH)D 수준이 26% 증가하였다 (Gangloff et al. 2015). 비만 골관절염 환자들의 열량 섭취를 16 주간 제한하였을 때에는 14 kg 의 체중 감소 (체지방량 평균 11 kg)와 함께 유의적인 혈청 25(OH)D 증가와 PTH 감소가 확인되었다 (Christensen et al. 2012). 그러나 Mason et al. (2011)의 연구에 의하면 체중감량 비율이 15% 이상일때만 혈청 25(OH)D 농도가 유의적으로 증가하였고 15% 미만일 때에는 혈청 25(OH)D 수준에 유의적인 변화가 없었다. 따라서 체중 감량에 의한 비타민 D 대사의 회복 가능성을 확인하기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

III. 연구 방법

1. 실험 동물

4 주령의 암컷 C57BL/6 마우스를 The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA)에서 구입하여 Tufts University 의 Jean Mayer USDA Human Nutrition Research Center on Aging (HNRCA) 동물사육장의 specific pathogen-free (SPF) room 에서 사육하였다. 실험 동물은 한 케이지 당 한 마리씩 분리하여 사육하였고, 사육 환경은 온도 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 10\%$, 명암은 12시간 주기로 유지되었다. 실험 동물은 5일간 대조 식이로 적응 기간을 거친 뒤 평균체중이 유사하도록 6-8 마리씩 세 군에 임의 배정하였다. 세 군은 각각 LL 군 (Low fat – Low fat group, $n = 6$), HL 군 (High fat – Low fat group, $n = 8$), HH 군 (High fat – High fat group, $n = 7$)이었다. 실험 설계 디자인은 **Figure 3** 와 같다.

사육 14 주차와 30 주차에 EchoMRI™-700 (Houston, TX, USA)을 이용하여 실험 동물의 체성분을 측정하였으며 한 쥐 당 세 번씩 측정하여 체지방량과 체지방량의 평균값을 기록하였다. 31 주간의 실험 식이 기간이 끝난 후 실험동물을 12 시간 동안 금식 시키고 CO₂ 과호흡 방식으로 희생시켰다. 희생 직후 심장천자 방법으로 채혈하고 2 시간 동안 상온에서 응고시켰다. 혈액을 3000 rpm 에서 20 분간 원심분리 하여 얻은 혈청을 -80°C 에서 보관하였다. 간과 신장 조직은 적출한 뒤 액체 질소로 즉시 동결시키고 분석 전까지 -80°C 에서 보관하였다.

실험 동물의 구입 및 사육, 희생의 전 과정은 Tufts University 의 Jean Mayer USDA HNRCA Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)의 승인을 받았으며, 규정에 따라 수행되었다. (승인 번호: #85-1950-0-014)

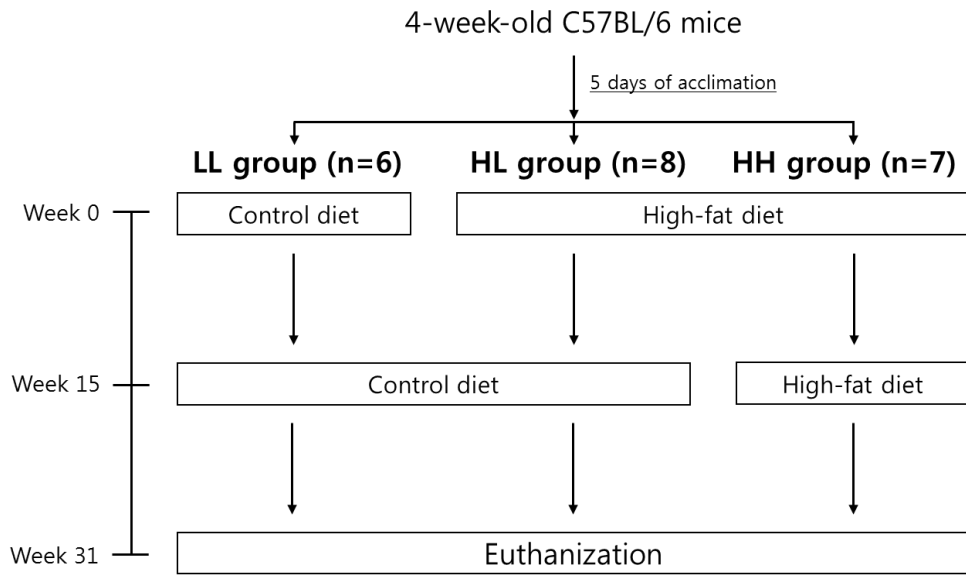


Figure 3. The experimental design

2. 실험식이

실험식은 지방 급원으로부터의 열량이 전체 열량의 10%인 대조 식이와 60%인 고지방 식이 두 가지로 공급하였다. 두 식이 모두 Research Diets Inc. (New Brunswick, NJ, USA)에서 주문하였고, 대조 식이는 D12450B, 고지방 식이는 D12492 제품을 이용하였다. 실험식의 조성은 **Table 1** 에 나타내었다. 실험식은 고형사료로 실험 동물에게 제공되기 전까지 4°C 에서 보관되었다. 실험식과 멸균된 3 차 탈 이온수는 자유급여 (*ad libitum*)로 제공하였다.

LL 군은 31 주 동안 대조 식이를 섭취하였고 HH 군은 같은 기간 동안 고지방 식이를 섭취하였다. HL 군은 처음 15 주 동안은 고지방 식이를 섭취하고 이후 16 주는 대조 식이로 바꾸어 섭취하였다.

Table 1. Composition of the experimental diets

	Control diet (g) (10% kcal Fat)	High-fat diet (g) (60% kcal Fat)
Casein, 30 Mesh	200	200
L-Cystine	3	3
Corn Starch	315	0
Maltodextrin 10	35	125
Sucrose	350	68.8
Cellulose, BW200	50	50
Soybean Oil	25	25
Lard	20	245
Mineral Mix ^a	10	10
DiCalcium Phosphate	13	13
Calcium Carbonate	5.5	5.5
Potassium Citrate, 1 H ₂ O	16.5	16.5
Vitamin Mix ^b	10	10
Choline Bitartrate	2	2
FD&C Yellow Dye #5	0.05	0.05
Total	1055.05	773.85
kcal/g diet	3.85	5.24

Resource: Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA

^a 10 g of mineral mix (Research Diets Inc., #S10026) provides 1.0 g of Na, 1.6 g of Cl, 0.5 g of Mg, 0.33 g of S, 59 mg of Mn, 37 mg of Fe, 29 mg of Zn, 6 mg of Cu, 2 mg of Cr, 1.6 mg of Mo, 0.16 mg of Se, 0.9 mg of Fl, 0.2 mg of I, and 3.99 g of sucrose.

^b 10 g of vitamin mix (Research Diets Inc., #V10001) provides 4000 IU of vitamin A, 1000 IU of vitamin D₃, 50 IU of vitamin E, 0.5 mg of menadione, 0.2 mg of biotin, 10 µg of vitamin B₁₂, 2 mg of folic acid, 30 mg of niacin, 16 mg of pantothenic acid, 7 mg of vitamin B₆, 6 mg of vitamin B₂, 6 mg of vitamin B₁, and 978.42 mg of sucrose.

3. 혈액 분석

3.1. 혈청 25-hydroxyvitamin D 정량

혈청 25(OH)D 는 25-Hydroxy Vitamin D^s EIA kit (ImmunoDiagnostics Systems Ltd., Boldon, UK)를 이용하여 enzyme immunoassay (EIA) 방법으로 측정하였다.

Calibrator, control, 또는 샘플 25 μ L 에 1 mL 의 25-D biotin solution 을 넣어 희석시켰다. 희석된 200 μ L 의 calibrator, control, 또는 샘플을 antibody coated plate 의 well 에 duplicate 하여 넣고 plate 의 뚜껑을 닫은 상태로 2 시간 동안 상온에서 incubation 하였다. 각각의 well 을 wash solution 250 μ L 으로 세 번 세척하고 absorbent tissue 를 이용하여 남아있는 용액을 제거하였다. Enzyme conjugate 200 μ L 를 각각의 well 에 첨가하고 plate 의 뚜껑을 닫아 30 분간 상온에서 incubation 하였다. 앞의 wash step 을 반복하였다. 각각의 well 에 tetramethylbenzidine (TMB) substrate 200 μ L 를 첨가하고 다시 plate 의 뚜껑을 닫아 30 분간 상온에서 incubation 하였다. Stop solution 100 μ L 를 모든 well 에 첨가한 뒤 450 nm 에서 흡광도를 측정하였고 650 nm 에서의 흡광도를 reference 로 이용하였다.

각 샘플의 혈청 25(OH)D 농도는 4 parameter logistic (4PL) curve 를 이용하여 계산하였다.

3.2. 혈청 1,25-dihydroxyvitamin D 정량

혈청 1,25(OH)₂D 는 1, 25-Dihydroxy Vitamin D EIA kit (ImmunoDiagnostics Systems Ltd., Boldon, UK)를 이용하여 EIA 방법으로 측정하였다. 혈청 1,25(OH)₂D 의 분석은 monoclonal anti-1,25(OH)₂D 를 이용하여 1,25(OH)₂D 를 추출하는 immunoextraction 단계와 EIA 방식으로 1,25(OH)₂D 를 정량하는 두 단계로 이루어져 있다.

샘플과 control 각각에 샘플 부피의 1/10 만큼 delipidation reagent 를 넣어 섞은 뒤 10000 g 에서 10 분간 원심분리 하였다. Immunocapsule 을 vortexing 하고 고체상이 안착할 때까지 4 분간 immunocapsule 을 정치시켰다. 원심분리가 끝난 샘플과 control 을 각각 100 µL 씩 서로 다른 immunocapsule 에 duplicate 로 첨가하였다. 뚜껑을 잘 닫은 immunocapsule 을 test tube rocker 에 고정시키고 상온에서 90 분 동안 15 rpm 의 속도로 회전시켰다. 겔상이 안착할 수 있도록 immunocapsule 을 4 분간 정치시켰다. 뚜껑을 제거하고 바닥의 마개를 분리한 immunocapsule 을 plastic tube 에 넣고 2300 rpm 에서 1 분간 원심분리 하였다. 탈이온수 500 µL 를 각각의 immunocapsule 에 첨가한 뒤 다시 2300 rpm 에서 1 분간 원심분리하여 immunoextraction gel 을 세척하였다. 이 과정을 2 번 더 반복하였다. Immunocapsule 을 넣은 borosilicate glass tube 에 Elution reagent 150 µL 를 첨가하고 2 분 후 2300 rpm 에서 원심분리하는 과정을 2 번 반복하였다. Immunocapsule 을 제거하고 각각의 tube 를 40°C 의 heating block 에 장착한 상태로 질소를 이용하여 액체를 완전히 증발시켰다. 각각의 tube 에 assay buffer 를 100 µL 씩 첨가하였다.

새로운 tube 에 100 μL 의 calibrator 를 첨가하였다. Calibrator 가 들어 있는 tube 와 immunoextraction 과정이 끝난 모든 tube 에 primary antibody solution 100 μL 을 첨가하고 vortexing 하여 냉장고에서 하룻밤 동안 incubation 하였다. Antibody coated plate 의 처음 2 개 well 을 제외한 나머지 well 에 위의 용액을 각각 150 μL 씩 분주하였다. 뚜껑을 잘 닫은 plate 를 회전교반기에 올려놓고 상온에서 600 rpm 의 속도로 90 분간 교반시켰다. 처음 2 개 well 을 제외한 나머지 well 에 1,25D biotin solution 을 100 μL 씩 분주하였다. 뚜껑을 잘 닫은 plate 를 동일한 조건에서 60 분간 교반시켰다. 모든 well 을 wash solution 250 μL 로 세척하는 과정을 3 번 반복했다. 남아 있는 용액이 없도록 absorbent tissue 를 이용하여 남아있는 용액을 제거하였다. 처음 2 개 well 을 제외한 나머지 well 에 enzyme conjugate 를 200 μL 씩 분주하고 상온에서 30 분간 incubation 하였다. 위의 wash step 을 반복하였다. 모든 well 에 TMB substrate 를 200 μL 씩 분주하고 상온에서 30 분간 incubation 하였다. Stop solution 100 μL 를 모든 well 에 첨가한 뒤 450 nm 에서 흡광도를 측정하였고 650 nm 에서의 흡광도를 reference 로 이용하였다.

각 샘플의 혈청 1,25(OH)₂D 농도는 4 parameter logistic (4PL) curve 를 이용하여 계산하였다.

3.3. 혈청 parathyroid hormone 정량

혈청 PTH 는 Mouse PTH 1-84 ELISA kit (Immunotopics, Inc., San Clemente, CA, USA)를 이용하여 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법으로 측정하였다.

Streptavidin coated microtiter plate 에 standard, control, 또는 샘플을 각각 20 μL 씩 분주하였다. 동량의 mouse PTH 1-84 biotinylated antibody 와 mouse PTH 1-84 HRP conjugated antibody 로 이루어진 working antibody solution 을 50 μL 씩 모든 well 에 분주하였다. 뚜껑을 닫고 알루미늄 호일로 감싼 뒤 상온에서 3 시간 동안 수평교반기에서 200 rpm 속도로 incubation 하였다. 호일과 뚜껑을 제거한 뒤 모든 well 을 working wash solution 350 μL 로 5 번씩 세척하였다. 각각의 well 에 ELISA HRP substrate 100 μL 를 분주하였다. 다시 뚜껑을 닫고 알루미늄 호일로 감싼 뒤 30 분간 동일한 조건에서 incubation 하였다. 호일과 뚜껑을 제거하고 630 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 0 pg/mL standard 의 흡광도를 blank 로 사용하였다. ELISA stop solution 100 μL 를 모든 well 에 분주하고 1 분간 incubation 한 뒤 450 nm 에서 흡광도를 측정하였다. Substrate 100 μL 와 stop solution 100 μL 혼합액의 450 nm 에서의 흡광도를 reagent blank 로 사용하였다.

먼저 450 nm 의 흡광도가 standard 1-5 의 흡광도 사이에 나타난 샘플은 standard 1-5 의 standard curve 를 이용하여 농도를 구하고 나머지 샘플은

standard 1, 4, 5, 6 의 630 nm 흡광도의 standard curve 를 이용하여 농도를 구하였다.

3.4. 혈청 fibroblast growth factor 23 정량

혈청 FGF23 은 Mouse/Rat FGF-23 (C-Term) ELISA kit (Immunotopics, Inc., San Clemente, CA, USA)를 이용하여 ELISA 방법으로 측정하였다.

Streptavidin coated microtiter plate 에 standard, control, 또는 샘플을 각각 25 μ L 씩 분주하였다. 동량의 biotinylated antibody 와 HRP antibody 로 이루어진 working antibody solution 을 50 μ L 씩 모든 well 에 분주하였다. 뚜껑을 닫고 알루미늄 호일로 감싼 뒤 상온에서 3 시간 동안 수평교반기에서 200 rpm 속도로 incubation 하였다. 호일과 뚜껑을 제거한 뒤 모든 well 을 working wash solution 350 μ L 로 5 번씩 세척하였다. 각각의 well 에 ELISA HRP substrate 100 μ L 를 분주하였다. 다시 뚜껑을 닫고 알루미늄 호일로 감싼 뒤 30 분간 동일한 조건에서 incubation 하였다. 호일과 뚜껑을 제거하고 630 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 0 pg/mL standard 의 흡광도를 blank 로 사용하였다. ELISA stop solution 50 μ L 를 모든 well 에 분주하고 1 분간 incubation 한 뒤 450 nm 에서 흡광도를 측정하였다. Substrate 100 μ L 와 stop solution 50 μ L 혼합액의 450 nm 에서의 흡광도를 reagent blank 로 사용하였다.

먼저 450 nm 의 흡광도가 standard 1-5 의 흡광도 사이에 나타난 샘플은 standard 1-5 의 standard curve 를 이용하여 농도를 구하고 나머지 샘플은

standard 1, 4, 5, 6 의 630 nm 흡광도의 standard curve 를 이용하여 농도를 구하였다.

4. 조직 내 RNA 추출, cDNA 합성 및 real-time PCR

4.1. RNA 추출

간과 신장 조직 50 mg 을 취한 뒤 RNAiso Plus (Takara, Shiga, Japan)를 이용하여 RNA 를 추출하였다. RNAiso Plus 용액 1 mL 에 조직을 넣고 균질화 (homogenization) 한 뒤 5 분간 상온에서 incubation 하였다. Chloroform (Sigma, St. Louis, MO, USA) 200 μ L 를 넣고 15 초간 vortexing 한 후 다시 3 분간 상온에 두었다가 12000 \times g, 4 $^{\circ}$ C 에서 15 분간 원심분리 하고 상층액을 취하여 새로운 e-tube 에 옮겨 담았다. Isopropanol (Sigma) 500 μ L 를 넣고 vortexing 한 후 상온에서 10 분간 두었다가 12000 \times g, 4 $^{\circ}$ C 에서 10 분간 원심분리 하였다. Pellet 을 확인하고 상층액을 버린 뒤 75% ethanol 1 mL 로 washing 하였다. 7500 \times g, 4 $^{\circ}$ C 에서 2 분간 원심분리하고 ethanol 을 버린 뒤 pellet 을 완전히 건조하였다. Pellet 이 완전히 건조된 후 0.05% diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated DW 20 μ L 에 pellet 을 잘 녹였다. 이 중 일부를 취하여 희석하고 260 nm 와 280 nm 에서의 흡광도를 측정해 추출한 RNA 의 순도와 농도를 구하였다. RNA 의 농도가 0.5 μ g/ μ L 가 되도록 희석하여 agarose 전기영동으로 RNA 의 질을 확인하고 사용 전까지 -80 $^{\circ}$ C 에서 보관하였다.

4.2. cDNA 합성

추출한 RNA 는 PrimeScript 1st strand cDNA synthesis kit (Takara)를 이용하여 cDNA 로 합성하였다. PCR tube 에 0.5 μ g/ μ L RNA stock 4 μ L, dNTP 1 μ L, oligo dT primer 1 μ L, RNase free DW 4 μ L 를 넣어 RNA-primer mixture 를 만들었다. 이를 65 $^{\circ}$ C 와 4 $^{\circ}$ C 에서 각각 5 분씩 incubation 하였다. 여기에

5×PrimeScript buffer 4 μL, RNase inhibitor 0.5 μL, PrimeScript Rtase 1 μL, RNase free DW 4 μL 를 더해 reaction mixture 를 만들고 spin down 한 다음 10 분간 상온에서 방치하였다. 2720 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 를 이용하여 42°C 에서 50 분, 95°C 에서 5 분간 반응시켜 cDNA 를 합성하였다. 합성된 cDNA 는 사용 전까지 -20°C 에서 보관하였다.

4.3. Quantitative real-time PCR

SYBR Premix Ex Taq (2X) 10 μL, ROX reference dye (50X) 0.4 μL, forward 와 reverse primer 각각 0.4 μL, autoclaved DW 7.8 μL 를 cDNA 5 배 희석액 1 μL 와 섞고 spin down 하여 StepOne™Real-time PCR system (Applied Biosystems)를 사용하여 반응시켰다. SYBR Premix 와 ROX dye 는 Takara 사의 제품을 사용하였고, primer 는 사용하려는 유전자에 특이적인 서열을 검색하여 Biomedic 사 (Bucheon, Korea)에서 주문하여 사용하였다. 각 유전자의 염기 서열은 **Table 2** 에 나타내었다. 반응 조건은 먼저 95°C 에서 30 초간 유지시키고 (initiation step), 95°C 에서 10 초간 변성 (denaturation step)시키고 60°C 에서 30 초간 결합 및 증폭 (annealing step)시키는 단계를 40 회 반복하였다. 모든 실험은 duplicate 하여 평균값을 사용하였고, 유전자의 상대적 발현량은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 사용하여 계산하고 house-keeping 유전자인 *Gapdh* 의 발현량으로 보정하였다.

Table 2. Primer Sequences for quantitative real-time PCR

Gene	Forward (5' – 3')	Reverse (5' – 3')
<i>Cyp2r1</i>	TGG TGA GGT AAA TGA GGC TTT C	TGC CAG TGC TCC AGT CTT C
<i>Cyp27a1</i>	CCA AGG CAA GGT GGT AGA GA	CTT CAT CGC ACA AGG AGA GC
<i>Cyp2j3</i>	ACC TCC TTT GCT CCT TCC AT	CAG CCA CAC CTA TCC CTT CA
<i>Cyp27b1</i>	GAC GAT GTT GGC TGT CTT CC	ATC TCT TCC CTT CGG CTT TG
<i>Cyp24a1</i>	TCC CTG AGT AAT GGG CTT TG	CAC GGT AGG CTG CTG AGA TT
<i>Vdr</i>	ATG TCC AGT GAG GGG GTG TA	TGT CTG AGG AGC AAC AGC AC
<i>Pthr</i>	CCA GCG TGA AGC CAG AGT AG	GGG AAC GGG AGG TAT TTG AC
<i>Lrp2</i>	CCG TTG GGT TTG ATT CTA CG-	GGT CGC TCC TGT TCT CCA TA
<i>Gapdh</i>	GGA GAA ACC TGC CAA GTA	AAG AGT GGG AGT TGC TGT TG

Cytochrome P450 2R1 (*Cyp2r1*), cytochrome P450 27A1 (*Cyp27a1*), cytochrome P450 2J3 (*Cyp2j3*), cytochrome P450 27B1 (*Cyp27b1*), cytochrome P450 24A1 (*Cyp24a1*), vitamin D receptor (*Vdr*), parathyroid hormone receptor (*Pthr*), megalin (*Lrp2*), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*)

5. 단백질 추출 및 Western blot analysis

5.1. 총 단백질 추출 및 정량

신장 조직 50 mg 을 500 μ L 의 RIPA protein lysis buffer (50 mM Tris-Cl (pH 7.4), 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF, 1 mM Na pyrophosphate, 1 mM β -glycerophosphate, 10% glycerol, protease inhibitor cocktail tablet)에 넣고 균질화하였다. 단백질이 충분히 용해될 수 있도록 균질화된 용액을 얼음에서 30 분간 incubation 한 후 12000 rpm, 4°C 에서 20 분간 원심분리 하였다. 상층액을 새 e-tube 에 옮긴 후 보관하였다. 각 샘플의 단백질 농도는 Bradford method 로 protein assay dye reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

5.2. Western blot analysis

Laemmli sample buffer (Bio-Rad)에 β -mercaptoethanol (Sigma-aldrich)을 5% 부피비로 섞은 용액과 2 μ g/ μ L 의 단백질 용액을 1:1 로 혼합한 후 100°C heat block 에서 5 분간 단백질을 변성시켜 시료를 준비하였다. 10% polyacrylamide gel 에 준비한 시료를 20 μ L 씩 각 well 에 분주하고 SDS-PAGE 를 수행하여 분자량에 따라 단백질을 분리하였다. Gel 에 80V 에서 2 시간 동안 전류를 흘려 단백질을 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane 으로 이동시켰다. PVDF membrane 을 Ponceau S 용액으로 염색하여 단백질이 잘 이동 했는지 확인하고 Tris-buffered saline/0.1% Tween-20 (TBST) 용액으로 세척하였다. 1 시간 반 동안 5% skim milk/TBST 용액으로 PVDF membrane 을 blocking 하였다. 같은 용액에 1 차 항체를

희석하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. CYP27B1 은 Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA)사의 CYP27B1 M-100 제품을 1:1000 의 비율로 희석하여 사용하였고, loading control 인 β -actin 은 Sigma-Aldrich 사의 A5441 제품을 1:10000 의 비율로 희석하여 사용하였다. 1 차 항체 제거 후 TBST 용액으로 5 분씩 3 번 세척하고 2 차 항체 또한 5% skim milk/TBST 용액에 희석하여 1 시간 동안 반응시켰다. 2 차 항체로는 각각 Cell Signaling Technology (USA)사의 anti-rabbit HRP-linked antibody (#7074)를 1:3000, Sigma-Aldrich 사의 anti-mouse HRP-linked antibody (A9044)를 1:20000 의 비율로 희석하여 사용하였다. 2 차 항체 제거 후 동일하게 TBST 용액으로 5 분씩 3 번 세척하였다. 암실에서 A 용액과 B 용액을 1:1 로 섞은 ECL 용액 (ImmunoCruz Western blotting Luminol reagent, Santa Cruz Biotechnology)에 membrane 을 적셔서 발광시켰다. 이를 X-ray film 에 노출시켜 밴드를 확인하였다.

Bio-Rad Laboratories 의 QuantityOne 프로그램을 사용하여 단백질 양을 계산하였고, CYP27B1 의 밴드 크기를 β -actin 의 밴드 크기로 보정하여 나타내었다.

6. 통계분석

모든 통계분석은 SPSS 21.0 program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였다. 세 군 간의 비교분석은 일원분산분석 (one-way ANOVA)으로 수행하였다. ANOVA 결과가 유의적일 경우 Fisher's least significant difference (LSD) test 로 사후검정 하였다. 두 지표 사이의 상관분석은 Pearson correlation test 로 수행하였다. 통계 검증은 $P < 0.05$ 수준에서 이루어졌으며 모든 결과는 평균 \pm 표준오차 (mean \pm SEM)으로 나타내었다.

IV. 실험 결과

1. 체중과 체지방량 변화

실험동물의 체중, 체지방량과 체지방량 측정 결과를 **Table 3**와 **Figure 4**에 나타내었다. 0주에는 세 군의 평균 체중에 차이가 없었지만 15주에는 HL군과 HH군이 LL군에 비해 유의적으로 높은 체중과 체지방량을 보였다. 15주차부터 HL군의 식이를 대조 식이로 바꾸고 31주차에 다시 체중과 체지방량을 측정하였다. HL군은 식이를 변경한 15주 이후로 체중 변화가 거의 없었지만 체지방량은 3.2 ± 0.7 g 감소하였다. 반면, LL군과 HH군은 실험 기간 내내 체중과 체지방량이 모두 지속적으로 증가하였다. 그 결과, 체중과 체지방량 모두 HH군에서 가장 높았고 LL군에서 가장 낮았으며, HL군의 체중과 체지방량은 LL군에 근접한 양상을 보였다.

Table 3. Body weight, weight change, fat mass, and lean mass of LL, HL, and HH groups

	LL	HL	HH	P value
Body weight at 0 weeks (g)	15.4 ± 0.3	15.9 ± 0.3	15.8 ± 0.2	0.397
Body weight at 15 weeks (g)	26.8 ± 1.1 ^b	40.9 ± 1.8 ^a	39.4 ± 2.0 ^a	<0.001
Body weight at 31 weeks (g)	35.8 ± 1.9 ^c	40.6 ± 1.4 ^b	63.1 ± 1.5 ^a	<0.001
Fat mass at 14 week (g)	6.1 ± 1.1 ^b	19.0 ± 1.1 ^a	17.1 ± 1.4 ^a	<0.001
Fat mass at 30 week (g)	11.4 ± 2.0 ^c	15.8 ± 1.0 ^b	37.5 ± 1.1 ^a	<0.001
Lean mass at 14 week (g)	17.4 ± 1.8	18.4 ± 1.2	18.4 ± 1.5	0.186
Lean mass at 30 week (g)	20.4 ± 0.6	20.7 ± 0.6	22.0 ± 0.4	0.104

Values are presented as means ± SEM, n = 6 to 8 per group. One-way ANOVA was used to determine significant differences among groups followed by Fisher's LSD test. Labelled means in a row without a common letter significantly differ at $P < 0.05$.

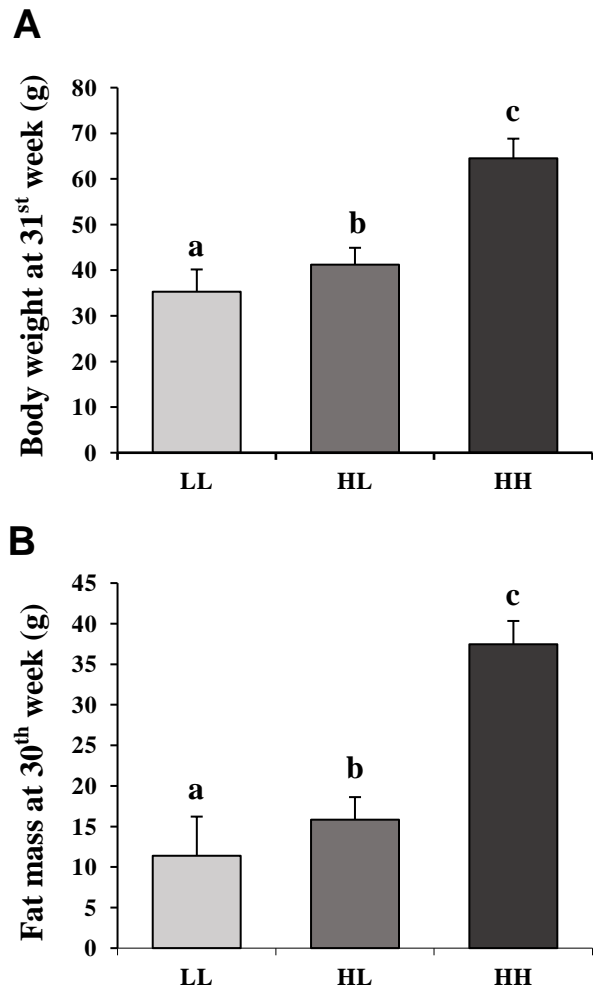


Figure 4. Body weight at 31st week (A) and fat mass at 30th week (B)

2. 혈액 분석 결과

비만 및 식이변화로 유도된 체지방량 변화가 비타민 D 대사에 미치는 영향을 알아보기 위해 주요 비타민 D 대사체의 혈중 농도를 측정하였다. 혈청 25(OH)D 농도는 군 간에 차이가 없었지만 (Figure 5A) 혈청 1,25(OH)₂D 수준은 군 간 유의적인 차이가 있었다 ($P < 0.05$). 혈청 1,25(OH)₂D 수준은 LL 군 (16.3 ± 1.7 pmol/L)에 비해 HH 군 (65.4 ± 10.1 pmol/L)에서 유의적으로 높았다. HL 군의 혈청 1,25(OH)₂D 수준 (46.7 ± 9.0 pmol/L)은 LL 군과 HH 군의 중간 수준으로 (Figure 5B) 체지방량이 감소함에 따라 HL 군의 혈청 1,25(OH)₂D 수준이 HH 군에 비해 낮아졌음을 알 수 있었다. 또한, 혈청 1,25(OH)₂D 농도는 체지방량 ($r = 0.543, P < 0.05$)과 유의적인 양의 상관관계를 나타내었다 (Figure 6A).

신장에서 1-hydroxylase 를 조절하여 혈청 1,25(OH)₂D 수준을 조절하는 호르몬인 PTH 와 FGF23 의 수준에는 어떤 변화가 있는지를 확인하였다. 혈청 PTH 수준은 군 간 차이가 유의적인 수준에는 미치지 못하였으나 경향성이 있었으며 ($P = 0.055$) LL 군에 비해 HL 군에서 53%, HH 군에서 148% 가량 높았다 (Figure 5C). 또한, 혈청 PTH 농도는 체지방량 ($r = 0.622, P < 0.05$)과 유의적인 양의 상관관계를 보여주었다 (Figure 6B). 반면, 혈청 FGF23 농도는 군 간에 차이가 없었다 (Figure 5D).

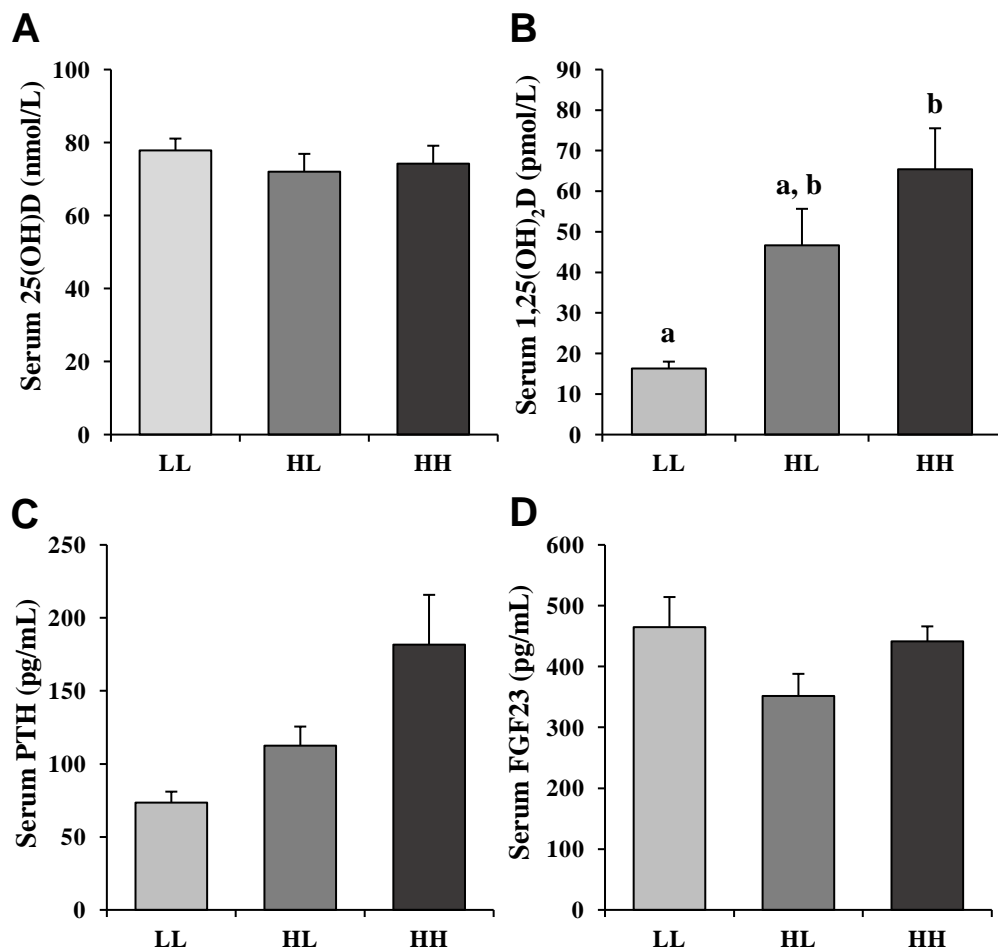


Figure 5. Serum levels of 25(OH)D (A), 1,25(OH)₂D (B), PTH (C), and FGF23 (D)

Serum levels of 25(OH)D, 1,25(OH)₂D, PTH, and FGF23 were measured by enzyme immune assay. Values are expressed as means ± SEM, n = 3 to 7 per group. One-way ANOVA was used to determine significant differences among groups followed by Fisher's LSD test. Labelled means in a row without a common letter significantly differ at $P < 0.05$.

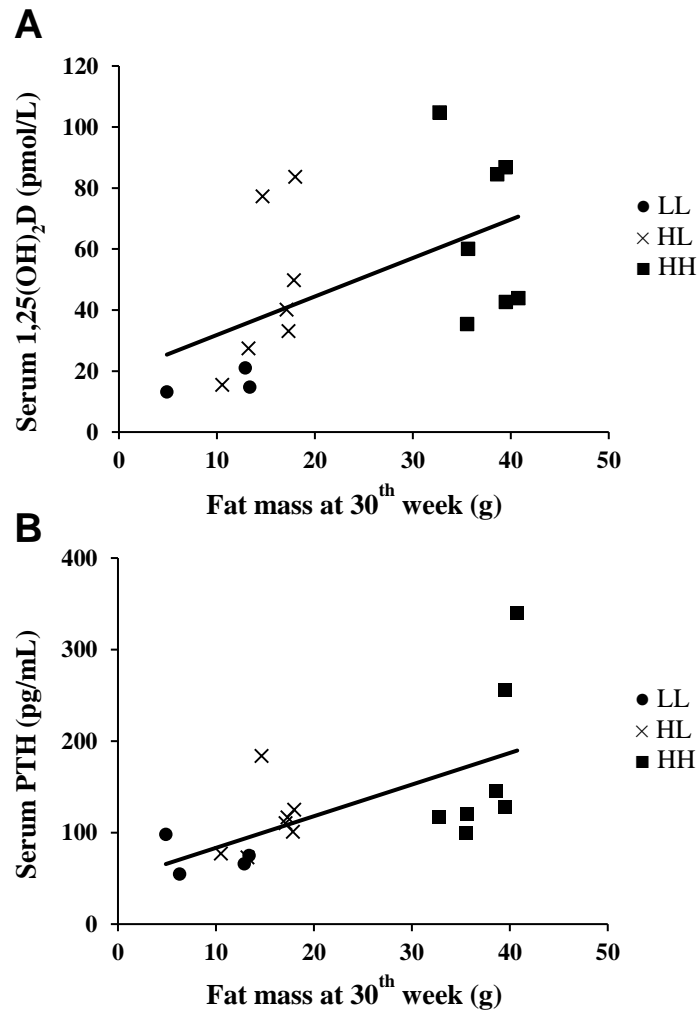


Figure 6. Correlation between serum 1,25(OH)₂D (A) or PTH (B) and body fat mass (A) Correlation between serum 1,25(OH)₂D (pmol/L) and fat mass at 30th week (g), $r = 0.543$, $P < 0.05$. (B) Correlation between serum PTH (pg/mL) and fat mass at 30th week (g), $r = 0.622$, $P < 0.05$.

3. 간 조직의 25-hydroxylase mRNA 수준

혈청 25(OH)D 생성에 작용하는 간의 25-hydroxylases 가 비만이나 식이변화로 유도된 체지방량 변화에 영향을 받는지 확인하기 위해 *Cyp2r1*, *Cyp27a1*, *Cyp2j3* 의 mRNA 수준을 비교하였다.

간 조직의 *Cyp2r1*, *Cyp27a1*, *Cyp2j3* 의 mRNA 발현량을 측정한 결과는 **Figure 7** 에 나타내었다. 세 종류의 25-hydroxylase mRNA 수준은 모두 군 간 유의적인 차이가 없었다.

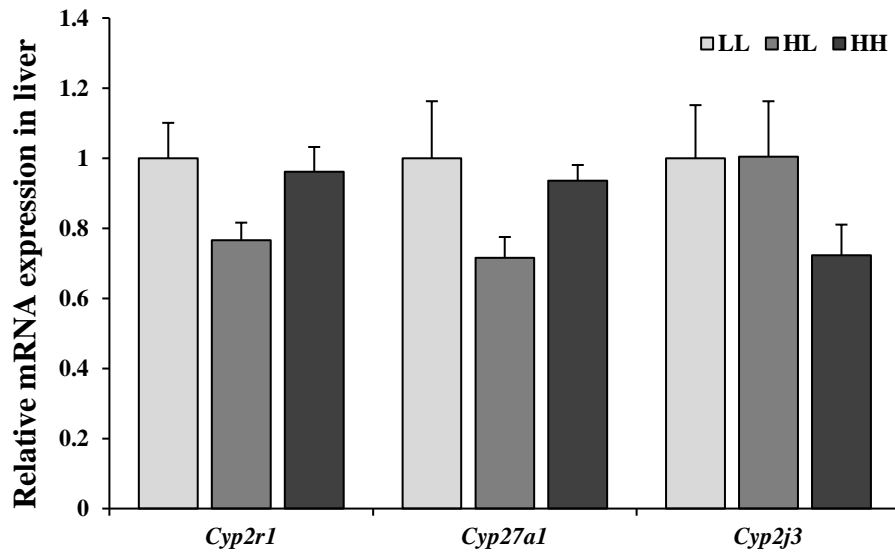


Figure 7. Hepatic mRNA levels of vitamin D 25-hydroxylases

Relative mRNA levels were measured by quantitative RT-PCR and normalized to housekeeping gene *Gapdh*. Values are presented as means \pm SEM, n = 6 to 8 per group. One-way ANOVA was used to determine significant differences among groups followed by Fisher's LSD test. Labelled means in a row without a common letter significantly differ at $P < 0.05$.

4. 신장 조직의 *Lrp2* mRNA 수준

신장 사구체에 위치한 megalin 은 25(OH)D-DBP 복합체를 재흡수하여 25(OH)D 가 체내에서 재사용 될 수 있도록 한다. 신장에서 *Lrp2* mRNA 수준은 군 간의 차이가 통계적으로 유의한 수준에는 도달하지 못하였으나 ($P=0.071$), LL 군에 비해 HL 군에서 30%, HH 군에서 50% 가량 낮았다 (**Figure 8A**). 신장의 *Lrp2* mRNA 수준은 체지방량과 음의 상관관계를 보여주었다 ($r = -0.538, P < 0.05$) (**Figure 8B**).

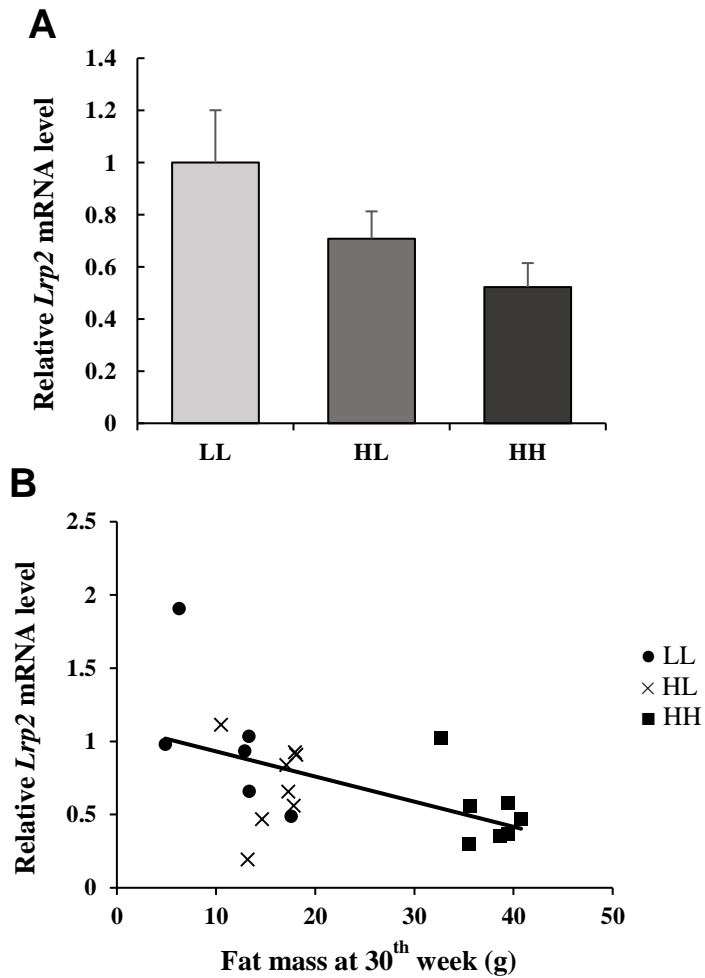


Figure 8. *Lrp2* mRNA levels in the kidney tissues (A), and correlation between *Lrp2* mRNA expression and fat mass at 30th week (B)

Relative mRNA levels were measured by quantitative RT-PCR and normalized to housekeeping gene *Gapdh*. Values are presented as means \pm SEM, n = 6 to 8 per group. One-way ANOVA was used to determine significant differences among groups followed by Fisher's LSD test. Labelled means in a row without a common letter significantly differ at $P < 0.05$.

5. 신장 조직의 1,25-dihydroxyvitamin D 조절

신장에서 1,25(OH)₂D 생성량에 관여하는 여러 지표의 mRNA 발현 정도를 측정하여 비만에 따른 혈청 1,25(OH)₂D 조절 기전을 알아보려고 하였다 (Figure 9).

신장에서 1,25(OH)₂D 는 1-hydroxylase (*Cyp27b1*)에 의해 25(OH)D 로부터 생성되고, 24-hydroxylase (*Cyp24a1*)에 의해 calcitric acid 형태로 전환되어 불활성화된다. 이 중 1-hydroxylase mRNA 발현량은 HL 군과 LL 군에서 유사하게 나타났으며 HH 군에서는 LL 군과 HL 군에 비해 유의적으로 높았다 ($P < 0.05$). 그러나 단백질 수준에서는 유의한 차이가 없었다 (Figure 10). 24-hydroxylase mRNA 수준은 군 간 유의적인 차이가 없었지만 *Vdr* mRNA 수준과 유의적인 양의 상관관계가 있었다 ($r = 0.636, P < 0.01$). 그러나 신장에서 PTH 또는 1,25(OH)₂D 와 결합하여 그 하위 작용을 일으키는 수용체인 *Pthr* 과 *Vdr* mRNA 수준은 유의적인 차이가 없었다.

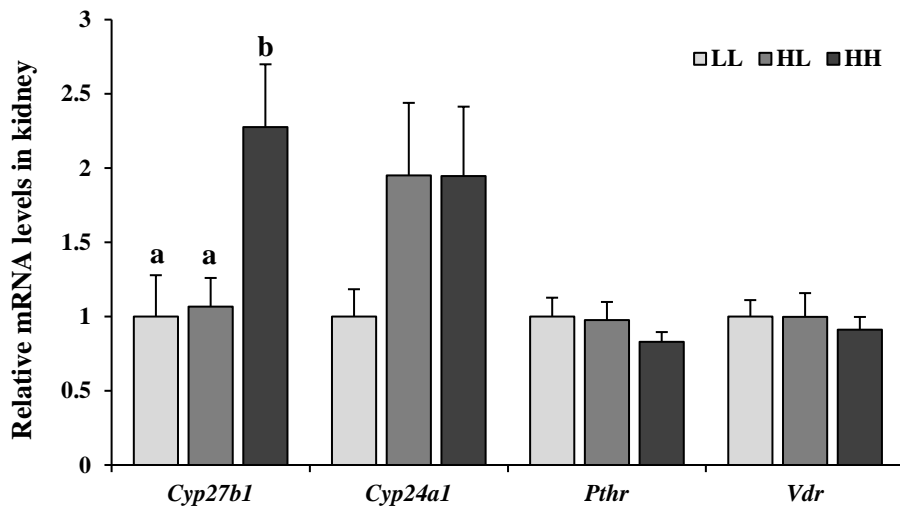


Figure 9. The mRNA levels of genes related to vitamin D metabolism in kidney

Relative mRNA levels were measured by quantitative RT-PCR and normalized to housekeeping gene *Gapdh*. Values are presented as means \pm SEM, n = 6 to 8 per group. One-way ANOVA was used to determine significant differences among groups followed by Fisher's LSD test. Labelled means in a row without a common letter significantly differ at $P < 0.05$.

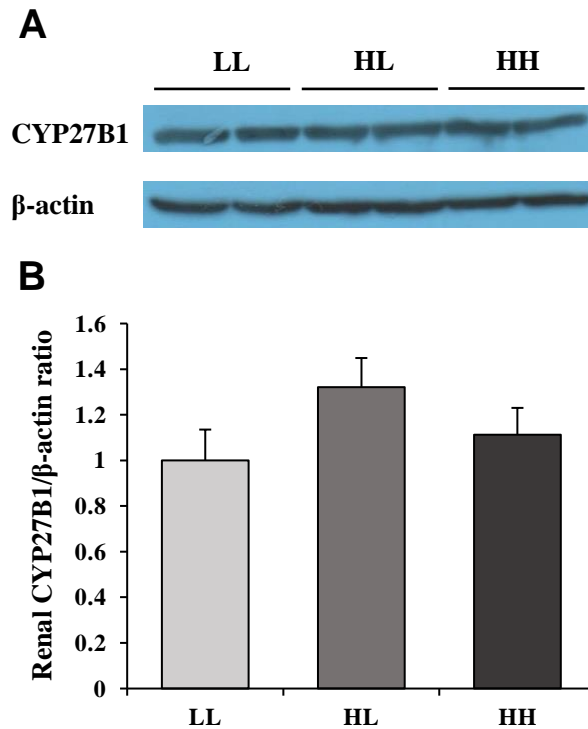


Figure 10. Renal 1-hydroxylase protein levels

Protein levels of 1-hydroxylase were measured by western blot analysis. A representative experiment is shown (A). The intensity of 1-hydroxylase band was densitometrically measured and normalized to the protein level of β -actin (B). Values are presented as means \pm SEM, n = 6 to 8 per group. One-way ANOVA was used to determine significant differences among groups followed by Fisher's LSD test.

V. 고 찰

본 연구에서는 고지방 식이로 유도된 비만 마우스에게 대조 식이를 섭취시켜 체지방량을 감소시켰을 때, 비만으로 인해 변화된 체내 비타민 D 대사가 일부 회복될 수 있음을 확인하였다. 16 주간의 식이 조절 결과 비만 마우스의 체지방량이 유의적으로 감소하였다. 체지방량의 감소는 1,25(OH)₂D 조절 기전을 부분적으로 회복시켰는데 이는 저하된 혈청 1,25(OH)₂D, 혈청 PTH 수준과 신장의 1-hydroxylase 발현량을 통해 확인할 수 있었다.

1,25(OH)₂D 는 여러 기관에서 다양한 조절 작용을 하는 활성형 비타민 D 대사체로 그 농도는 PTH 에 의해 철저히 조절된다. 그러나 비만으로 인해 나타나는 secondary hyperparathyroidism 또는 저하된 혈청 25(OH)D 수준에 의해 1,25(OH)₂D 조절 이상이 관찰되고 있다. 비만일 경우 혈청 1,25(OH)₂D 수준은 1) 신장에서 1,25(OH)₂D 의 생성을 촉진하는 PTH 가 증가함에 따라 증가할 수도 있고 (Bell et al. 1985), 2) 비만으로 인한 혈청 비타민 D 결핍 때문에 기질인 25(OH)D 농도가 감소함에 따라 감소할 수도 있다 (Camozzi et al. 2016). 이러한 1,25(OH)₂D 의 조절 이상이 체중 감량 또는 체지방량 감소에 의해 회복될 수 있는지는 아직 알려지지 않았다. 식이 조절 후 비만 환자들의 PTH 수준은 유의적으로 감소하였으나 (Christensen et al. 2012) 비만 수술에 의한 체중 감량은 소장에서의 칼슘 흡수 상태에 따라 PTH 수준을 감소시키기도 하고 (Sánchez-Hernández et al. 2005; Ruiz-Tovar et al. 2012) 유지시키기도 하였다

(Ybarra et al. 2005). 본 연구에서는 비만 마우스에게 지방 함량이 적은 식이를 섭취시켜 체지방량 감소를 유도하였다. 그 결과 계속해서 고지방 식이를 섭취한 마우스보다 체지방량이 감소한 마우스의 PTH 수준이 더 낮게 나타났으며 이는 혈청 1,25(OH)₂D 수준을 낮추는데 기여하였다.

체지방량에 따른 혈청 1,25(OH)₂D 의 변화 기전을 알아보기 위해 신장에서 혈청 1,25(OH)₂D 조절에 관여하는 유전자의 mRNA 수준을 측정하였다. 체지방량이 감소함에 따라 HL 군의 *Cyp27b1* mRNA 발현량이 LL 군과 유사한 수준으로 낮아졌는데, 이는 HL 군의 혈청 1,25(OH)₂D 수준을 낮추는데 기여했을 것으로 생각된다. 신장 근위세뇨관에서 PTH 는 *Cyp27b1* 의 주요 활성인자이므로 (Hewison et al. 2000) HL 군에서 PTH 수준이 저하됨에 따라 *Cyp27b1* 의 발현량이 감소하고 그 결과 1,25(OH)₂D 합성이 저하되었을 것으로 사료된다. 1,25(OH)₂D 는 VDR 과 결합하여 1-hydroxylase 를 억제하고 (Wang et al. 2015) 24-hydroxylase 를 활성화시킨다 (Chow et al. 2013). Chow et al. (2013)은 정상적인 생리적 조건에서 마우스에게 다양한 농도의 1,25(OH)₂D 경구투여하였을 때 VDR 단백질과 *Vdr* mRNA 수준이 증가하였다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 혈청 1,25(OH)₂D 수준에는 유의적인 차이가 나타난 반면 *Vdr* mRNA 수준에는 변화가 관찰되지 않았다. 한편, *Vdr* mRNA 수준은 신장의 *Cyp24a1* mRNA 수준과 유의적인 양의 상관관계를 보였다. *Cyp24a1* 이 VDR 의 주요 응답유전자로서 VDR 활성의 생체표지자로 사용되는 것 (Itoh et al. 1995)을 고려하면 이와 같은 결과는 체지방량이 증가함에 따라 *Vdr* 의 전사는 1,25(OH)₂D 수준의 영향을 받지 않게

되지만 *Vdr* 의 활성화는 정상적인 상태를 유지한다는 것을 의미한다. 위의 결과를 종합하면 비만에서 높아진 혈청 PTH 에 의해 신장에서 1,25(OH)₂D 생성이 증가하지만 1,25(OH)₂D 의 자가 조절 기전이 정상적으로 이루어지지 않아 비만에 의한 혈청 1,25(OH)₂D 조절 이상이 발생한 것으로 보인다. 또한, 체지방량이 감소함에 따라 혈청 1,25(OH)₂D 수준이 낮아진 것은 완화된 PTH 수준에서 기인한 것으로 사료된다.

비만인 사람들에게서 비타민 D 결핍이 더 흔하게 나타나고 있지만 (Pereira-Santos et al. 2015) 아직 그 원인은 명확하게 밝혀지지 않았다. 비만이 비타민 D 영양상태에 관여하는 조절 기전을 알아보기 위해 혈청 25(OH)D 와 간에서의 25-hydroxylase mRNA 수준을 측정하였다. 혈청 25(OH)D 수준은 군 간 차이가 없었다. 일부 연구에서는 체중 감량 후 혈청 25(OH)D 수준의 증가를 보고하였으나 (Tzotzas et al. 2010; Gangloff et al. 2015) 본 연구에서는 체지방량 감소에 따른 변화를 관찰하지 못하였다. 이것은 25(OH)D 생성을 담당하는 간의 25-hydroxylase mRNA 수준에 차이가 없었기 때문인 것으로 생각된다. Mason et al. (2011)은 체중을 15% 이상 감량하였을 때만 혈청 25(OH)D 농도가 유의적으로 증가하였다고 보고하였다. 또한, 22%의 체지방량 감량은 혈청 25(OH)D 수준을 유의적으로 증가시켰으나 (Gangloff et al. 2015), 13%의 체지방량 감량은 혈청 25(OH)D 수준에 영향을 미치지 않았다 (Piccolo et al. 2013). 이러한 결과는 일정 수준 이상의 체중 또는 체지방량을 감소하였을 때에만 혈청 25(OH)D 수준에 변화가 나타날 수 있음을 의미한다.

반면, 비만 마우스의 신장에서 *Lrp2* mRNA 수준이 낮아졌는데, 이와 같은 결과에 근거하였을 때 근위세뇨관에서 25(OH)D-DBP 복합체의 재흡수가 손상되었을 가능성을 생각해 볼 수 있다. Megalin-null 마우스에서는 심각한 비타민 D 결핍이 나타난다고 보고되었다 (Nykjaer et al. 1999). 그러나 Anderson et al. (2010)은 고지방 식이 섭취 후 Zucker diabetic fatty rat 의 *Lrp2* 발현량이 감소함에 따라 소변으로 배설된 25(OH)D 의 양이 증가하였지만 대조군과 비교하였을 때 혈청 25(OH)D 농도에 차이가 없다는 것을 보고하였다. 이와 같은 결과들은 비타민 D 대사체는 주로 담즙 배설 경로로 배설되기 (Holick 2007) 때문에 신장의 megalin 이 비타민 D 상태에 미치는 영향이 크지 않음을 시사한다. 또한, megalin 에 의해 세포 내로 endocytosis 된 25(OH)D 는 1-hydroxylase 의 기질로 이용되는데 비만 마우스에서 *Lrp2* mRNA 수준이 감소하였음에도 1,25(OH)₂D 가 높았던 것으로 보아 비만에서 나타난 1,25(OH)₂D 변화는 25(OH)D 의 가용성과는 연관성이 적은 것으로 보인다.

본 연구는 처음으로 동물 모델을 이용하여 비만도의 변화에 따른 비타민 D 대사의 변화를 살펴보았다. 그 결과, 인체 연구와 달리 다양한 영향 요인을 배제하고 통제된 환경 속에서 체지방 감량에 의한 효과만을 확인할 수 있었다. 또한, 어떤 기전으로 이러한 변화가 나타나는지를 연구하였다. 결론적으로 본 연구는 고지방 식이로 유도한 비만에서 비타민 D 대사 변화의 증거를 제시하였다. 비만 마우스에서 나타난 혈청 PTH 항진 상태는 신장에서 1-hydroxylase 발현을 증가시켜 혈청 1,25(OH)₂D 수준이 높아지도록 하였다. 더욱이, 저지방 식이 섭취에 의한

체지방량 감소는 이러한 변화를 부분적으로 회복시켰다. 이러한 결과를 통해 본 연구는 비만으로 인해 유발되는 비타민 D 대사 변화 기전과 식이변화에 따른 체지방량 감량을 통한 비타민 D 대사의 회복 가능성에 대한 새로운 정보를 제공하였다.

VI. 요약

본 연구에서는 고지방 식이로 유도된 비만 마우스에게 저지방 식이를 섭취시켜 체지방량 감소를 유도하였을 때, 비만으로 인해 발생하는 비타민 D 대사 변화의 회복 가능성을 살펴보았다. 이를 위해 마우스를 식이 섭취 유형에 따라 LL군 (저지방 → 저지방 식이), HL군 (고지방 → 저지방 식이), HH군 (고지방 → 고지방 식이)의 세 그룹으로 나누어 비타민 D 대사체와 비타민 D 대사 조절 인자들을 비교하였다.

- 1) 고지방 식이 섭취 기간 동안 꾸준히 증가하였던 HL군의 체중은 저지방 식이 섭취 시기에 그대로 유지되었고 체지방량은 감소하였다. 반면, LL군과 HH군의 체중과 체지방량은 실험 기간 내내 꾸준히 증가하여 희생 시 HL군의 체중과 체지방량은 HH군에 비해 유의적으로 낮았으며, LL군과 근접한 수준이었다.
- 2) 혈청 1,25(OH)₂D 수준은 LL군에 비해 HH군에서 유의적으로 높았고, HL군의 혈청 1,25(OH)₂D는 HH군보다 완화된 수준이었다. 혈청 PTH 수준은 군간 차이가 통계적으로 유의적이지는 않았지만 LL군에 비해 HL군에서 53%, HH군에서 148% 가량 높게 나타났다. 혈청 1,25(OH)₂D와 PTH 모두 체지방량과 유의적인 양의 상관관계가 있었다. 그러나 혈청 25(OH)D와 FGF23 농도는 군 간 유의적인 차이가 없었다.
- 3) 간의 25-hydroxylase mRNA 수준은 차이가 없었다. 신장의 *Lrp2* mRNA

수준 역시 통계적으로 유의하지 않았으나, LL군에 비해 HL군에서 30%, HH군에서 50% 가량 낮았고 체지방량과는 유의적인 음의 상관관계가 있었다.

- 4) 신장의 *Cyp27b1* mRNA 수준은 LL군과 HL군에 비해서 HH군에서 유의하게 높았지만 단백질 발현량은 유의적인 차이가 없었다. 또한 신장의 *Cyp24a1*, *Pthr*, *Vdr* mRNA 수준 모두 유의적인 차이가 없었다. 그러나 *Cyp24a1* mRNA 수준은 *Vdr* mRNA 수준과 유의적인 양의 상관관계가 있었다.

위의 결과를 통해 비만은 비타민 D 대사를 변화시키며 식이 조절에 의한 체지방 감량은 비타민 D 대사를 일부 회복시킬 수 있다는 것을 알 수 있었다. 이런 변화는 특히 1,25(OH)₂D 조절 경로에서 뚜렷하게 나타났다. 체지방량이 감소한 HL군에서 HH군에 비해 PTH가 낮은 경향을 보였고, *Cyp27b1* 발현은 LL군과 유사한 수준으로 낮아졌다. 그 결과, HL군의 평균 혈청 1,25(OH)₂D 농도가 HH군보다 낮았다. *Cyp24a1*과 *Vdr* mRNA 수준에는 군 간 차이가 없었지만 두 지표 사이에 정상적인 상관관계가 관찰되었다. 이를 통해 비만에서 나타나는 1,25(OH)₂D의 조절 이상은 비정상적인 PTH 수준의 증가와 1,25(OH)₂D의 자가 조절 이상에 의한 것임을 알 수 있었다. 한편, 체지방량에 따라 25(OH)D를 재흡수하는 신장의 *Lrp2*와 mRNA 발현량이 변하였지만 혈청 25(OH)D 농도에는 차이가 없었는데, 이는 간의 25-hydroxylases 수준에 차이가 없었기 때문인 것으로 보인다.

참 고 문 헌

- Adams, J., and M. Hewison. 2012. Extrarenal expression of the 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 523 (1):95-102.
- Aiba, I., T. Yamasaki, T. Shinki, S. Izumi, K. Yamamoto, S. Yamada, H. Terato, H. Ide, and Y. Ohyama. 2006. Characterization of rat and human CYP2J enzymes as Vitamin D 25-hydroxylases. *Steroids* 71 (10):849-856.
- Anderson, R. L., S. Ternes, K. Strand, and M. Rowling. 2010. Vitamin D homeostasis is compromised due to increased urinary excretion of the 25-hydroxycholecalciferol-vitamin D-binding protein complex in the Zucker diabetic fatty rat. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 299 (6):E959-E967.
- Bajwa, A., M. N. Forster, A. Maiti, B. L. Woolbright, and M. J. Beckman. 2008. Specific regulation of CYP27B1 and VDR in proximal versus distal renal cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 477 (1):33-42.
- Bell, N. H., S. Epstein, A. Greene, J. Shary, M. J. Oexmann, and S. Shaw. 1985. Evidence for Alteration of the Vitamin-D-Endocrine System in Obese Subjects. *Journal of Clinical Investigation* 76 (1):370-373.
- Bell, N. H., S. Shaw, and R. Turner. 1984. Evidence that 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits the hepatic production of 25-hydroxyvitamin D in man. *Journal of Clinical Investigation* 74 (4):1540.
- Bikle, D. 2009. Nonclassic actions of vitamin D. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 94 (1):26-34.
- Brannon, P. M., E. A. Yetley, R. L. Bailey, and M. F. Picciano. 2008. Overview of the conference "Vitamin D and Health in the 21st Century: an Update". *Am J Clin Nutr* 88 (2):483S-490S.
- Brenza, H. L., and H. F. DeLuca. 2000. Regulation of 25-hydroxyvitamin D 3 1 α -hydroxylase gene expression by parathyroid hormone and 1, 25-

- dihydroxyvitamin D₃. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 381 (1):143-152.
- Camozzi, V., A. Frigo, M. Zaninotto, F. Sanguin, M. Plebani, M. Boscaro, L. Schiavon, and G. Luisetto. 2016. 25-Hydroxycholecalciferol response to single oral cholecalciferol loading in the normal weight, overweight, and obese. *Osteoporosis International*:1-10.
- Chow, E. C., H. P. Quach, R. Vieth, and K. S. Pang. 2013. Temporal changes in tissue 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃, vitamin D receptor target genes, and calcium and PTH levels after 1,25(OH)₂D₃ treatment in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 304 (9):E977-989.
- Christakos, S., P. Dhawan, A. Verstuyf, L. Verlinden, and G. Carmeliet. 2016. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev* 96 (1):365-408.
- Christensen, P., E. M. Bartels, B. F. Riecke, H. Bliddal, A. R. Leeds, A. Astrup, K. Winther, and R. Christensen. 2012. Improved nutritional status and bone health after diet-induced weight loss in sedentary osteoarthritis patients: a prospective cohort study. *Eur J Clin Nutr* 66 (4):504-509.
- Ding, C., D. Gao, J. Wilding, P. Trayhurn, and C. Bing. 2012. Vitamin D signalling in adipose tissue. *Br J Nutr* 108 (11):1915-1923.
- Drincic, A. T., L. A. G. Armas, E. E. Van Diest, and R. P. Heaney. 2012. Volumetric Dilution, Rather Than Sequestration Best Explains the Low Vitamin D Status of Obesity. *Obesity* 20 (7):1444-1448.
- Feldman, D., A. V. Krishnan, S. Swami, E. Giovannucci, and B. J. Feldman. 2014. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nature reviews cancer* 14 (5):342-357.
- Gangloff, A., J. Bergeron, E. Pelletier-Beaumont, J. A. Nazare, J. Smith, A. L. Borel, I. Lemieux, A. Tremblay, P. Poirier, N. Almeras, and J. P. Despres. 2015. Effect of adipose tissue volume loss on circulating 25-hydroxyvitamin D levels: results from a 1-year lifestyle intervention in viscerally obese men.

Int J Obes (Lond).

- Grethen, E., R. McClintock, C. E. Gupta, R. Jones, B. M. Cacucci, D. Diaz, A. D. Fulford, S. M. Perkins, R. V. Considine, and M. Peacock. 2011. Vitamin D and hyperparathyroidism in obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 96 (5):1320-1326.
- Haussler, M. R., G. K. Whitfield, I. Kaneko, C. A. Haussler, D. Hsieh, J.-C. Hsieh, and P. W. Jurutka. 2013. Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calcified tissue international* 92 (2):77-98.
- Heaney, R. P., R. L. Horst, D. M. Cullen, and L. A. Armas. 2009. Vitamin D3 distribution and status in the body. *Journal of the American College of Nutrition* 28 (3):252-256.
- Henry, H. L. 2001. The 25 (OH) D 3/1 α , 25 (OH) 2 D 3-24R-hydroxylase: a catabolic or biosynthetic enzyme? *Steroids* 66 (3):391-398.
- . 2011. Regulation of vitamin D metabolism. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 25 (4):531-541.
- Hewison, M., D. Zehnder, R. Bland, and P. Stewart. 2000. 1 α ph-Hydroxylase and the action of vitamin D. *Journal of Molecular Endocrinology* 25 (2):141-148.
- Holecki, M., B. Zahorska-Markiewicz, A. Więcek, K. Mizia-Stec, T. Nieszporek, and A. Żak-Gołąb. 2008. Influence of Calcium and Vitamin D Supplementation on Weight and Fat Loss in Obese Women. *Obesity Facts* 1 (5):274-279.
- Holick, M. F. 2007. Vitamin D deficiency. *New England Journal of Medicine* 357 (3):266-281.
- Itoh, S., T. Yoshimura, O. Iemura, E. Yamada, K. Tsujikawa, Y. Kohama, and T. Mimura. 1995. Molecular cloning of 25-hydroxyvitamin D-3 24-hydroxylase (Cyp-24) from mouse kidney: its inducibility by vitamin D-3. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 1264 (1):26-28.

- Jones, G., S. A. Strugnell, and H. F. DeLuca. 1998. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiological Reviews* 78 (4):1193-1231.
- Kitson, M. T., and S. K. Roberts. 2012. D-livering the message: The importance of vitamin D status in chronic liver disease. *Journal of Hepatology* 57 (4):897-909.
- Konradsen, S., H. Ag, F. Lindberg, S. Hexeberg, and R. Jorde. 2008. Serum 1,25-dihydroxy vitamin D is inversely associated with body mass index. *Eur J Nutr* 47 (2):87-91.
- Mason, C., L. Xiao, I. Imayama, C. R. Duggan, C. Bain, K. E. Foster-Schubert, A. Kong, K. L. Campbell, C.-Y. Wang, and M. L. Neuhouser. 2011. Effects of weight loss on serum vitamin D in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 94 (1):95-103.
- Nykjaer, A., D. Dragun, D. Walther, H. Vorum, C. Jacobsen, J. Herz, F. Melsen, E. I. Christensen, and T. E. Willnow. 1999. An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D 3. *Cell* 96 (4):507-515.
- Omdahl, J. L., H. A. Morris, and B. K. May. 2002. Hydroxylase enzymes of the vitamin D pathway: expression, function, and regulation. *Annu Rev Nutr* 22:139-166.
- Pereira-Santos, M., P. Costa, A. Assis, C. Santos, and D. Santos. 2015. Obesity and vitamin D deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews* 16 (4):341-349.
- Perwad, F., M. Y. H. Zhang, H. S. Tenenhouse, and A. A. Portale. 2007. Fibroblast growth factor 23 impairs phosphorus and vitamin D metabolism in vivo and suppresses 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase expression in vitro. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 293 (5):F1577-F1583.
- Peterson, L. A., X. Zeng, C. P. Caufield-Noll, M. A. Schweitzer, T. H. Magnuson, and K. E. Steele. 2016. Vitamin D Status and Supplementation Before and After Bariatric Surgery: A Comprehensive Literature Review. *Surgery for*

Obesity and Related Diseases.

- Piccolo, B. D., G. Dolnikowski, E. Seyoum, A. P. Thomas, E. R. Gertz, E. C. Souza, L. R. Woodhouse, J. W. Newman, N. L. Keim, S. H. Adams, and M. D. Van Loan. 2013. Association between Subcutaneous White Adipose Tissue and Serum 25-Hydroxyvitamin D in Overweight and Obese Adults. *Nutrients* 5 (9):3352-3366.
- Pourshahidi, L. K. 2015. Vitamin D and obesity: current perspectives and future directions. *Proc Nutr Soc* 74 (2):115-124.
- Ramagopalan, S. V., A. Heger, A. J. Berlanga, N. J. Maugeri, M. R. Lincoln, A. Burrell, L. Handunnetthi, A. E. Handel, G. Disanto, S.-M. Orton, C. T. Watson, J. M. Morahan, G. Giovannoni, C. P. Ponting, G. C. Ebers, and J. C. Knight. 2010. A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: Associations with disease and evolution. *Genome Research* 20 (10):1352-1360.
- Rosen, H., A. Reshef, N. Maeda, A. Lippoldt, S. Shpizen, L. Triger, G. Eggertsen, I. Björkhem, and E. Leitersdorf. 1998. Markedly Reduced Bile Acid Synthesis but Maintained Levels of Cholesterol and Vitamin D Metabolites in Mice with Disrupted Sterol 27-Hydroxylase Gene. *Journal of Biological Chemistry* 273 (24):14805-14812.
- Rosenstreich, S. J., C. Rich, and W. Volwiler. 1971. Deposition in and release of vitamin D₃ from body fat: evidence for a storage site in the rat. *The Journal of Clinical Investigation* 50 (3):679-687.
- Ruiz-Tovar, J., I. Oller, A. Tomas, C. Llaverro, A. Arroyo, A. Calero, A. Martinez-Blasco, and R. Calpena. 2012. Mid-term effects of sleeve gastrectomy on calcium metabolism parameters, vitamin D and parathormone (PTH) in morbid obese women. *Obesity surgery* 22 (5):797-801.
- Sánchez-Hernández, J., J. Ybarra, I. Gich, A. De Leiva, X. Rius, J. Rodríguez-Espinosa, and A. Pérez. 2005. Effects of bariatric surgery on vitamin D status and secondary hyperparathyroidism: a prospective study. *Obesity*

surgery 15 (10):1389-1395.

- Shimada, T., H. Hasegawa, Y. Yamazaki, T. Muto, R. Hino, Y. Takeuchi, T. Fujita, K. Nakahara, S. Fukumoto, and T. Yamashita. 2004. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *Journal of Bone and Mineral Research* 19 (3):429-435.
- Shinkyō, R., T. Sakaki, M. Kamakura, M. Ohta, and K. Inouye. 2004. Metabolism of vitamin D by human microsomal CYP2R1. *Biochemical and biophysical research communications* 324 (1):451-457.
- Signori, C., K. C. Zalesin, B. Franklin, W. L. Miller, and P. A. McCullough. 2010. Effect of Gastric Bypass on Vitamin D and Secondary Hyperparathyroidism. *Obesity surgery* 20 (7):949-952.
- Takeyama, K.-i., S. Kitanaka, T. Sato, M. Kobori, J. Yanagisawa, and S. Kato. 1997. 25-Hydroxyvitamin D3 1 α -Hydroxylase and Vitamin D Synthesis. *Science* 277 (5333):1827-1830.
- Theodoropoulos, C., C. Demers, J.-L. Petit, and M. Gascon-Barré. 2003. High sensitivity of rat hepatic vitamin D3-25 hydroxylase CYP27A to 1, 25-dihydroxyvitamin D3 administration. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 284 (1):E138-E147.
- Tzotzas, T., F. G. Papadopoulou, K. Tziomalos, S. Karras, K. Gastaris, P. Perros, and G. E. Krassas. 2010. Rising serum 25-hydroxy-vitamin D levels after weight loss in obese women correlate with improvement in insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 95 (9):4251-4257.
- Vimaleswaran, K. S., D. J. Berry, C. Lu, E. Tikkanen, S. Pilz, L. T. Hiraki, J. D. Cooper, Z. Dastani, R. Li, D. K. Houston, A. R. Wood, K. Michaelsson, L. Vandenput, L. Zgaga, L. M. Yerges-Armstrong, M. I. McCarthy, J. Dupuis, M. Kaakinen, M. E. Kleber, K. Jameson, N. Arden, O. Raitakari, J. Viikari, K. K. Lohman, L. Ferrucci, H. Melhus, E. Ingelsson, L. Byberg, L. Lind, M. Lorentzon, V. Salomaa, H. Campbell, M. Dunlop, B. D. Mitchell, K. H. Herzog, A. Pouta, A. L. Hartikainen, G. C. Genetic Investigation of

- Anthropometric Traits, E. A. Streeten, E. Theodoratou, A. Jula, N. J. Wareham, C. Ohlsson, T. M. Frayling, S. B. Kritchevsky, T. D. Spector, J. B. Richards, T. Lehtimäki, W. H. Ouwehand, P. Kraft, C. Cooper, W. Marz, C. Power, R. J. Loos, T. J. Wang, M. R. Jarvelin, J. C. Whittaker, A. D. Hingorani, and E. Hyppönen. 2013. Causal relationship between obesity and vitamin D status: bi-directional Mendelian randomization analysis of multiple cohorts. *PLoS Med* 10 (2):e1001383.
- Wang, Y., J. Zhu, and H. F. DeLuca. 2015. The vitamin D receptor in the proximal renal tubule is a key regulator of serum 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3). *Am J Physiol Endocrinol Metab* 308 (3):E201-205.
- Wohrle, S., O. Bonny, N. Beluch, S. Gaulis, C. Stamm, M. Scheibler, M. Müller, B. Kinzel, A. Thuery, J. Brueggen, N. E. Hynes, W. R. Sellers, F. Hofmann, and D. Graus-Porta. 2011. FGF receptors control vitamin D and phosphate homeostasis by mediating renal FGF-23 signaling and regulating FGF-23 expression in bone. *J Bone Miner Res* 26 (10):2486-2497.
- Wortsman, J., L. Y. Matsuoka, T. C. Chen, Z. Lu, and M. F. Holick. 2000. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr* 72 (3):690-693.
- Yamasaki, T., S. Izumi, H. Ide, and Y. Ohyama. 2004. Identification of a Novel Rat Microsomal Vitamin D3 25-Hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry* 279 (22):22848-22856.
- Ybarra, J., J. Sánchez-Hernández, I. Gich, A. De Leiva, X. Rius, J. Rodríguez-Espinosa, and A. Pérez. 2005. Unchanged hypovitaminosis D and secondary hyperparathyroidism in morbid obesity after bariatric surgery. *Obesity surgery* 15 (3):330-335.
- Zhu, J., and H. F. DeLuca. 2012. Vitamin D 25-hydroxylase—Four decades of searching, are we there yet? *Archives of Biochemistry and Biophysics* 523 (1):30-36.
- Zhu, J. G., J. T. Ochalek, M. Kaufmann, G. Jones, and H. F. DeLuca. 2013. CYP2R1 is a major, but not exclusive, contributor to 25-hydroxyvitamin D production

in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (39):15650-15655.

Abstract

The effect of fat mass reduction in obese mice induced by diet modulation on vitamin D metabolism

Youngsun Jung

Department of Food and Nutrition

The Graduate School

Seoul National University

Altered regulation of major vitamin D metabolites, 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) and 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25(OH)₂D), were observed in high fat diet (HFD)-induced obesity. We investigated whether HFD-induced changes in vitamin D metabolism could be reversed by decreasing fat mass by changing from a HFD to a lower fat diet. Five-week-old C57BL/6 mice were assigned to LL, HH, or HL groups. LL group was fed control diet containing 10% kcal fat for 31 weeks, HH group was fed HFD containing 60% kcal fat for 31 weeks, and HL group was fed HFD for 15 weeks then switched to the control diet for the remaining 16 weeks. Serum levels of vitamin D metabolites and hormones related to vitamin D

metabolism were determined by enzyme immunoassay. The mRNA levels of genes related to vitamin D metabolism in liver and kidney were measured by real time PCR. Renal 1-hydroxylase protein level was determined by Western blot analysis. Body weight and fat mass of the HL group were significantly lower than the HH group and similar to those of the LL group. Serum 1,25(OH)₂D levels were significantly higher in the HH group than the LL group, while that of the HL group was lower than the HH group. Serum parathyroid hormone levels were not significantly different among groups ($P = 0.055$), but showed a significantly positive association with body adiposity ($r = 0.622$). Renal 1-hydroxylase (*Cyp27b1*) mRNA levels were significantly higher in the HH group compared with the LL and HL groups. Renal 24-hydroxylase (*Cyp24a1*) mRNA levels were not significantly different but showed significantly positive correlation with vitamin D receptor (*Vdr*) mRNA levels ($r = 0.636$). No significant difference was found in serum 25(OH)D levels and mRNA levels of hepatic 25-hydroxylases. Renal megalin (*Lrp2*), which reabsorbed 25(OH)D in kidney, mRNA levels were not significantly different among groups ($P=0.071$), but showed a significantly negative correlation with fat mass ($r = -0.538$). In conclusion, reducing body adiposity by switching to a lower fat diet can partially restore altered vitamin D metabolism in HFD-induced obesity in mice.

Keywords: Obesity; Diet modulation; Fat loss; Vitamin D; Parathyroid Hormone