



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](#)

약학석사학위논문

고지방식이에 의한 랫트의  
간지방축적에 베타인의 억제효과

2014년 8월

서울대학교 대학원  
약학과 예방약학 전공  
최 유 진

## 요약(국문초록)

비알코올성 지방간질환은 단순 지방축적부터 지방간염, 간경변 및 간암에 이르는 넓은 범위를 포함하는 만성 간질환이다. Betaine 은 메틸기 공여체로서 선행연구에서 황함유 아미노산 대사 변화를 통하여 간독성에 보호효과를 나타낸다고 보고되었다. 그러나 비알코올성 지방간질환에서의 betaine 의 효과 및 기전에 대해서는 알려진 것이 없다. 본 연구에서는 비알코올성 지방간질환의 초기단계인 지방축적에 대한 betaine 의 항지간 효과와 그 기전에 대해 연구하였다.

7주령의 수컷 랫트를 식이에 따라 6마리씩 4군으로 나누고 (정상식이군(NC); 정상식이와 betaine 병용군(NB); 고지방식이군(HF); 고지방식이와 betaine 병용군(HB)) 3주간 공급하였다. 식이는 모두 liquid diet 이며 betaine 은 1 %(w/v) 로 식이에 혼합하여 공급했다. 고지방 식이는 간의 중성지방과 콜레스테롤을 상승시켰고 에너지 대사를 조절하는 AMP-activated protein kinase (AMPK) 의 불활성화와 지방산 합성에 필요한 acetyl-coA carboxylase (ACC) 활성화를 유도했다. 또한 지방산 합성에 관여하는 liver-X-receptor  $\alpha$  (LXR  $\alpha$ ) 와 sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) 의 활성형 발현을 증가시켰다. 고지방식이와 betaine 의 병용공급은 위의 현상을 완화시켰다. 조직 염색법을 통해 지방 축적의 감소를 확인하였고 간의 중성지방 및 콜레스테롤이 감소하였으나 혈액에서는 오히려 증가하여 상반된 결과를 보였다. Betaine 병용투여는 AMPK 의 활성화 및 ACC 불활성화를 NC 군 수준으로 회복시켰다. 또

LXR $\alpha$  와 SREBP-1c 활성형 역시 NC 군 수준으로 감소하였다. 이상의 효과가 황함유 아미노산 대사와 어떤 관계가 있는지 확인하고자 간에서의 betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) 와 homocysteine, S-adenosylmethionine (SAM) 를 측정하였다. 고지방 식이는 BHMT 발현을 감소시켰고 homocysteine 농도의 증가, SAM 농도의 감소를 보였으며 betaine 병용공급은 BHMT 발현을 유의적으로 상승시키고, homocysteine 농도를 감소시켰으며, SAM 농도를 증가시켰다. 한편 betaine 이 간으로부터 혈액으로의 지방 배출에 주는 변화를 조사하기 위해 간의 apolipoprotein B (ApoB) 발현과 혈중 phosphatidylcholine (PC) 농도를 측정하였다. HF 군은 ApoB 발현의 유의적 차이가 없었고 혈중 PC 농도는 감소했으며 NB, HB 군에서 ApoB 증가와 혈중 PC 농도 증가를 확인했다.

연구결과를 종합하면, 이 실험결과는 고지방식으로 유도된 지방간 초기단계에서 betaine 의 병용공급은 lipogenesis 관련 인자들의 변화와 BHMT 발현에 의한 homocysteine의 감소를 통해 지방생성을 감소시키고, ApoB와 PC 를 증가시켜 간의 지방 배출을 증가시키는 기전을 통해 항지방간 효과를 보이며 이와 같은 작용은 betaine 에 의한 간내 황함유 아미노산 대사 변화와 관련 있음을 강력하게 시사한다.

**주요어 :** 비알코올성 지방간질환, Lipogenesis, Lipid secretion,  
Homocysteine, Betaine, 황함유 아미노산 대사

**학 번 :** 2012-23603

# 목 차

국문초록 .....	1
목 차 .....	3
List of Tables .....	5
List of Figures .....	6
서 론 .....	8
실험 재료 및 방법 .....	13
1. 시약 및 화학물질 .....	13
2. 동물 실험 모델 .....	15
3. 혈액 및 조직의 분획 분리 .....	17
4. Oil Red O 염색법 .....	18
5. Homocysteine 함량 측정 .....	18
6. S-adenosylmethionine (SAM) 함량 측정 .....	19
7. 혈액의 Phosphatidylcholine (PC) 함량 측정 .....	20
8. 단백질 함량 측정 .....	20
9. 단백질 발현 측정 .....	21
10. 통계 처리 .....	22

<b>결 과</b> .....	<b>23</b>
1. 고지방 식이와 betaine 의 병용공급이 몸무게 및 간의 지방축적에 미치는 영향 .....	23
2. 고지방 식이와 betaine 의 병용공급이 혈액의 지질 농도에 미치는 영향 .....	26
3. 고지방 식이와 betaine 의 병용공급이 간의 lipogenesis 에 미치는 영향 .....	28
4. 고지방 식이와 betaine 의 병용공급이 황함유 아미노산 대사에 미치는 영향 .....	33
5. 고지방 식이와 betaine 의 병용공급이 간의 lipid secretion 에 미치는 영향 .....	38
<b>고 찰</b> .....	<b>41</b>
<b>결 론</b> .....	<b>47</b>
<b>참고문헌</b> .....	<b>49</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>57</b>

## List of Tables

Table 1. Composition of the liquid diets .....	16
Table 2. Changes in body weight and liver lipids .....	24
Table 3. Changes in serum lipids .....	27

## List of Figures

Figure 1. Structures of choline and betaine .....	9
Figure 2. Sulfur-containing amino acid metabolism .....	10
Figure 3. Liver Histopathology .....	25
Figure 4. The effects of betaine on hepatic expression of pAMPK and pACC protein .....	29
Figure 5. The effects of betaine on hepatic expression of LXR $\alpha$ protein .....	31
Figure 6. The effects of betaine on hepatic expression of SREBP-1c protein .....	32
Figure 7. The effects of betaine on hepatic expression of BHMT protein .....	34
Figure 8. The effects of betaine on homocysteine levels .....	36
Figure 9. The effects of betaine on S-adenosylmethionine levels in liver .....	37



Figure 10. The effects of betaine on hepatic expression of ApoB protein ..... 39

Figure 11. The effects of betaine on serum PC levels ..... 40

Figure 12. Proposed mechanisms of anti-steatotic action by betaine ..... 48

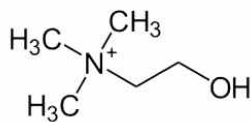
## 서 론

비알코올성 지방간질환 (Non-alcoholic fatty liver, NAFLD) 은 알코올 섭취, 약물의 복용, 기타 다른 원인에 의한 간질환 등이 없으면서 간 무게의 5% 를 초과하는 지방의 축적이 보이는 질환이다. 서구인의 경우 전체인구에서 20~30% 유병율을 보이며 비만, 2형 당뇨병 환자의 경우 25~75% 유병율을 보인다. NAFLD 는 염증을 동반하지 않는 단순 지방간부터 지방간염, 간 섬유화 및 간경변증에 이르는 넓은 범위를 포함한다 (Duvnjak al., 2001). 지금까지 많은 연구들에서 비만, 인슐린 저항성, 2형 당뇨병, 고혈압, 지질대사이상 및 대사증후군과 밀접한 관련 있음이 보고되었으며 (Farrell et al., 2006; Ye et al., 2007) 지방간 악화의 병인에 대한 연구가 계속되고 있지만, 명확한 병리기전은 아직 밝혀지지 않았다.

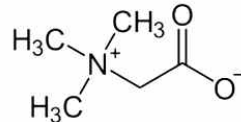
NAFLD 의 병인에 대한 여러 가지 이론 중 일반적으로 알려진 "two-hit" 가설에 따르면, 첫 단계로 지질 대사의 불균형에 의해 간의 지방 축적이 생기고, 인슐린 저항성, 지방독성, 염증성 사이토카인 및 아디포카인, 미토콘드리아 기능 이상, 산화적 스트레스 등의 이차적인 요인에 의해 지방간염 및 섬유화로 진행된다 (Day and James OF, 1998; Dowman, JK et al., 2010).

최근에 지방 축적이 지방간질환의 시작단계 뿐만 아니라 지방간염으로의 악화에 중요한 요인으로 작용한다는 연구들이 증가함에 따라 (Yang et al., 1997) NAFLD 초기단계에서의 간지방축적 완화는 중요한 치료 타겟으로 고려되고 있다.

Betaine 은 비트, 무, 구기자 또는 오징어, 새우 등 동식물에 함유되어 있어 음식을 통해 공급받거나 체내에서 choline dehydrogenase 와 betaine aldehyde dehydrogenase 에 의한 산화과정을 통해 생성된다 (Elango et al. 2010).



Choline (trimethyletanolamine)



Betaine (trimethylglycine)

Figure 1. Structures of choline and betaine

Betaine 은 주로 간과 신장에서 발현하는 betaine homocysteine methyltransferase (BHMT) 와 여러조직에 분포하는 methionine synthase (MS) 에 의해 homocysteine 에 메틸기를 전달하고 dimethylglycine 으로 전환되며, Homocysteine 제거와 methionine 합성을 통해 간내 황 함유 아미노산 대사에 기여한다 (Finkelstein, 2000).

황 함유 아미노산 대사는 황을 함유하는 아미노산인 methionine, cysteine 을 포함하며 transsulfuration pathway를 통해 최종적으로 taurine 과 glutathione 을 생성한다 (Finkelstein, 1990) (Figure 2). Methionine 은 methionine adenosyltransferase (MAT) 에 의해 S-adenosylmethionine (SAM) 으로 전환되며 methyltransferase 에 의해 메틸기를 전달하고 S-adenosylhomocysteine (SAH) 으로 전환

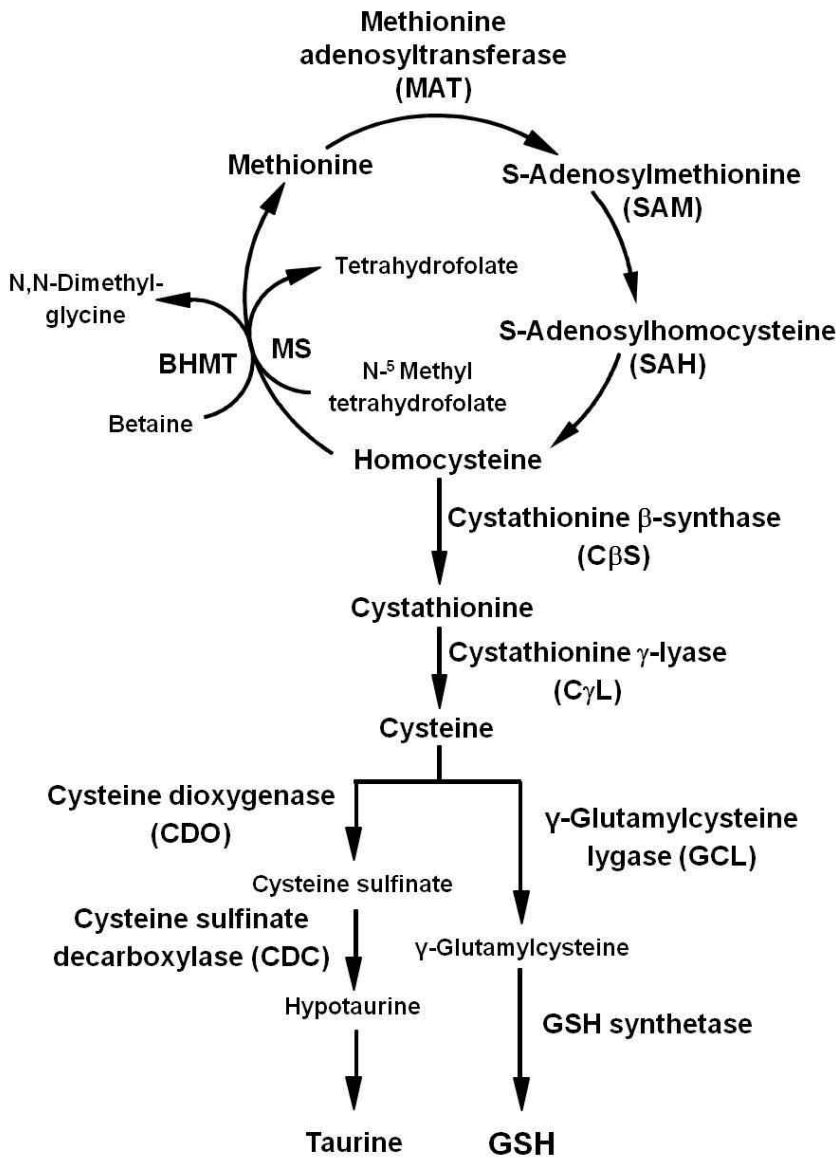


Figure 2. Sulfur-containing amino acid metabolism

된다. SAM 은 체내 신호 전달 및 methylation 이 요구되는 다양한 반응에 사용되며 세포막 구성에 필요한 phosphatidylcholine (PC) 의 합성 및 직접적인 항산화제로 작용한다 (Cole et al. 2012). SAH 는 가역적으로 SAH hydrolase 에 의해 분해되면서 homocysteine 과 adenosine 을 생성한다 (Eloranta and Kajander, 1984). Homocysteine 은 황함유 아미노산 대사에 중요한 조절 단계에 위치 하며, homocysteine 농도의 증가는 만성 간질환, 간경변 및 간암과 관련 있으며, 당뇨나 심혈관 질환에도 위험 요인으로 알려져 있다 (Cheng et al., 2011).

Betaine의 투여는 methionine 을 섭취한 정상 성인의 혈중 homocysteine 농도의 급격한 증가를 차단하고 (Steenge et al., 2003), 마우스의 간에서 methionine 과 S-adenosylmethionine (SAM) 농도를 상승시킨다 (Kim et al., 2005a). 이는 betaine 섭취에 의한 BHMT 상승과 관련이 있다 (Finkelstein et al., 1983). 선행 연구 및 여러 실험들을 통해 betaine 은 ethanol, lipopolysaccharide,  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate, dimethylnitrosamine 등의 다양한 독성 물질에 대한 간보호 효과가 확인되었다 (Barak et al., 2002; Kim et al., 2002; Kim et al., 2005b; Kim et al., 2009; Jung et al., 2013). 이 독성물질들의 간손상은 황함유 아미노산 대사의 변화를 수반하였고 betaine의 투여는 transsulfuration pathway의 조절을 통해 간손상을 완화시켰다.

비알코올성 지방간질환을 가진 성인에게 betaine 을 투여하여 생화학적, 조직학적 검사를 통해 지방간의 완화를 확인하였다 (Abdelmalek et al., 2001, 2009). 고지방 식이로 유도된 지방간 랫트에서 betaine 에 의한 지방간의 완화도 보고되었다 (Zhang et al.,

2013). 선행연구의 결과에 따르면 에탄올을 6주간 투여한 알코올성 지방간 랫트에서 지방 축적 증가와 항산화 능력의 감소 및 SAM, GSH 농도 감소가 나타났고 (Jung et al., 2013) 고지방 식이로 유도된 비알코올성 지방간 랫트에서도 위와 같은 결과를 보였다 (Kwon et al., 2009). 이 두 모델에서 betaine의 투여는 모두 지방 축적을 완화하였으며 항산화 능력 및 SAM, GSH 농도의 감소를 회복시켜 지방간의 완화 효과를 보였다. 그러나 지방간모델에서 betaine의 지방 축적 완화가 어떤 기전을 통해 일어나며 그것이 betaine에 의한 황 함유 아미노산 대사의 변화와 관련이 있는지는 밝혀지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 비알코올성 지방간의 초기단계에서 나타나는 간의 지방 축적에 대한 betaine의 작용기전을 밝히기 위하여 lipogenesis 관련 인자들의 발현 변화 및 lipid secretion 관련 인자들을 측정하여 고지방 식이에 의한 간내 지방 축적 원인 및 이에 대한 betaine의 보호효과를 측정하고 이것이 선행 연구들에서 확인된 betaine의 황 함유 아미노산 대사 변화에 의한 것인지 알아보았다.

# 실험 재료 및 방법

## 1. 실험재료

### 1.1. 시약 및 화학물질

Ammonium phosphate, 1-Heptane sulfonic acid, S-adenosyl methionine, DL-homocysteine, boric acid, folin-cioalteau's phenol reagent, free glycerol reagent, glycerol standard, 4-nitrophenol, 2-mercaptoethanol, sodium acetate, tetramethylethylenediamine (TEMED), bromophenol blue, iodoacetic acid, naphthol blue black, *O*-phthalaldehyde (OPA), 5-sulfosalicylic acid (SSA), acetonitrile, tetrahydrofuran, trichloroacetic acid, triglyceride reagent, 4-Aminoantipyrine, calcium chloride dihydrate, choline oxidase, horseradish peroxidase, phosphatidylcholine standard 는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 에서 구입하였다. Chloroform 은 Merck&Co. 에서 구입하였다. Triethylamine 은 ICN biomedical Inc. (Irvine, California) 에서 구입하였다. Optimal cutting temperature compound 는 Sakura Finetek USA Inc. (Torrance, CA, USA) 에서 구입하였다. Glycerol, Tris-acid 는 Amresco Inc. (Cochran Road Solon, OH, USA) 에서 구입하였다. PC-specific phospholipase D 은 Biomol (Plymouth Meeting, PA) 에서 구입하였다. N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline, sodium salt 는 Dojindo Molecular Technologies, Inc. (Japan) 에서 구입하였다. Diethyl ether, hydrogen chloride (HCl) 는 Daejung

Chemicals & Metals Co. (경기도 시흥시) 에서 구입하였다. Ethanol, sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl), Propylene glycol, sodium hydroxide, perchloric acid, formaldehyde, acetic acid, triton X-100 은 Duksan Pure Chemical Co. (경기도 안산시) 에서 구입하였다. Skim milk, Bis/Acryl amide solution, amido black, ECL reagent, bovine serum albumin (BSA) 은 reagent grade 또는 그 이상의 품질을 사용하였다.

High performance liquid chromatography (HPLC) 분석에 사용한 methanol 은 Burdick and Jackson 사 (Muskegon, MI, USA) 에서 구입하였다. 그 외, 실험에 사용한 모든 시약은 reagent grade 또는 그 이상의 품질을 사용하였다.

## 1.2. 항체

Anti-BHMT polyclonal 항체는 Everest Biotechnology (San Diego, CA)에서 구입하였다. Anti-FAS, SREBP-1c, LXRA, ApoB, GAPDH polyclonal 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 에서 구입하였다. Anti-ACC, phosphorylated AMPK, phosphorylated ACC polyclonal 항체는 Cell Signaling Technology (Denver, CO, USA)에서 구입하였다.

모든 1 차 항체는 5 % 의 BSA 에 적절한 비율로 희석하여 사용하였으며, 사용 후 4 °C 에 보관하였다. 각 항체의 희석 비율은 각각의 data sheet 에 따랐다. 2 차 항체인 HRP conjugated goat anti-rabbit 은 Jackson Immuno Research (West Grove, PA, USA) 에서, donkey anti-mouse, donkey anti-goat 는 Santa Cruz



Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 에서 구입하였다.

## 2. 동물 실험 모델

실험동물로 수컷 SD (Sprague-Dawley) 랫트를 (주) Samtaco Experimental Animals (경기도 오산시) 에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용하기 전 1 주 동안  $55 \pm 5$  % 의 습도,  $22 \pm 2$  °C 의 온도 및 환기가 조절된 서울대학교 약학대학 141 동 동물 실험 연구실에서 동물을 적응시켰으며, 오전 7 시와 오후 7 시를 기준으로 12 시간 주기로 명암을 바꾸어 주었다. 24 마리 랫트 (7 주령, 180~205 g) 를 무작위로 4 군으로 나누고 4 종류의 식이를 3 주 동안 공급하였다. NC 군은 standard liquid diet, NB 군은 betaine 1 % 함유된 standard liquid diet, HF 군은 high-fat liquid diet, HB 군은 betaine 1 % 함유된 high-fat liquid diet 를 섭취하였다. Standard liquid diet 는 1000 kcal/L 중 fat 35 %, protein 18 %, carbohydrates 47 % 로 구성되었고, high-fat liquid diet 는 1000kcal/L 중 fat 71 %, protein 18 %, carbohydrates 47 % 로 구성되었다. 두 diet 에 포함된 비타민과 미네랄 함량은 동일하며, 최종부피 1 L를 기준으로 Table 1 의 구성에 따라 각각을 혼합한 후 교반기를 이용해 10 분간 수돗물에 용해하였다 (Lieber et al., 2004). Betaine 은 liquid diet에 1% 가 되도록 용해하였으며, 식이는 매일 아침 9 시부터 10 시 사이에 공급하였다. 실험동물은 diethyl ether 로 마취한 상태에서 개복하고 복대 동맥 채혈 후 간을 적출하였다.

Table 1. Composition of the liquid diets

Component	Standard diet		High-fat diet	
	g/L	kcal/L	g/L	kcal/L
Casein	41.4	176.778	41.4	176.778
L-Cystine	0.5	2	0.5	2
DL-Methionine	0.3	1.2	0.3	1.2
Corn oil	8.5	75.14	48.5	428.74
Olive oil	28.4	251.056	28.4	251.056
Safflower oil	2.7	23.868	2.7	23.868
Dextrin maltose	115.2	456.192	25.6	101.376
Choline bitartrate	0.53	0	0.53	0
Fiber	10.0	0	10.0	0
Xanthan gum	3.0	0	3.0	0
mineral	8.75	4.1125	8.75	4.1125
vitamin	2.5	9.5	2.5	9.5
Total energy		999.8465		998.6305

**Each diet used the vitamin at 2.5 g/L diet (g/kg vitamin mix);**

thiamine HCl, 0.6; riboflavin, 0.6; pyridoxine HCl, 0.7; niacin, 3.0; calcium pantothenate, 1.6; folic acid, 0.2; biotin, 0.02; vitamin B12 (0.1%), 10; vitamin A acetate (500000 IU/g), 4.8; vitamin D3 (400000 IU/g), 0.4; vitamin E acetate 500 IU/g), 24.0; menadione sodium bisulfite, 0.08; *p*-amino benzoic acid, 5.0; inositol, 10.00; dextrose 939.0

**Each diet also used the mineral mix at 8.75 g/L diet (g/kg mineral mix);**

calcium phosphate, 500; sodium chloride, 74; potassium citrate, 220; potassium sulfate, 52; magnesium oxide, 24; manganous sulfate, 4.6; ferrous sulfate, 4.95; zinc carbonate, 1.6; cupric carbonate, 0.3; potassium iodate, 0.01; sodium selenite, 0.01; chromium potassium sulfate, 0.55; sodium fluoride, 0.06; sucrose, 117.92

### 3. 혈액 및 조직의 분획 분리

#### 3.1. 혈장의 분리

헤파린 처리된 syringe 를 사용하여 채혈한 후, 15,000 rpm 에서 약 40 초간 원심 분리한 상등액 (혈장) 을  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  이하로 유지되는 deep freezer (Model ULT-1490, REVCO, Asheville, NC, USA) 에 보관하였다.

#### 3.2. 간의 S9 분획 분리

랫트를 diethyl ether 로 마취시키고 복강을 절개하여 적출된 간에 3 배 용량의 1.15 % KCl 완충 용액을 가하여 약 1 분 정도 polytron (ULTRA-TURRAX T-25, IKA-Labortechnik, Germany) 로 분쇄한 후  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  , 10500 rpm 에서 high speed centrifuge (Model J2-MC, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, USA) 로 약 20 분간 원심분리하고 상등액 (S9 fraction) 을 취하였으며, 이 분획을 단백질 함량과 발현 측정에 사용하였다. S9 분획은 실험 시까지  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  이하로 유지되는 deep freezer (Model ULT-1490, REVCO, Asheville, NC, USA) 에 보관하였다.

## 4. Oil Red O staining

Optimum cutting temperature (O.C.T.) compound 에 고정된 조직을 10uM 두께로 frozen section 후 Gum-sucrose 에 20 분간 담귀 지방을 완화시키고 100 % propylene glycol 에서 5 분 동안 탈수시켰다. Oil red O 를 이용하여 60 °C에서 7분동안 염색한 후 85% propylene glycol 에서 5 분 동안 탈수시켰다. Oil red O 를 이용하여 60 °C 에서 7 분 동안 염색한 후 85% propylene glycol 에 3 분 동안 흡수하였으며, DW 로 20 회 정도 세척하였다. 희석된 Harri's hematoxylin 으로 2 분 동안 배경을 염색하였으며 잘 세척한 후 수용성 봉입제 (glycerin) 로 봉입하였다. 현미경으로 관찰시 fat 은 붉은색을 띠며, 핵은 푸른색을 띤다.

## 5. Homocysteine 함량 측정

간과 혈액의 homocysteine 의 함량은 Nolin 등의 방법 (2007) 을 약간 수정하여 측정하였다. 간에 3 배 용량의 1.15 % KCl 을 가하여 약 1 분 정도 polytron (ULTRA-TURRAX T-25, IKA-Labortechnik, Germany) 로 분쇄한 후, 분쇄액 200 µl (또는 혈장 200 µl) 와 10 mM dithiothreitol 200 ul 를 혼합하고 실온에서 30 분간 방치하여 시료에 포함된 homocystine 및 protein 결합형 homocysteine 을 환원시켰다. 이 용액과 2 mM EDTA 가 함유된 1 M HClO<sub>4</sub> 를 1:1 의 비율로 가해 혼합한 후, 시료를 약 20,000 g 에서 10 분간 원심 분리하였다. 상등액에 1.55 M NaOH 를 적당량 가해 pH 를 9.5 로 맞추고 7-Fluorobenzofurazan-4- sulfonic acid

ammonium salt (SBD-F) 를 첨가한 후, 차광된 상태에서 1 시간동안 60 °C 로 가열하여 반응시켜 유도체화 하였다. Symmetry C18 analytical column (4.6 x 150 mm, 3.5 µm particles, Waters Co., Milford, MA, USA) 이 장착된 HPLC 를 사용하여 30 °C, 유속 0.8 ml/min 으로 용액 중 homocysteine 을 분리하였으며 형광의 세기를 fluorescence detector (Ex. 385 nm, Em. 515 nm) 로 측정하였다. 이동상은 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.0) 을 A 로 methanol 을 B 로 사용하여 A 의 비율이 0 - 7 분 까지 100 %, 7 - 8 분 까지 25 % 로, 8 - 13 분 까지 25 %, 그리고 13 - 14.5 분까지 100 % 가 되도록 변화시켰다. Homocysteine 을 사용하여 표준검량선을 작성하고 시료 중의 농도를 구하였다.

## 6. SAM 함량 측정

간에 4 배 용량의 1.15 % KCl 을 가하여 약 1 분 정도 polytron (ULTRA-TURRAX T-25, IKA-Labortechnik, Germany) 으로 분쇄한 후, 분쇄액에 1 M perchloric acid 를 1:1 의 비율로 가해 혼합한 후, 시료를 약 20,000 g 에서 10 분간 원심 분리한 후 상등액을 취하여 분석시 까지 -70 °C 이하의 deep freezer 에 보관하였다. SAM 의 분석을 위해 1-heptanesulfonic acid sodium salt 를 사용하여 ion pairings 를 시키고 역상 column 과 UV 검출기 (UV-975 UV/VIS detector, Jasco Co., Tokyo, Japan) 를 장착한 HPLC system 을 이용하였다 (She et al., 1994). 이동상은 18 % methanol 을 함유하고 40 mM ammonium phosphate 와 8 mM 1-heptane- sulfonic acid sodium salt 로 구성되었으며 pH 를 5.0 으로 맞추고, column oven 을 이용하여 35 °C 에서 분석하였다.

## 7. Phosphatidylcholine (PC) 농도 측정

PC 농도는 Hidaka 등 (2008) 의 효소 비색법으로 측정하였다. 측정에 사용한 시약 1 은 PC-specific phospholipase D, *N*-ethyl-*N*-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline (2 mM), 0.1% TritonX-100 을, 시약 2 는 cholineoxidase, peroxidase, 4-aminoantipyrine (0.72 mM) 을 각각 0.05 M Tris-HCl 과 1 mM CaCl<sub>2</sub> (pH7.4) 이 함유된 완충액에 녹인 것을 뜻한다. 먼저, ep tube에 100  $\mu$ l의 시약 1 및 혈장 5  $\mu$ l 를 가하고 37°C에서 10분간 반응시킨 후 50  $\mu$ l의 시약 2 를 가하고 20분간 추가로 반응시킨다. 그 후 증류수를 대조액으로 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. PC standard 10mg을 2 % Triton X-100 에탄올용액 10ml에 녹여 동일한 방법으로 발색시킨 흡광도 값을 이용해 시료의 PC 농도를 구하였다.

## 8. 단백질 함량 측정

단백질 총량은 Lowry 등 (1951) 의 방법으로 측정하였다. 시험관에 150  $\mu$ l 의 단백질 희석액을 넣고 Lowry complex (2% (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> : 1 % (w/v) copper sulphate : 2 % (w/v) potassium sodium tartrate = 100 : 1 : 1) 750  $\mu$ l 를 가하고 즉시 혼합했다. 10 분 후 75  $\mu$ l 의 0.1 N folin-ciocalteau's phenol 시약을 가하고 즉시 혼합한 다음 30 분 후에 750 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량선은 bovine serum albumin (BSA) 을 이용하였으며 작성된 검량선으로부터 시료의 단백질 농도를 계산하였다. 이를 이용해 효소

활성 측정 및 단백질 발현 측정에 적용하였다.

## 9. 단백질 발현 측정 (Western blot)

Laemmli 의 방법 (1970) 에 따라 각 분획의 단백질을 sodium dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 하였다. 7.5 % separating gel 을 제조하기 위해 3.95 ml 의 증류수와 2.5 ml 의 1.5 M Tris 완충액 (pH 8.8) 및 3 ml 의 30 % acrylamide/bis 용액을 섞었다. 위의 용액에 즉시 조제한 10 % ammonium persulfate 60 ul 와 TEMED 5 ul 를 가하여 미리 준비된 gel 굳힘용 유리판 사이에 붓고 그 위에 증류수를 가하여 gel 표면을 고르게 한 후 약 1 시간 가량 방치하여 굳혔다. 12 % separating gel 은 7.5 % gel 의 조성 중 증류수는 2.85 ml, 30 % acrylamide/bis 용액은 4 ml 로 변화시켜 만들었다. Separating gel 이 굳은 후 gel 표면의 증류수를 조심스럽게 제거하였으며, 다음의 조성에 따라 stacking gel 을 가한후 comb 을 꽂아 sample loading 준비를 하였다. Stacking gel 은 3.36 ml 의 증류수, 0.5 M Tris (pH 6.8) 1.5 ml, 30 % acrylamide/bis 용액 780 ul, 10 % ammonium persulfate 45 ul 와 TEMED 6 ul 를 가해 제조하였다. 전기 영동할 시료는 sample dilution buffer (1 M Tris (pH 6.8) 2.5 ml, 80 % glycerol 5 ml, 20 % SDS 5 ml, 1 % bromophenol blue 0.2 ml, b-mercaptoethanol 2 ml 과 증류수 5.3 ml 포함) 를 가해 적절한 농도로 희석하고, 95 °C 에서 5 분간 가열하여 준비하였다. 준비된 gel 에 시료를 loading 한 후 running buffer (1 L 의 용액 중에 Trizma

base 3.04 g, glycine 14.42 g, 20 % SDS 5 ml 포함) 내에서 전기영동 하였다. 전압은 stacking gel 에서 100 volts 가 되도록 하고, separating gel 에서는 160 volts 를 유지하였다. 전기영동이 끝난 후 80 volts 에서 2 시간 동안 gel 을 nitrocellulose (NC) 지에 전이하였다. 이 때 사용한 transfer buffer 는 1 L 용액 중에 tris base 3.04 g, glycine 14.42 g 및 200 ml 의 methanol 이 포함되었다. 전이가 끝난 NC 지는 단백질을 염색시키는 amido black 용액을 이용해 전이과정이 정상적으로 이루어졌는지 확인하였으며, 5 % non-fat milk 용액에 담가 상온에서 1 시간 방치하여 비특이성 결합을 방지하고, 0.05 % Tween 20 을 함유한 Tris buffer (TBST) 로 3 회 이상 세척한 후 1 차 항체를 사용하여 4 °C 에서 하룻밤 방치하였다. 1 차 항체는 5 % bovine serum albumin 용액에 희석하였다. 다음날 5 % non-fat milk 용액으로 희석한 2 차 항체로 상온에서 1 시간 동안 반응시킨 후 ECL chemiluminescence system (Amersham, Gaithesberg, MA, USA) 을 사용하여 발색하였다.

## 10. 통계 처리

모든 실험 결과는 mean  $\pm$  SEM 으로 표시하였다. One-way analysis of variance (ANOVA) test 를 실시하였으며, 모든 실험군들 간의 비교를 위해 Newman-Keuls multiple range test 로 유의성 여부를 판정하였다. 통계적인 유의성은 *P* 값이 0.05 미만인 경우를 기준으로 판정하였다.



## 결 과

### 1. 고지방 식이와 betaine 의 병용공급이 몸무게 및 간의 지방 축적에 미치는 영향

모든 군에서 몸무게 변화에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 정상 식이 및 고지방 식이와 함께 공급된 betaine의 섭취량은 각각  $2.96 \pm 0.09$  g/kg/day 와  $2.94 \pm 0.08$  g/kg/day 로 유의적 차이가 없었다. 간에서의 triglyceride 농도는 대조군 ( $65 \pm 4$  mg/g liver) 에 비해 고지방 식이군 ( $89 \pm 9$  mg/g liver) 에서 크게 증가하였으며, betaine 병용공급을 통해 각각  $41 \pm 4$  mg/g liver 와  $51 \pm 3$  mg/g liver 로 유의적인 감소를 보였다. 간의 cholesterol 농도는 대조군에서  $8 \pm 0.4$  mg/g/liver, 고지방 식이군에서  $11 \pm 0.5$  mg/g/liver 로 약 140% 증가하였고 이는 betaine 병용공급에 의해  $9 \pm 0.7$  mg/g/liver 로 감소하였다 (Table 2).

조직검경(Oil red O staining)을 통해 고지방 식이군에서 적색으로 염색된 지방 축적이 확연하게 관찰되었고 betaine 병용공급에 의해 지방 축적이 억제되었음을 확인하였다 (Figure 3).

Table 2. Changes in body weight and liver lipids in rats fed a standard or HF diet with betaine.

	NC	NB	HF	HB
Starting weight (g)	161 ± 2	163 ± 3	157 ± 2	163 ± 2
Final weight (g)	307 ± 7	306 ± 10	286 ± 4	300 ± 2
Weight gain (g)	146 ± 6	143 ± 8	128 ± 4	137 ± 4
Betaine intake (g/kg/day)		2.96 ± 0.09		2.94 ± 0.08
Hepatic triglyceride (mg/g liver)	65 ± 4 <sup>a</sup>	41 ± 4 <sup>b</sup>	89 ± 9 <sup>c</sup>	51 ± 3 <sup>ab</sup>
Hepatic cholesterol (mg/g liver)	8 ± 0.4 <sup>a</sup>	8 ± 4 <sup>ab</sup>	11 ± 0.5 <sup>c</sup>	9 ± 0.7 <sup>bc</sup>

Each value represents the mean ± SEM for six rats.

Values with different letters (a,b,c) are significantly different from one another (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test,  $p < 0.05$ ).

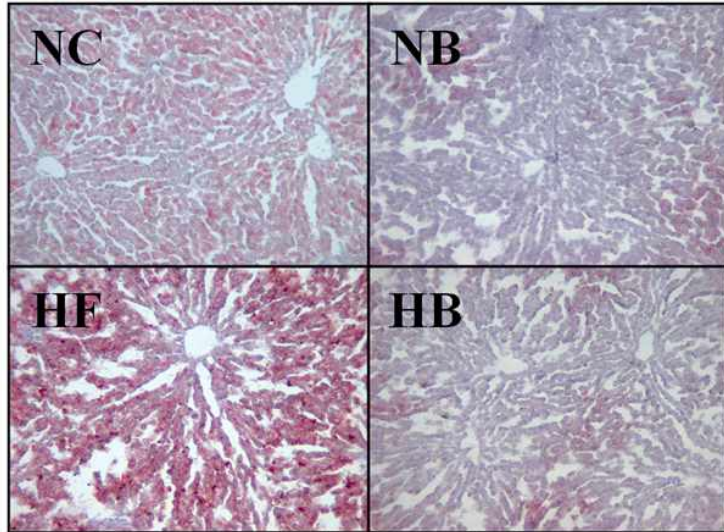


Figure 3. Accumulation of lipid droplets on liver histopathology. NC, a standard liquid diet; NB, a standard liquid diet containing betaine; HF, a high fat liquid diet; HB, a high fat liquid diet containing betaine. Liver sections were stained using an Oil red O method (x200).

## 2. 고지방 식이와 betaine 의 병용공급이 혈액의 지질 농도에 미치는 영향

혈장에서의 triglyceride (TG), total cholesterol, HDL-cholesterol 농도를 측정하였다. 혈장의 TG 농도는 고지방 식이에 betaine 을 병용공급한 군에서만 크게 증가하였다. 한편 total cholesterol 농도는 대조군과 비교시 고지방 식이에 의해 약 76% 수준으로 감소하였고 이는 betaine 병용공급을 통해 약 170% 증가하였다. 혈중 콜레스테롤 제거에 관여하는 HDL-cholesterol 농도는 고지방 식이에 따른 유의적 차이가 없었으며 정상 식이 및 고지방 식이에 betaine 병용공급을 통해 약 160%, 143% 증가함을 확인하였다 (Table 3).

Table 3. Changes in serum lipids in rats fed a standard or HF diet with betaine.

	NC	NB	HF	HB
Serum triglyceride (mg/dl)	106 ± 16 <sup>a</sup>	83 ± 11 <sup>a</sup>	65 ± 9 <sup>a</sup>	173 ± 28 <sup>b</sup>
Serum total cholesterol (mg/dl)	93 ± 6 <sup>a</sup>	121 ± 4 <sup>b</sup>	71 ± 1 <sup>c</sup>	121 ± 8 <sup>b</sup>
Serum HDL-cholesterol (mg/dl)	52 ± 2 <sup>a</sup>	79 ± 2 <sup>b</sup>	51 ± 2 <sup>a</sup>	73 ± 2 <sup>b</sup>

Each value represents the mean ± SEM. Values with different letters (a,b,c) are significantly different from one another (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test,  $p < 0.05$ ).

### 3. 고지방 식이와 betaine의 병용공급이 간의 lipogenesis 에 미치는 영향

#### 3.1. Betaine 공급이 pAMPK, pACC 단백질 발현에 미치는 효과

체내 에너지 대사 조절에 중추적 역할을 하는 AMP-activated protein kinase (AMPK) 는 인산화 되면서 지방산 합성에 관여하는 Acetyl-coA carboxylase (ACC) 를 인산화하여 불활성화시킨다. 고지방 식이는 인산화된 AMPK (pAMPK) 농도를 대조군 대비 약 40% 수준으로 감소시켰고 인산화된 ACC (pACC) 농도 역시 대조군 대비 약 55% 수준으로 크게 감소시켰다. 이러한 pAMPK 와 pACC 농도의 감소는 betaine 병용 공급에 의해서 대조군 수준으로 회복되었다. 한편 정상 식이에 betaine 을 병용 공급한 군은 대조군과 유의적 차이가 없었다 (Figure 4).

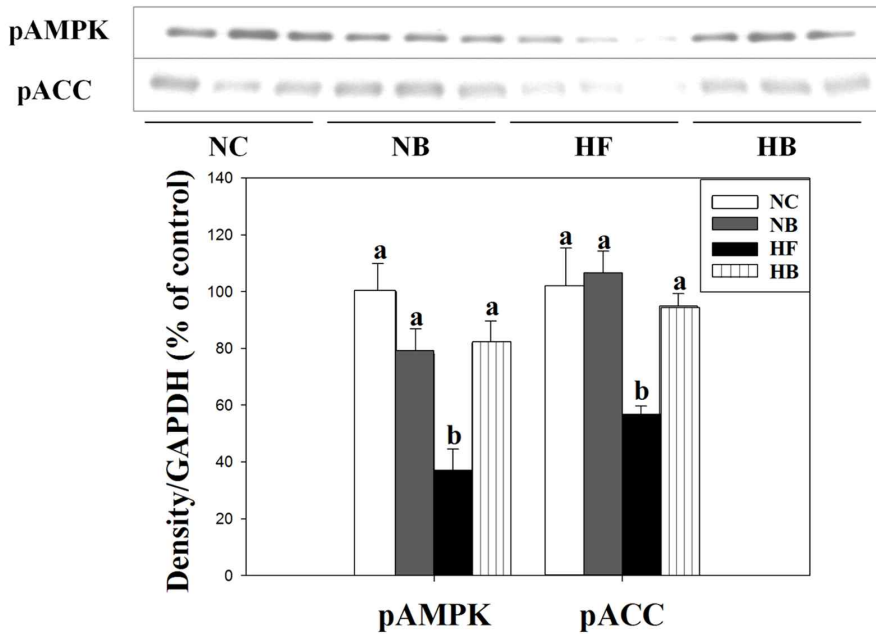


Figure 4. The effects of betaine on hepatic expression of pAMPK and pACC protein. Each value represents the mean  $\pm$  SEM. Values with different letters (a,b) are significantly different from one another (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test,  $P < 0.05$ ).

### 3.2. Betaine 공급이 LXR $\alpha$ , SREBP-1c 단백질 발현에 미치는 효과

Betaine의 투여가 지방생성에 관여하는 핵 수용체인 LXR $\alpha$ 와 전사 인자 SREBP-1c에 어떤 영향을 주는지 확인하기 위해 단백질 발현을 측정하였다. LXR $\alpha$  농도는 고지방 식이에 의해 나머지 세 군에 비해 유의적으로 증가하였으며 대조군과 비교시 약 170% 증가하였다. 고지방 식이에 의한 LXR $\alpha$  증가는 betaine 병용공급에 의해 대조군 수준으로 감소하였다 (Figure 5). SREBP-1c는 비활성형인 precursor form (pSREBP-1c)과 핵으로 이동하여 lipogenesis 관련 유전자를 발현시키는 활성형인 nuclear form (nSREBP-1c)의 단백질 발현을 측정하였다. pSREBP-1c 농도는 네 군에서 모두 차이가 없었다. 그러나 nuclear form (nSREBP-1c) 농도는 고지방 식이군에서 대조군 대비 약 130% 증가하는 경향을 띄었고 이는 betaine 병용 공급에 의해 절반 수준으로 감소하여 betaine의 투여가 고지방 식이에 의한 nSREBP-1c 증가를 유의적으로 차단했음을 확인하였다 (Figure 6).



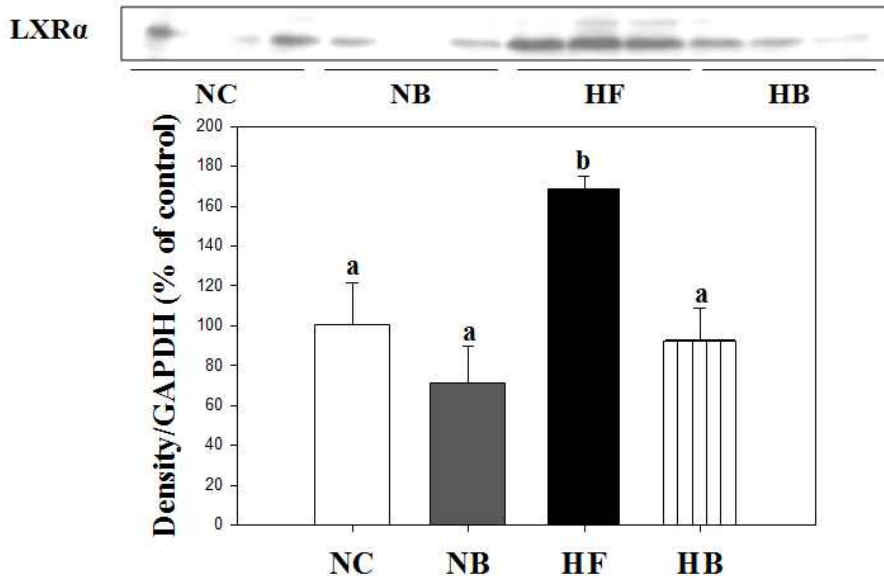


Figure 5. The effects of betaine on hepatic expression of LXR $\alpha$  protein. Each value represents the mean  $\pm$  SEM. Values with different letters (a,b) are significantly different from one another (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test,  $P < 0.05$ ).

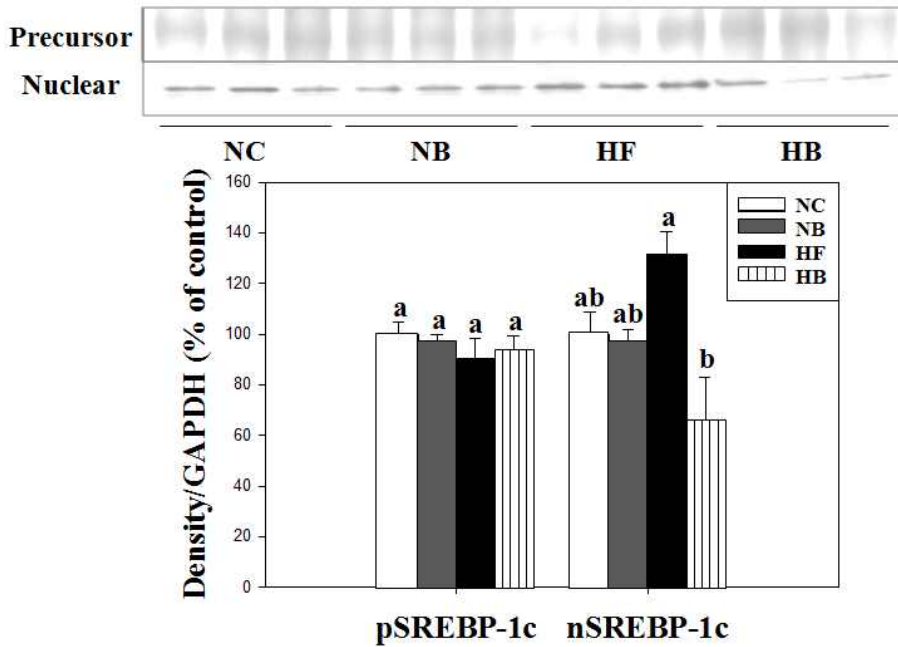


Figure 6. The effects of betaine on hepatic expression of SREBP-1c protein. pSREBP-1c, precursor SREBP-1c; nSREBP-1c, nuclear SREBP-1c. Each value represents the mean  $\pm$  SEM. Values with different letters (a,b) are significantly different from one another (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test,  $P < 0.05$ ).

## 4. 고지방 식이와 Betaine 병용공급이 황 함유 아미노산 대사에 미치는 영향

### 4.1. Betaine 공급이 간의 Betaine homocysteine methyltransferase (BHMT) 단백질 발현에 미치는 영향

Betaine 의 methyl 기를 homocysteine 으로 전달하여 methionine 을 합성하는 효소인 BHMT 발현을 측정 한 결과 고지방 식이군에서 대조군 대비 약 40 % 수준으로 크게 감소하였다. 정상 식이에 betaine 을 병용 공급한 군은 정상 식이만 공급한 군과 비교시 BHMT 농도가 약 3 배 증가하였다. 고지방 식이에 betaine 병용공급을 한 경우 고지방 식이만 공급한 경우와 비교시 7.6 배 증가하였다. 따라서 고지방 식이는 BHMT 농도를 감소시키고 이는 betaine 투여에 의해 현저히 증가함을 확인하였다 (Figure 7).

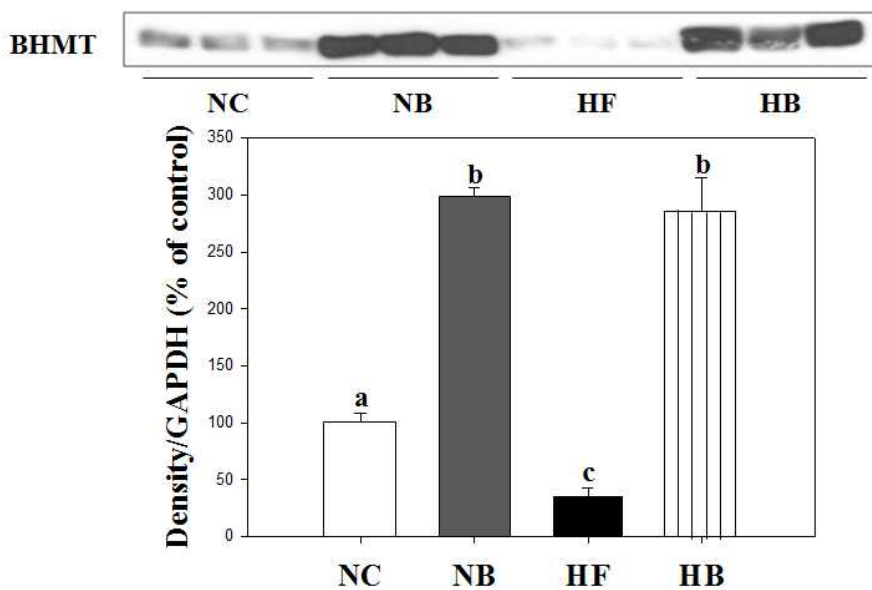


Figure 7. The effects of betaine on hepatic expression of BHMT protein. Each value represents the mean  $\pm$  SEM. Values with different letters (a,b,c) are significantly different from one another (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test,  $P < 0.05$ ).

#### 4.2. Betaine 공급이 간과 혈중 Homocysteine 함량에 미치는 영향

BHMT 의 기질이며 황함유 아미노산 대사물질인 homocysteine 을 간과 혈액에서 측정하였다. 간의 homocysteine 농도는 정상 식이군에서 약 10 nmole/g liver 이며 고지방 식이에 의해 약 16 nmole/g liver 으로 증가하였다. 이는 각각의 식이에 betaine 을 투여함에 따라 약 6 nmole/g liver 과 8 nmole/g liver 로 감소하였다. 따라서 betaine 공급에 의한 간의 homocysteine 감소는 앞에서 확인한 BHMT 발현의 증가에 따른 homocysteine 의 이용률 증가로 설명할 수 있다. 혈장의 homocysteine 농도는 네 군에서 유의적인 차이가 없었다 (Figure 8).

#### 4.3. Betaine 공급이 간의 S-adenosylmethionine (SAM) 함량에 미치는 영향

Betaine 의 투여가 BHMT 발현을 증가시키고 간에서의 homocysteine 농도를 감소시켰으므로 황함유 아미노산 대사의 중간 대사체이며 선행연구에서 지방간 완화에 따른 변화가 관찰된 SAM 함량을 측정하였다. 고지방 식이 공급은 SAM 농도를 감소시켜 BHMT 발현 감소와 일치하는 경향을 보였고, betaine 병용공급을 통해 정상 식이군에는 못미치나 고지방 식이 군에 비해 유의적으로 상승한 것을 확인하였다 (Figure 9).

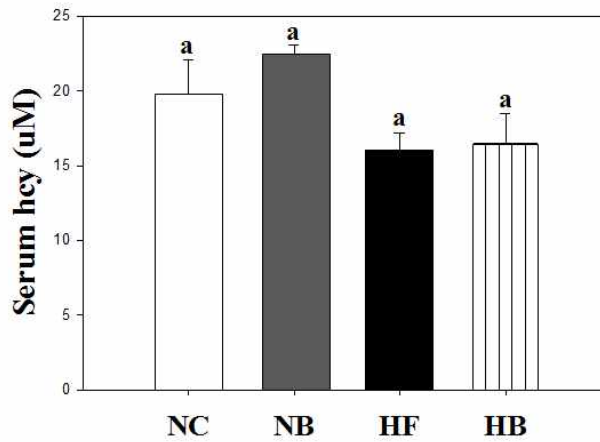
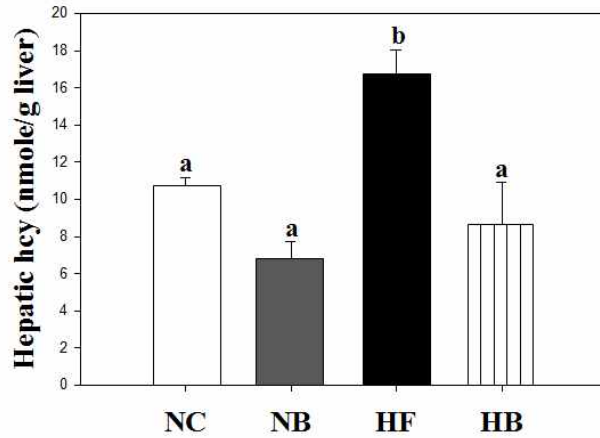


Figure 8. The effects of betaine on homocysteine levels in liver or serum. Each value represents the mean  $\pm$  SEM for six rats. Values with different letters (a,b,c) are significantly different from one another (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test,  $P < 0.05$ ).

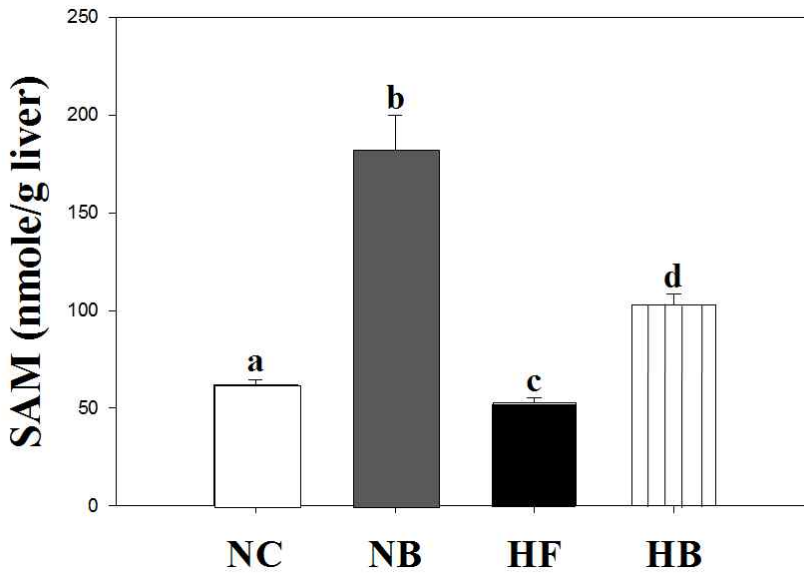


Figure 9. The effects of betaine on S-adenosylmethionine (SAM) levels in liver. Each value represents the mean  $\pm$  SEM for six rats. Values with different letters (a,b,c,d) are significantly different from one another (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test,  $P < 0.05$ ).

## 5. 고지방 식이와 betaine 의 병용공급이 간의 lipid secretion 에 미치는 영향

### 5.1. Betaine 공급이 간의 Apolipoprotein B (ApoB) 단백질 발현 에 미치는 영향

고지방 식이에 의한 간의 지방 축적을 확인하였으나 혈액의 TG 와 total cholesterol 은 오히려 감소하였다. 따라서 이런 현상이 고지방 식이가 혈액으로의 lipid 배출을 저하시키는 것과 관련이 있는지 실험하였다.

간에서 축적된 TG를 혈액으로 방출하기 위하여 VLDL 구조를 형성 하는데 필수적인 성분인 ApoB 와 PC 함량을 측정하였다. ApoB 단백질 발현 농도는 정상 식이군과 고지방 식이군의 유의적 차이가 없었다. 그러나 정상 식이 및 고지방 식이에 betaine을 병용 공급하여 대조군 대비 2배 수준으로 증가하였다 (Figure 10).

### 5.2. Betaine 공급이 혈액의 phosphatidylcholine (PC) 함량에 미치는 영향

혈장의 PC 농도는 고지방 식이에 의해 대조군 대비 약 70% 수준으로 감소하였다. Betaine 병용공급은 정상 식이 및 고지방 식이에 서 모두 유의적으로 증가하였다 (Figure 11).



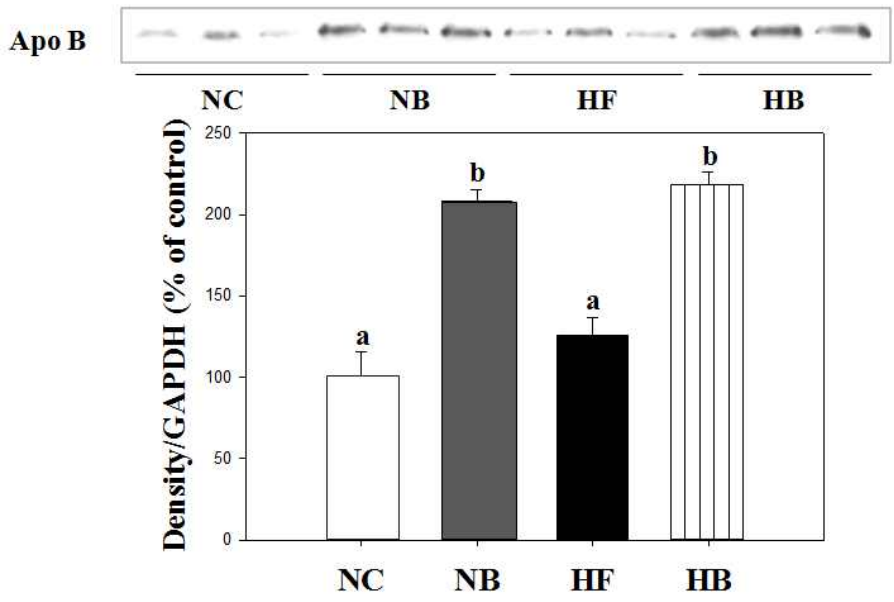


Figure 10. The effects of betaine on hepatic expression of ApoB protein. Each value represents the mean  $\pm$  SEM. Values with different letters (a,b) are significantly different from one another (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test,  $P < 0.05$ ).

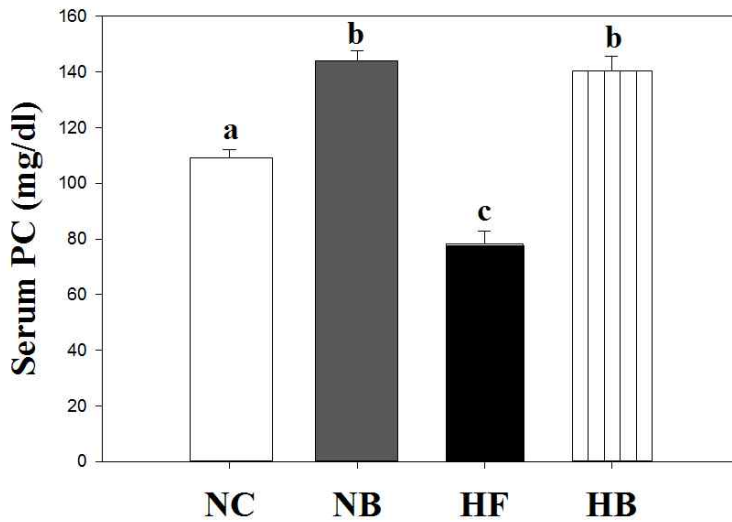


Figure 11. The effects of betaine on serum phosphatidylcholine (PC) levels. Each value represents the mean  $\pm$  SEM. Values with different letters (a,b,c) are significantly different from one another (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test,  $P < 0.05$ ).

## 고 찰

비알콜성 지방간은 최근 비만, 당뇨병 등 대사 증후군의 유병률이 증가하면서 치료에 대한 관심이 더욱 커지고 있다. 보건복지부가 1995년부터 2005년까지 주기적으로 조사한 국민건강영양조사에 따르면 비만 인구와 당뇨병 유병률이 급격히 증가하였고 이는 비알콜성 지방간의 유병률 증가를 암시한다 (Park, 2008). 비알콜성 지방간의 초기단계인 단순 지방간이 liver disorder 의 악화에 중요한 역할을 한다는 보고가 증가하면서 단순 지방간의 완화가 치료목적으로 주목되고 있다. 따라서 본 실험에서는 고지방 식이에 의해 유도된 비알콜성 지방간 질환의 초기단계에서 betaine 투여에 의한 항지방간 작용과 그 기전에 대해 연구하였다.

간에서의 지방 축적은 간에서의 지방산 생합성과 흡수, 지방산 산화와 배출의 불균형에 의해 일어난다. 본 실험에서 고지방 식이는 지방 합성을 증가시키고 지방의 배출을 억제하는 결과를 가져왔으며 이는 고지방 식이의 betaine 병용공급을 통해 완화되었음을 확인하였다. 고지방 식이는 간의 AMPK와 ACC 의 인산화를 유의적으로 감소시켰고 LXR $\alpha$ 의 단백질 발현과 SREBP-1c 의 핵으로의 이동을 증가시켰다. AMPK 는 세포 내의 에너지 항상성 조절에 중추적인 센서 역할을 하며 간의 지방 대사에 중요한 역할을 담당한다 (Xu et al., 2014). AMP/ATP 비율이 증가하면 AMPK는 인산화되어 활성화되면서 ATP 를 생산하는 과정의 촉진 및 ATP 소비 과정의 억제가 이루어지는데 예를 들면 지방산 합성에 관여하는 ACC1, 콜

레스테를 생합성에 필요한 HMG-CoA reductase 가 인산화 되어 불활성화 된다 (Hardie et al., 2003). ACC 는 지방산 합성의 속도제한 효소로서 acetyl-CoA 를 malonyl-CoA 로 합성하는 효소이다. Malonyl-CoA 는 지방산 합성에 필요한 기질이며 동시에 지방산  $\beta$  산화를 위해 long chain fatty acyl CoA 를 미토콘드리아 내부로 이동시키는 효소 carnitine palmitoyl transferase I 의 allosteric inhibitor 로 작용한다 (Saha et al., 2003).

LXR 은 nuclear receptor 로 LXR $\alpha$  는 간, 신장, 소장, adipose tissue에 높게 발현되며 LXR $\beta$  는 광범위하게 분포한다. LXRs 은 DNA에 결합하여 target gene 전사를 조절하며 콜레스테롤 대사에 관여한다고 알려졌다 (Joseph et al., 2002). 이전 연구에서 마우스의 LXR $\alpha$  gene 발현 억제는 지방합성을 촉진하는 fatty acid synthase (FAS), stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD-1), ACC, SREBP-1 발현 감소를 가져온다고 보고되었다 (Peet et al., 1998). 또한 LXR ligand T1317 을 주입한 마우스에서 지방합성 경로가 촉진되고 혈중 TG 농도가 증가하였다 (Yang et al., 2009). SREBPs 은 지방산과 콜레스테롤의 생합성 경로에 관련되는 효소를 활성화시키고 간에서 이들의 합성을 조절하는 중요한 전사 인자이다. SREBPs 은 소포체에 INSIG (insulin-induced gene), SCAP (SREBP-cleavage activating protein) 두 분자와 결합되어 있으며 활성화되면 INSIG 와의 결합이 분리되면서 골지체로 이동하게 된다. 그 후 SCAP 과의 결합이 분리되고 cleavage site 인 S1P, S2P 가 잘리면서 60kDa 에 해당하는 저분자만 핵으로 들어가 sterol regulatory element (SRE) 에 결합하여 lipogenesis gene 발현에 관여하는 transcription factor 로 작용한다 (Yang et al., 2009). SREBPs은 1a, 1c, 2의 세 종류로 나뉘며 이 중

1a, 1c는 지방합성에 주로 관여하고 2는 콜레스테롤 대사에 관여한다 (Horton et al., 2002). 간에서는 1a 보다 1c의 발현이 우세하며 지방합성과 관련된 유전자의 전사과정 및 전사후 과정을 모두 조절한다. LXR $\alpha$ 의 활성화는 SREBP-1c의 발현을 유도한다 (Joseph et al., 2002). AMPK 는 SREBP-1c 가 핵으로 이동하기 위해 저분자로 잘리는 단계를 억제한다. 또한 LXR $\alpha$ 이 translocation 하기 위해 필요한 내인성 ligand 생성을 억제하여, LXR $\alpha$ 에 의해 유도되는 SREBP-1c의 전사단계의 차단을 통해 (Yang et al., 2009), SREBP-1c mRNA 발현을 감소시킨다.

본 실험에서 betaine 의 투여는 고지방 식이로 인한 AMPK 의 활성을 회복시키고 ACC 의 인산화는 증가시켰다. 따라서 betaine 투여가 malonyl-CoA 합성을 감소시키고 이것은 지방산 합성 억제와 미토콘드리아의 지방산  $\beta$  산화를 촉진하여 간의 지방 축적을 완화하였음을 의미한다. 또한 간에서 LXR $\alpha$ 의 상승과 SREBP-1c 의 translocation 을 통한 활성형 단백질 발현 상승의 완화를 확인하였다. 이 결과는 betaine 이 AMPK를 활성화시켜 LXR $\alpha$  와 SREBP-1c 에 의한 간조직의 지방축적을 억제하였음을 암시한다. 이는 고탄수화물 식이에 betaine 을 병용공급한 지방간 마우스 모델에 대한 연구에서 AMPK 의 활성화 및 lipogenesis 유전자의 변화와 유사한 경향을 보인다(Song et al., 2007).

고지방 식이를 공급한 랫트의 간에서 BHMT 의 발현 감소, homocysteine 의 농도 증가, SAM 농도 감소가 현저하게 나타났다. 반면 고지방 식이와 betaine 의 병용공급은 BHMT 발현을 크게 증가시키고 homocysteine 의 메틸화 증가를 통해 homocysteine 농도

를 회복시켰고 SAM 농도를 상승시켰다. 최근 (Park et al., 2013) 의 연구와 본 실험실의 연구에 따르면 homocysteine 은 in vivo 및 in vitro 실험에서 AMPK 활성화를 억제한다는 보고가 있어 homocysteine 농도의 감소는 betaine 의 항지간 작용기전의 중요한 기전으로 추정될 수 있다.

간세포 내에서 homocysteine 은 ER stress 를 유도한다. cystathionine  $\beta$ -synthase 결핍 또는 에탄올을 투여하여 고호모시스테인혈증을 유발한 마우스에서 ER stress 를 수반하는 유전자의 발현이 증가하였다 (Hamelet et al., 2007; Ji and Kaplowitz, 2003). 또한 ER stress 는 지방 합성에 필수적인 효소들의 발현을 유도하는 SREBP-1c 활성화를 통해 지방 축적을 유도한다 (Lee and Glimcher, 2009). HepG2 cell 에 homocysteine 을 처리하여 ER stress 를 유도한 실험에서 콜레스테롤과 TG 생합성 경로의 조절이상을 확인하였다 (Werstuck et al., 2001). 이런 연구들을 종합해보면 betaine의 병용공급에 따른 간세포의 homocysteine 농도 감소는 ER stress의 완화를 통해 지방 축적을 감소시켰다고 판단된다. 또한 homocysteine 농도 감소가 ACC 및 지방합성 경로에 필요한 전사 인자 억제에 관여하는 AMPK 활성화와 관련이 있을 것으로 사료되며 그에 대한 추가 연구가 필요하다.

Betaine 투여는 간의 지방축적은 감소시켰지만 혈액에서의 TG와 콜레스테롤은 증가시켜 상반된 결과를 보였다. 따라서 betaine 투여가 간으로부터 혈액으로의 지방 배출과 관련이 있는지 실험하였다. 간의 TG 와 콜레스테롤은 방출시 VLDL 형태로 혈중으로 방출되므로 혈중 TG 농도는 혈중 VLDL 농도를 반영한다 (Kang et al.,

2000). 간에서의 VLDL 의 조립과 분비에는 ApoB 와 Phospholipids 의 한 종류인 PC 가 필요하다. ApoB 는 in vitro 실험에서 BHMT 발현이 간의 ApoB mRNA 발현 증가와 관련 있다고 보고되었다 (Sowden et al., 1999; Ji et al., 2007). 또다른 연구에서 methionine 제한 식이에 betaine을 병용공급하여 BHMT 가 증가한 랫트에서 ApoB mRNA의 증가와 함께 간의 TG 감소를 확인했고, 혈중 TG와 ApoB 농도 측정을 통해 VLDL의 생산이 증가하였다 (Sparks et al., 2006). 따라서, 본 실험에서 betaine 공급은 BHMT 를 증가시키고 이는 ApoB 발현을 유도를 통해 VLDL의 합성을 증가시켜 간의 TG 를 혈중으로 배출하는 것으로 사료된다.

Phospholipid 는 콜레스테롤과 함께 TG와 콜레스테롤 에스터를 중심으로 두고 주위를 둘러싸 지질단백질의 monolayer 를 형성한다. PC는 전체 phospholipid 의 60~80% 를 차지하며, 랫트의 혈중 VLDL 의 전체 phospholipid 중 70%를 차지한다 (Cole et al., 2012). 따라서 간에서의 PC 농도의 감소는 간의 VLDL 분비에 직접적인 문제를 가져온다고 볼 수 있다. 또한 PC 는 HDL 중 지질단백질 중량의 40%를 구성하고 있어 HDL 조립에도 관여한다 (Skipski et al., 1967). 한편 PC 의 합성은 황함유 아미노산 대사와 밀접하게 관련되어 있다. PC 의 합성은 두가지 경로를 통하는데, 전체 합성의 70% 는 citidinediphosphocholine (CDP-choline) pathway 를 거친다. 이 경로는 betaine 의 전구체인 choline 을 기질로 하여 PC 를 합성한다. 두 번째 경로는 phosphatidylethanolamine methyltransferase (PEMT) pathway 이며 phosphatidylethanolamine 을 기질로 하여 PEMT에 의해 SAM에서 메틸기를 전달받는 과정을

3차례 반복하여 PC 로 합성된다. PEMT 는 주로 간에서 발현하므로 이 경로는 간에서 우세하게 나타나며 간의 전체 PC 합성의 30% 를 차지한다 (Cole et al., 2012). 이전 연구에서 랫트의 알코올 섭취에 따른 SAM과 SAM:SAH ratio 의 감소는 PEMT 활성 및 VLDL 방출을 감소시켰으며 이는 betaine 투여에 의해 회복하여 간의 지방배출을 돕고 알코올성 지방간을 완화시켰다 (Kharbanda, 2007; 2009). 또 본 실험실의 선행 연구에서 비알코올성 지방간이 유도된 랫트에서 SAM 농도와 SAM:SAH ratio 가 감소, 간의 황함유 아미노산 대사가 변화하는 양상을 확인하였으며 이는 betaine 병용공급에 의해 효과적으로 회복되었다 (Kwon et al., 2009). 본 실험에서 betaine 투여에 의한 BHMT 의 증가는 앞선 연구들의 SAM 농도와 SAM:SAH ratio 증가를 설명해준다. 본 실험에서 betaine 병용공급에 의한 간의 BHMT 의 증가는 SAM의 농도 증가를 통해 PEMT pathway 를 촉진하고, 풍부한 betaine의 존재로 CDP-choline pathway의 기질인 choline 의 고갈을 막아 PC 합성을 증가시켰다. 따라서, betaine 은 BHMT 증가를 통해 VLDL의 합성과 방출에 필요한 ApoB 와 PC 농도를 상승시켜 간의 지방을 혈액으로 내보내 혈중의 지질 농도를 상승시킨 것으로 판단된다.



## 결 론

본 실험을 통해 고지방 식이로 인한 간의 지방 축적은 betaine 병용공급에 의해 다양한 기전을 통해 완화됨을 확인하였다 (Figure. 12).

고지방 식이로 유도된 지방 축적에 대해 betaine의 병용공급은 AMPK 활성화를 통해 ACC, LXR $\alpha$ , SREBP-1c 활성화를 감소시켰고, BHMT 농도 증가를 통해 homocysteine 을 감소시켜 ER stress 를 완화, SREBP-1c 활성화를 감소시켜 지방 생성을 억제하였다. 따라서 betaine 에 의한 homocysteine 농도감소는 AMPK 를 활성화시키는 기전으로 추정되며 이는 추가 연구가 필요하다.

Betaine 에 의한 BHMT 농도 증가는 VLDL 합성에 필수적인 ApoB 농도를 상승시켰고, 황함유 아미노산 대사 변화를 통해 SAM 농도의 증가와 충분한 choline availability 를 통해 PC 합성을 촉진했다고 생각된다.

결과를 종합해 보면, 고지방 식이에 의한 비알코올성 지방간의 초기단계에서 betaine의 병용공급은 간의 지방 합성을 억제하고 동시에 지방 배출을 촉진함으로써 간의 지방 축적을 완화시키며 이 작용은 betaine 투여에 의한 황함유 아미노산 대사의 변화와 관련이 있다고 사료된다.

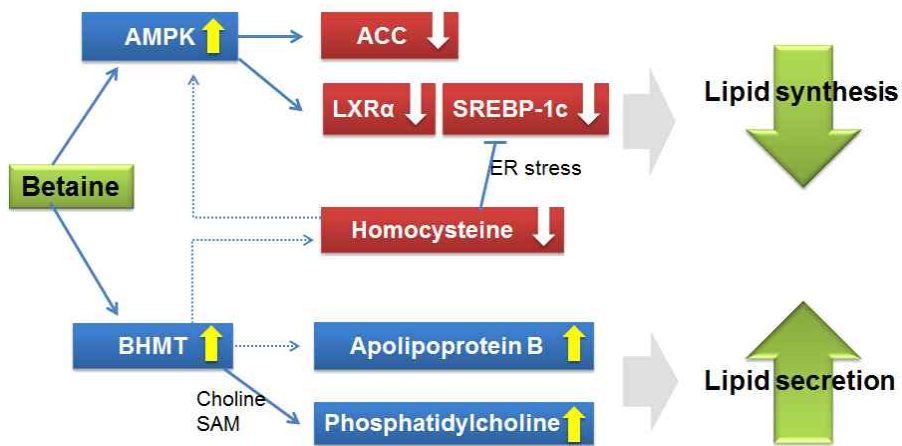


Figure 12. Proposed mechanisms of anti-steatotic action by betaine

## 참고문헌

Abdelmalek MF, Angulo P, Jorgensen RA, Sylvestre PB, Lindor KD (2001) Betaine, a promising new agent for patients with nonalcoholic steatohepatitis: results of a pilot study. *Am J Gastroenterol* 96:2711-2717

Abdelmalek MF, Sanderson SO, Angulo P, Soldevila-Pico C, Liu C, Peter J, Keach J, Cave M, Chen T, McClain CJ, Lindor KD (2009) Betaine for nonalcoholic fatty liver disease: results of a randomized placebo-controlled trial. *Hepatology* 50:1818-1826

Barak AJ, Beckenhauer HC, Tuma DJ (2002) Methionine synthase. a possible prime site of the ethanolic lesion in liver. *Alcohol* 26:65-67

Cheng S, Feng J, Wang X (2011) Research advances in the treatment of hyperhomocysteinemia. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*. Oct;42(5):329-34.

Cole LK, Vance JE, Vance DE (2012) Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1821:754-761

Day CP, James OF (1998) Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 114:842-845

Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN (2010) Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Q J Med* 103:71-83

Duvnjak M, Lerotić I, Barsić N, Tomasić V, Virović Jukić L, Velagić V (2001) Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 13:4539-4550

Eloranta TO, Kajander EO (1984) Catabolism and lability of S-adenosyl-L-methionine in rat liver extracts. *Biochem J*. Nov 15;224(1):137-44.

Farrell GC, Larter CZ (2006) Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 43:S99-112

Finkelstein JD, Martin JJ, Harris BJ, Kyle WE (1983) Regulation of hepatic betaine-homocysteine methyltransferase by dietary betaine. *J Nutr* 113:519-521

Finkelstein JD (1990) Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem*. 1:228-237

Finkelstein JD (2000) Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. *Semin Thromb Hemost*. 26(3):219-25.

Hamelet J, Demuth K, Paul JL, Delabar JM, Janel N (2007) Hyperhomocysteinemia due to cystathionine beta synthase deficiency induces dysregulation of genes involved in hepatic lipid homeostasis in mice. *J Hepatol* 46:151-159

Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER (2003) Management of

cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. FEBS Lett 546:113-120

Hidaka H, Yamauchi K, Ohta H, Akamatsu T, Honda T, Katsuyama T (2008) Specific, rapid, and sensitive enzymatic measurement of sphingomyelin, phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine in serum and lipid extracts. Clin Biochem 41:1211-1217

Horton JD, Goldstein JL, Brown MS (2002) SREBPs:activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. J Clin Invest 109:1125-31

Ji C, Kaplowitz N (2003) Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. Gastroenterology 124:1488-1499

Ji C, Shinohara M, Kuhlenkamp J, Chan C, Kaplowitz N (2007) Mechanisms of protection by the betaine-homocysteine methyltransferase/betaine system in HepG2 cells and primary mouse hepatocytes. Hepatology 46:1586-1596

Joseph SB, Laffitte BA, Patel PH, Watson MA, Matsukuma KE, Walczak R, Collins JL, Osborne TF, Tontonoz P (2002) Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. J Biol Chem 277:11019-11025

Jung YS, Kim SJ, Kwon DY, Ahn CW, Kim YS, Choi DW, Kim YC

(2013) Alleviation of alcoholic liver injury by betaine involves an enhancement of antioxidant defense via regulation of sulfur amino acid metabolism. *Food Chem Toxicol* 62:292-298

Kang S, Davis RA (2000) Cholesterol and hepatic lipoprotein assembly and secretion. *Biochim Biophys Acta* 1529:223-230

Kharbanda KK (2007) Role of transmethylation reactions in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol* 13:4947-4954

Kharbanda KK, Todero SL, Ward BW, Cannella JJ 3rd, Tuma DJ (2009) Betaine administration corrects ethanol-induced defective VLDL secretion. *Mol Cell Biochem* 327:75-78

Kim SK, Kim YC (2002) Attenuation of bacterial lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity by betaine or taurine in rats. *Food Chem Toxicol* 40:545-549

Kim SK, Kim YC (2005) Effects of betaine supplementation on hepatic metabolism of sulfur-containing amino acids in mice. *J Hepatol* 42:907-913

Kim SK, Seo JM, Chae YR, Jung YS, Park JH, Kim YC (2009) Alleviation of dimethylnitrosamine-induced liver injury and fibrosis by betaine supplementation in rats. *Chem Biol Interact* 177:204-211

Kim YC, Jung YS, Kim SK (2005) Effect of betaine supplementation on changes in hepatic metabolism of sulfur-containing amino acids and

experimental cholestasis induced by alpha-naphthylisothiocyanate. *Food Chem Toxicol* 43:663-670

Kwon DY, Jung YS, Kim SJ, Park HK, Park JH, Kim YC (2009) Impaired sulfur-amino acid metabolism and oxidative stress in nonalcoholic fatty liver are alleviated by betaine supplementation in rats. *J Nutr* 139:63-68

Lee AH, Glimcher LH (2009) Intersection of the unfolded protein response and hepatic lipid metabolism. *Cell Mol Life Sci* 66:2835-2850

Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, DeCarli LM (2004) Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 79:502-509

Martínez-Chantar ML1, Corrales FJ, Martínez-Cruz LA, García-Trevijano ER, Huang ZZ, Chen L, Kanel G, Avila MA, Mato JM, Lu SC (2002) Spontaneous oxidative stress and liver tumors in mice lacking methionine adenosyltransferase 1A. *FASEB J.* 16(10):1292-4

Mato JM, Martínez-Chantar ML, Lu SC (2013) S-adenosylmethionine metabolism and liver disease. *Ann Hepatol.* Mar-Apr;12(2):183-9.

Mato JM, Cámara J, Fernández de Paz J, Caballería L, Coll S, Caballero A, García-Suey L, et al. (1999) S-adenosylmethionine in alcoholic liver cirrhosis: a randomized, placebo-controlled, double-blind, multicenter clinical trial. *J Hepatol.* 30:1081 - 9

Nolin TD, McMenamin ME, Himmelfarb J (2007) Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, and glutathione in human plasma by high-performance liquid chromatography: application to studies of oxidative stress. *J Chromatogr B* 852:554-561

Orolin J, Vecera R, Markova I, Zacharova A, Anzenbacher P (2009) Differences in hepatic expression of genes involved in lipid homeostasis between hereditary hypertriglyceridemic rats and healthy Wistar rats and in their response to dietary cholesterol. *Food Chem Toxicol* 47:2624-2630

Park SH (2008) Nonalcoholic steatohepatitis: pathogenesis and treatment. *Korean J Hepatol* 14:12-27

Park YJ, Ko JW, Jang Y, Kwon YH (2013) Activation of AMP-activated protein kinase alleviates homocysteine-mediated neurotoxicity in SH-SY5Y cells. *Neurochem Res* 38:1561-1571

Saha AK, Ruderman NB (2003) Malonyl-CoA and AMP-activated protein kinase: an expanding partnership. *Mol Cell Biochem* 253:65-70

Skipski VP, Barclay M, Barclay RK, Fetzer VA, Good JJ, Archibald FM (1967) Lipid composition of human serum lipoproteins. *Biochem J* 104(2):340-52

Song Z, Deaciuc I, Zhou Z, Song M, Chen T, Hill D, McClain CJ (2007)



Involvement of AMP-activated protein kinase in beneficial effects of betaine on high-sucrose diet-induced hepatic steatosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293:G894-902

Sowden MP, Collins HL, Smith HC, Garrow TA, Sparks JD, Sparks CE (1999) Apolipoprotein B mRNA and lipoprotein secretion are increased in McArdle RH-7777 cells by expression of betaine-homocysteine S-methyltransferase. *Biochem J* 341:639-645

Sparks JD, Collins HL, Chirieac DV, Cianci J, Jokinen J, Sowden MP, Galloway CA, Sparks CE (2006) Hepatic very-low-density lipoprotein and apolipoprotein B production are increased following in vivo induction of betaine-homocysteine S-methyltransferase. *Biochem J* 395:363-371

Steenge GR, Verhoef P, Katan MB (2003) Betaine supplementation lowers plasma homocysteine in healthy men and women. *J Nutr* 133:1291-1295

Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY, Zhou J, Maeda N, Krisans SK, Malinow MR, Austin RC (2001) Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J Clin Invest* 107:1263-1273

Xu XJ, Valentine RJ, Ruderman NB (2014) AMP-activated Protein Kinase (AMPK): Does This Master Regulator of Cellular Energy State

Distinguish Insulin Sensitive from Insulin Resistant Obesity? *Curr Obes Rep.* Jun 1;3(2):248-255

Yang J, Craddock L, Hong S, Liu ZM (2009) AMP-activated protein kinase suppresses LXR-dependent sterol regulatory element-binding protein-1c transcription in rat hepatoma McA-RH7777 cells. *J Cell Biochem* 106:414-426

Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM (1997) Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2557-2562

Yeh MM, Brunt EM (2007) Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Pathol* 128:837-847

Zhang W, Wang LW, Wang LK, Li X, Zhang H, Luo LP, Song JC, Gong ZJ (2013) Betaine protects against high-fat-diet-induced liver injury by inhibition of high-mobility group box 1 and Toll-like receptor 4 expression in rats. *Dig Dis Sci* 58:3198-206

Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin invest* 108:1167-1174

Zlatis A, Zak B (1969) Study of a new cholesterol reagent. *Anal Biochem* 29:143-148

## Abstract

# Protective effects of betaine against high-fat diet-induced liver steatosis in rats

Choi Yoo Jin

Preventive Pharmacy, College of Pharmacy

The Graduate School

Seoul National University

Non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) encompasses a wide spectrum of liver disease, ranging from simple steatosis to non alcoholic hepatitis that may be followed by fibrosis, and eventually, cirrhosis. Previous studies have revealed that betaine is hepatoprotective against various toxic substances. Its effects against liver injury may be related with the improvement of impaired sulfur amino acid metabolism. This study was designed to investigate the underlying mechanism involved in the anti-steatotic action by betaine in an early phase of NAFLD.

Twenty-four male rats were divided into four groups, each provided with a standard die (NC), NC supplemented with betaine (NB), high-fat liquid diet (HF), or HF supplemented with betaine (HB) for three weeks. Betaine was dissolved at 1 % (w/v) in the liquid diets.

Hepatic triglyceride (TG) and cholesterol were increased significantly in the HF groups. On the other hand, betaine supplementation prevented the increase in hepatic TG, but elevated serum cholesterol and TG levels. HF intake decreased phosphorylation of AMP-activated protein kinase (AMPK) and acetyl-CoA carboxylase (ACC), and increased liver-X-receptor  $\alpha$  (LXR $\alpha$ ) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c). Betaine supplementation restored phosphorylation of AMPK and ACC, and inhibited induction of LXR $\alpha$  and SREBP-1c. These results showed that betaine supplementation lead to a reduction of lipogenesis. HF intake decreased betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) expression and hepatic S-adenosylmethionine (SAM) concentration. Hepatic homocysteine concentration was increased in HF rats. Betaine supplementation up-regulated BHMT expression and SAM concentration, and decreased hepatic homocysteine concentration. Therefore, these data indicate that betaine effects related with sulfur amino acid metabolism. Hepatic apolipoprotein B (ApoB) and serum phosphatidylcholine (PC) levels were measured to investigate lipid secretion from liver into bloodstream. HF intake

unaltered the hepatic ApoB expression and decreased the concentration of serum PC, the betaine supplementation significantly elevated hepatic ApoB and serum PC levels.

The results suggest that both inhibition of lipid synthesis and enhancement of its secretion are involved in the anti-steatotic activity of betaine during the early stage of NAFLD, which may be associated with effects of betaine on the sulfur-containing amino acid metabolism in liver.

**Keywords : Non-alcoholic fatty liver disease, Lipogenesis,  
Lipid secretion, Homocysteine, Betaine,  
Sulfur amino acid metabolism**

**Student Number : 2012-23603**