



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

식이에 의한 체지방량 변화가
비만 마우스의 간 철 영양 상태에
미치는 영향

The effect of diet-induced change in fat mass
on hepatic iron status in obese mice

2016년 2월

서울대학교 대학원

식품영양학과

정 학

식이에 의한 체지방량 변화가
비만 마우스의 간 철 영양 상태에
미치는 영향

**The effect of diet-induced change in fat mass
on hepatic iron status in obese mice**

지도교수 한 성 립

이 논문을 생활과학석사 학위논문으로 제출함

2015 년 12 월

서울대학교 대학원

식품영양학과

정 학

정 학의 생활과학석사 학위논문을 인준함

2016 년 1 월

위 원 장: 권 영 래 (인)

부위원장: 신 흥 미 (인)

위 원: 한 성 립 (인)

국 문 초 록

식이에 의한 체지방량 변화가 비만 마우스의 간 철 영양 상태에 미치는 영향

서울대학교 대학원 식품영양학과

정 학

고지방 식이로 유도된 비만은 간의 철 저장량 저하를 유도하는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 비만과 관련된 간의 철 저장량 변화가 식이 변화를 통해 체지방량을 감소함으로써 회복될 수 있는지에 대하여 연구하였다. 5 주령의 C57BL/6 마우스를 세 군으로 임의 배정 후 LL 군은 열량의 10%를 지방으로 공급한 대조 식이를, HH 군은 열량의 60%를 지방으로 공급한 고지방 식이를 31 주간 급여하였다. HL 군은 15 주 간 고지방 식이를 제공한 후 16 주 간 대조 식이로 바꾸어 급여하였다. 14 주차와 30 주차에 각각 MRI 로 체지방량과 체지방량을 측정하였다. 간의 철 저장량을 측정하기 위해 간 조직의 철 함량을 ICP-MS 로

측정하였고, 철 저장에 관여하는 ferritin 단백질 수준을 Western blot 으로 측정하였다. 소장에서 철 흡수에 관여하는 duodenal cytochrome *b* (*Dcytb*)와 hephaestin (*Heph*)의 mRNA 수준을 real time PCR 로 측정하였다. 철 항상성을 조절하는 hepcidin (*Hamp*)의 간에서의 mRNA 수준과, *Hamp* 발현에 영향을 미치는 것으로 알려진 bone morphogenetic protein 6 (*Bmp6*)의 간과 소장에서의 mRNA 수준을 측정하였다. BMP6 가 작용하는 신호 전달 경로의 단백질인 Smad 의 인산화 정도를 Western blot 으로 측정하여 활성화 정도를 알아보았다. HH 군의 체지방량은 꾸준히 증가한 반면, HL 군은 고지방 식이에서 대조 식이로 식이를 변경한 후에 평균 3.2 g 감소하였다. 체지방량은 군 간 유의적으로 차이가 있었다 (LL 군 11.4 g, HL 군 15.8 g, HH 군 37.5 g, $P<0.05$). HL 군의 간 철 저장량은 LL 군과 유사한 수준이었으며, HH 군보다 30%가량 높은 값이었다 (LL 군 74.2 $\mu\text{g/g}$, HL 군 72.7 $\mu\text{g/g}$, HH 군 55.7 $\mu\text{g/g}$, $P<0.05$). *Dcytb* mRNA 수준은 HH 군에 비해서 HL 군에서 유의적으로 높았다. *Bmp6* mRNA 수준은 간에서는 유의적인 차이가 없었으나, 소장에서는 LL 군 및 HL 군에 비하여 HH 군에서 유의적으로 낮았다. 간의 Smad1/5 단백질의 활성화 정도에는 유의적인 차이가 있었는데, LL 군 및 HL 군에 비해 HH 군에서 Smad1/5 의 인산화 정도가 낮았다. 이와 같은 결과를 통해 철 영양 상태에 있어서 비만으로 인해 유발되는 부정적인 영향을 확인하였으며, 식이 변경을 통한 철 영양 상태의 회복 가능성에 대하여 새로운 정보를 제공하였다.

주요어: 비만, 식이 변경, 체지방 감소, 철, Dcytb, BMP6-Smad

학 번: 2013-21511

목 차

국문 초록.....	i
목 차.....	iv
표 목 차.....	vi
그림 목 차.....	vii
약어 목록.....	viii
I. 서론	1
II. 문헌 고찰	4
1. 비만과 철 결핍.....	4
2. 철의 흡수 기전.....	6
3. Hcpidin에 의한 철 항상성 조절.....	10
4. Hcpidin 발현 조절.....	12
5. 체중 감량에 따른 철 영양상태 변화.....	15
III. 연구 방법	18
1. 실험 설계.....	18
2. 실험식이.....	20
3. 사육 방법, 체성분 측정 및 시료 수집.....	22
4. 간의 철 저장량 분석.....	23
5. RNA 추출, cDNA 합성 및 real-time PCR.....	26

6. 단백질 추출과 Western blot analysis	30
7. 통계분석	34
IV. 실험 결과	35
1. 체중과 체지방량 변화 및 식이 섭취량	35
2. 간의 철 저장량	38
3. 소장 조직에서 <i>Dcytb</i> 및 <i>Heph</i> mRNA 수준	42
4. 간 조직에서 <i>Hamp</i> mRNA 수준	44
5. 간 및 소장 조직에서 <i>Bmp6</i> mRNA 수준	46
6. 간 조직에서 Smad 단백질의 인산화 정도	49
V. 고찰	51
VI. 요약	57
참고 문헌	59
Abstract	66

표 목 차

Table 1. Composition of the experimental diets.....	21
Table 2. Microwave heating program.....	24
Table 3. ICP-MS operating parameters	25
Table 4. Primer sequences for real-time quantitative PCR.....	29
Table 5. Body weight, fat mass, lean mass, and liver weight of LL, HL, and HH groups	36

그림 목 차

Figure 1. Mechanisms of duodenal absorption of heme and nonheme iron ..	9
Figure 2. Role of hepcidin in iron homeostasis	11
Figure 3. Induction of hepcidin expression by BMP6-Smad pathway	14
Figure 4. The experimental design	19
Figure 5. Percentage of fat and lean body mass of LL, HL, and HH groups at 14 th week and 30 th week.....	37
Figure 6. Hepatic iron content expressed as microgram of iron per gram wet tissue and microgram of iron per milligram of protein in LL, HL, and HH groups	39
Figure 7. Hepatic ferritin protein levels in LL, HL, and HH groups.....	40
Figure 8. Correlation between liver iron status indicators and body fat mass.....	41
Figure 9. mRNA levels of duodenal iron transporters.....	43
Figure 10. <i>Hamp</i> mRNA levels in the liver tissues, and correlation between <i>Hamp</i> mRNA expression and liver iron content in LL, HL, and HH groups	45
Figure 11. <i>Bmp6</i> mRNA levels in the liver and the duodenum of LL, HL, and HH groups	47
Figure 12. Correlation analysis of duodenal <i>Bmp6</i> with liver iron content ($\mu\text{g/g}$ tissue) and liver <i>Hamp</i> mRNA expression	48
Figure 13. Hepatic p-Smad/Smad ratio in LL, HL, and HH groups	50

약 어 목 록

ANOVA; analysis of variance

BMI; body mass index

BMP6; bone morphogenetic protein 6

BMPR; bone morphogenetic protein receptor

Dcytb; duodenal cytochrome *b*

hcp1; heme carrier protein 1

HFD; high-fat diet

LSD; least significant difference

mRNA; messenger RNA

p-Smad; phosphorylated Smad

PCR; polymerase chain reaction

Steap; Six trans-membrane epithelial antigen of the prostate

sTfR; serum transferrin receptor

I. 서 론

철은 주로 간, 비장, 골수에 저장되며 체내에서 여러 기능을 담당하는 필수 미량영양소이다 (Cairo et al. 2006). 철 결핍은 매우 흔해서 전 세계적으로 가장 흔한 영양소 결핍 중 하나로 꼽히고 있다 (Iron deficiency--United States, 1999-2000 2002). 이러한 철 결핍 유병률의 증가와 비만의 관련성이 여러 연구들을 통해 제시되었다. 비만 또는 과체중인 소아 및 청소년들은 정상 체중에 비해 철 결핍인 비율이 높았다 (Moayeri et al. 2006; Pinhas-Hamiel et al. 2003). 미국 소아 중 BMI 백분위수가 85번째 이상인 경우 그렇지 않은 소아에 비해 철 결핍일 확률이 2배 이상 높았다 (Nead et al. 2004). 또한 비만은 폐경 전과 폐경 후의 여성을 대상으로 한 연구들에서도 철 영양 상태 감소와 관련성이 있는 것으로 나타났다 (Lecube et al. 2006; Tussing-Humphreys et al. 2010).

선행연구 결과 고지방 식이로 유도된 비만 마우스에서 간의 철 저장량이 유의적으로 낮게 관찰되었다 (Chung et al. 2011). 하지만 비만에서 철 영양 상태 저하의 기전은 정확히 알려지지 않았다. 선행연구결과에 의하면 비만에서 철 결핍 유병률의 증가는 철 섭취량의 차이로는 설명될 수 없었다 (Menzie et al. 2008; Cepeda-Lopez et al. 2011). 축적된 체지방과 비만에서 유발되는 염증 반응이 hepcidin의 철 항상성 조절 기전을 방해하는 것으로 생각된다 (Bekri et al. 2006; Ausk and Ioannou 2008; Zafon et al. 2010). 선행연구에서 간의 *Hamp* mRNA

발현 정도가 대조군에서는 간의 철 저장량과 양의 상관관계가 있었으나 비만 군에서는 이러한 상관관계가 나타나지 않았다 (Chung et al. 2011). 이는 체내 철 저장량에 따른 *Hamp* 발현의 조절이 비만 상태에서 흐트러져 있음을 의미한다. 최근 Sonnweber et al. (2012)의 연구에서는 고지방 식이가 소장 철 흡수를 감소시킴으로써 철 결핍을 유발한다고 주장하였는데, 이는 비만에서 철 결핍을 유도하는 또 하나의 작용 기전일 수 있다.

비록 정확한 기전은 밝혀지지 않았으나, 비만이 체내 철 저장량의 저하를 유발한다는 것은 명확하다. 하지만 이러한 비만과 관련된 철 영양 상태의 변화들이 비만을 완화시켰을 때 회복이 가능한지에 대해서는 아직까지 논란이 있다. Tussing-Humphreys et al. (2012)은 리뷰 논문을 통해 체중 감소에 따른 철 영양 상태의 변화를 관찰한 여러 연구들을 정리하였는데, 연구들 간의 결과가 일치하지 않고 있다. 비만 수술 (bariatric surgery)으로 체중 감량이 유도된 후 철 영양 상태를 반영하는 혈중 지표들을 측정된 결과, 증가했거나 (Anty et al. 2008) 감소했거나 (Ruz et al. 2009; Toh et al. 2009) 또는 변화가 없었다고 (Gasteyer et al. 2006) 보고한 연구들이 모두 존재하였다.

식이변화만을 통해서 유도된 체중 감량이 철 영양 상태에 미치는 효과에 관해서도 일정한 결과가 관찰되지 않고 있다. 비만인 소아가 13주 동안 저열량 식이를 섭취하여 체중을 감량한 후 혈중 철 지표를 측정하였더니 유의적인 변화가 관찰되지 않았다 (Di Toro et al. 1997). 폐경 전 여성을 대상으로 한 연구에서는 15주 간의 열량 제한을

통해 체중을 평균 12.3 kg (체지방으로 평균 10.4 kg) 감소한 결과 헤모글로빈 및 헤마토크릿 수치가 유의적으로 감소하였다 (Kretsch et al. 1998). 하지만 다른 연구에서는 6개월 동안 체중 감량 프로그램을 통해 BMI가 감소한 소아에게서 철 흡수 증가와 혈중 철 농도의 증가를 관찰하였다고 보고하였다 (Amato et al. 2010). 또한 6주 간 저열량 식이를 섭취하여 체중 감량에 이른 비만 여성들에게서 헤모글로빈 수치의 증가가 보고되었다 (Rodríguez-Rodríguez et al. 2007).

인체 연구들에서의 결과들이 일치하지 않는 이유는 아직까지 명확하지 않은데, 대상자의 특징이나 연구 환경 등의 내재적 요인들이 이러한 결과에 영향을 미쳤을 수 있다. 마우스 모델은 비만이 전반적인 체내 시스템에 미치는 영향을 연구하는 데 가장 흔하게 사용되며, 통제된 환경에서의 사육을 통해 인체 연구에서 나타나는 영향 요인들을 최소화할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 마우스 모델을 이용하여 비만도의 변화에 따른 철 영양 상태의 변화를 살펴보고자 하였다. 고지방 식이로 비만을 유도한 후 저지방 식이를 급여함으로써 체지방량을 감소시켰을 때, 간 조직의 철 함량을 측정하여 비만 상태에서 유도되었던 철 결핍이 다시 회복될 수 있는지를 알아보하고자 하였다.

II. 문 헌 고 찰

비만과 철 결핍

철 결핍은 전 세계적으로 가장 흔한 영양 결핍증으로, 빈혈을 유발하는 가장 주요한 원인이다 (Iron deficiency--United States, 1999-2000 2002). 비만은 이러한 철 결핍을 유발하는 한 요인으로 꾸준히 보고되고 있다. 이스라엘의 소아 및 청소년을 대상으로 한 연구에서는 체질량지수 (body mass index; BMI)와 혈중 철 수치가 유의한 음의 상관관계를 보였으며, 정상체중일 경우 4.4%가 철 결핍이었던 것에 비해 과체중일 경우 12.1%, 비만일 경우 38.8%가 철 결핍인 것으로 나타났다 (Pinhas-Hamiel et al. 2003). 11~17세 이란 학생들의 비만도와 철 수치 사이의 관련성을 연구한 결과 또한 과체중 및 비만군이 정상 체중군에 비해 철 결핍 유병률이 두 배 이상 유의적으로 높았다 (Moayeri et al. 2006). 상대적으로 철 결핍 유병률이 덜한 미국에서도 소아 및 청소년에서 비만과 철 결핍 간의 상관성이 보고된 바 있다. BMI 백분위수가 85번째 이상인 소아는 그렇지 않은 소아에 비해 철 결핍일 확률이 두 배 이상 높았다 (Nead et al. 2004).

이러한 상관성은 성인에서도 나타나는데, Lecube et al. (2006)은 비만인 폐경 이후 백인 여성의 경우 혈중 수용성 transferrin 수용체 (sTfR) 농도가 정상 체중의 여성에 비해 유의적으로 높았다고 보고하였다. 폐경 전 여성을 대상으로 한 연구 (Tussing-Humphreys et al. 2010)에서도 sTfR

수치가 비만일 경우에 유의하게 높았다. sTfR의 농도는 세포막에 존재하는 transferrin 수용체의 농도와 비례하며, 체내 철 요구량이 증가하면 그 농도가 높아진다. 따라서 비만에서 관찰된 sTfR 농도의 증가는 비만에 의한 철 결핍을 반영한다고 볼 수 있다.

비만에서 철 영양 상태 저하의 기전은 아직까지 명확하게 알려지지 않았다. 비만에 의한 용적의 증가, 비만 상태에서 유발되는 염증 반응, 철 흡수 기능의 변화 등을 포함한 여러 가지 가능성이 제기되고 있다 (Tussing-Humphreys et al. 2012). 선행 연구결과에 의하면 비만에서 철 결핍 유병률의 증가는 철 섭취량의 차이로는 설명될 수 없었다. 비만인 성인과 정상 체중인 성인의 철 영양 상태와 함께 식이 섭취량을 분석한 결과, 비만군이 유의적으로 혈중 철 농도가 낮았으나 하루 총 철 섭취량에는 차이가 없었다. 철 흡수에 영향을 미치는 것으로 알려져 있는 피트산, 옥살산, 난류, 커피, 차, 아연, 구리 등의 섭취에도 유의한 차이가 없었다 (Menzie et al. 2008). 비만 및 정상체중의 멕시코 여성을 대상으로 한 연구 (Cepeda-Lopez et al. 2011)에서도 회귀분석 결과 철 섭취량은 철 영양 상태를 예측하는 지표가 되지 못하는 것으로 나타났다.

철의 흡수 기전

식이 철은 헴철 또는 비헴철의 형태로 식품 중에 존재하며 상부위장관, 즉 십이지장에서 가장 활발하게 흡수가 이루어진다. 헴철과 비헴철의 흡수 기전을 **Figure 1**에 나타내었다. 헴철의 흡수 기전은 비헴철에 비해서는 명확하게 알려져 있지 않다. 헴철이 흡수되기 위해서는 우선 식품 중에서 헴철이 결합되어 존재하는 헤모글로빈이나 미오글로빈으로부터 헴의 분리가 일어나야 하며, 헴이 분리된 후에 철은 헴에 결합된 상태 그대로 흡수가 일어난다. 장세포의 용모에 존재하는 헴 운반 단백질 1 (heme carrier protein 1; hcp1)이 헴철의 흡수에 주요하게 작용하는 것으로 생각된다. 헴철이 hcp1에 의해 흡수되고 나면 장세포 내에서 헴 산소화효소 (heme oxygenase)에 의해 헴의 포르피린 고리가 가수분해되면서 철이 헴으로부터 분리된다.

비헴철의 흡수가 일어나기 위해서는 먼저 위산이나 단백질 분해 효소 등의 작용으로 식품 조직과 철의 분리가 일어나야 한다. 분리된 철 이온은 대부분 3가 (Fe^{3+}) 형태로 존재하는데, 2가 (Fe^{2+}) 형태로 환원되어야만 소장의 철 수송체에 의해 흡수가 일어날 수 있다. 일부 Fe^{3+} 은 위의 산성에 의해 자연적으로 환원될 수 있으나, 그렇지 않은 경우 소장 용모에 존재하는 환원 효소에 의해 Fe^{2+} 형태로 전환된 후 흡수가 일어나게 된다. 대표적인 환원 효소는 duodenal cytochrome *b* (Dcytb)이다 (Wyman et al. 2008). *Dcytb*의 발현량은 철 결핍 시 증가하며 mRNA 수준에서 주로 조절이 일어나는 것으로 보고되어 있다. Six trans-

membrane epithelial antigen of the prostate (Steap) 단백질 또한 소장 철 환원에 관여할 가능성이 제시되었는데, 특히 Steap2가 소장에서 발현됨이 확인되었다 (Ohgami et al. 2006).

환원 효소에 의해 전환된 Fe^{2+} 는 소장 용모의 철 수송체인 divalent metal transporter 1 (DMT1)에 의해 장세포 내부로 이동한다. 이 역할을 하는 수송체는 DMT1이 유일할 것으로 추측된다. 소장에서 특이적으로 *Dmt1*이 없는 마우스의 경우 극심한 빈혈이 유발되었다 (Gunshin et al. 2005). 흡수 후에는 장세포에서 사용되거나 ferritin 형태로 일부 저장되고, 남은 철은 장세포의 기저측면막 (basolateral membrane)에 존재하는 방출 수송체인 ferroportin에 의해 혈중으로 이동하여 기타 장기로 전달될 수 있다.

혈중에서 철이 이동하기 위해서는 apotransferrin 단백질과 결합하여 transferrin 상태가 되어야 하는데, 이 결합이 이루어지기 위해서는 흡수 과정에서 2가로 환원되었던 철이 다시 3가로 산화되어야 한다. 이 과정을 매개하는 단백질은 hephaestin으로, ferroportin과 인접한 곳에 위치하면서 ferroportin을 통해 이동된 Fe^{2+} 를 바로 산화시킴으로써 장세포로부터 철의 방출을 돕는다 (Mackenzie and Garrick 2005).

비만이 철 결핍을 유발하는 요인으로서 소장에서의 철 흡수 저하 가능성이 제기되고 있다. 태국, 모로코와 인도의 성인 여성을 대상으로 진행된 한 연구 (Zimmermann et al. 2008)에서는 대상들의 철 영양 상태에 관계 없이 BMI가 소장에서의 철 흡수 정도와 음의

상관관계가 있다고 보고하였다. 또한 Sonnweber et al. (2012)은 고지방 식이가 마우스 소장에서의 철 흡수를 감소시키는 것을 관찰하였다. 하지만 최근의 한 연구 (Bertinato et al. 2014)에서는 식이로 유도된 비만 랫드의 소장 점막에서 DMT1, ferroportin의 mRNA 발현량과 단백질 수준을 측정하였더니 정상체중군과 차이가 없었다는 상충되는 결과를 보고하기도 하였다.

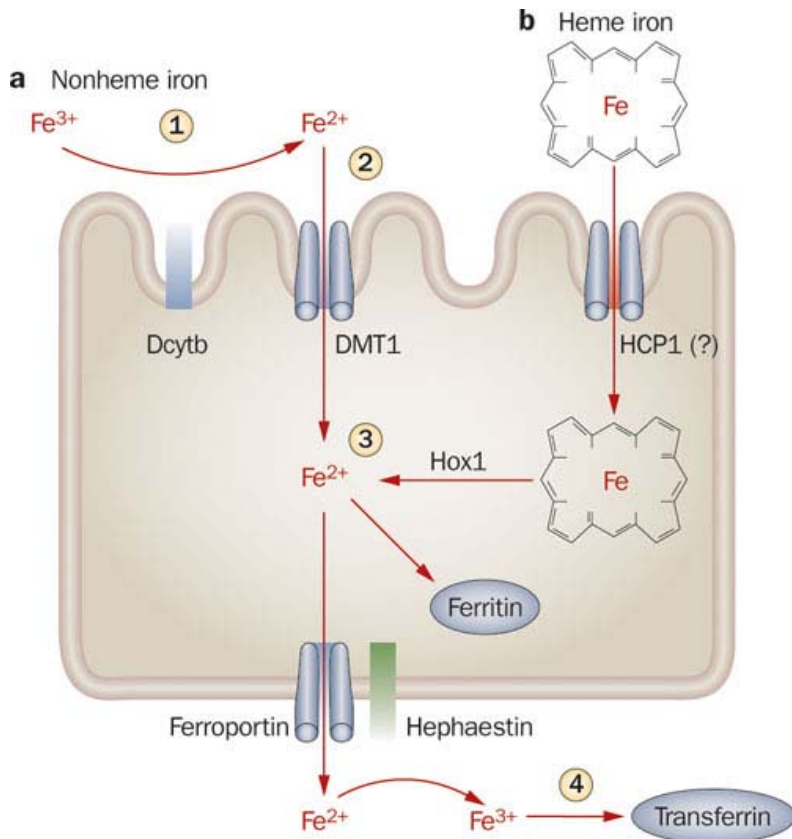


Figure 1. Mechanisms of duodenal absorption of heme and nonheme iron (Stein et al. 2010)

Hepcidin에 의한 철 항상성 조절

Hepcidin은 철 항상성 조절 호르몬으로 25개의 아미노산으로 이루어진 단백질이며, 간세포에서 주로 생성 및 분비된다 (Hentze et al. 2010). Hepcidin은 유일한 철 방출 수송체인 ferroportin에 붙어서 ferroportin의 내재화와 유비퀴틴화, 리소좀을 통한 분해를 유도함으로써 철이 세포 외로 방출되는 것을 막는다. Ferroportin은 소장세포, 대식세포, 간세포 등의 표면에 발현된다. 따라서 hepcidin의 ferroportin 작용 저해는 1) 소장에서 철이 체내로 흡수되는 것을 억제하고, 2) 세망내피계 (reticuloendothelial system)의 대식세포로부터 철을 방출시켜 재사용하는 기전을 억제하며, 3) 철의 주요 저장소인 간에서 저장 철의 방출을 억제하는 작용을 한다 (Nemeth et al. 2004) (Figure 2). Hepcidin 조절 유전자 등의 이상으로 인해 hepcidin이 과도하게 형성되면 철 결핍증이, 반대로 형성되지 않으면 과도한 철의 흡수로 인한 철 독성이 발생한다.

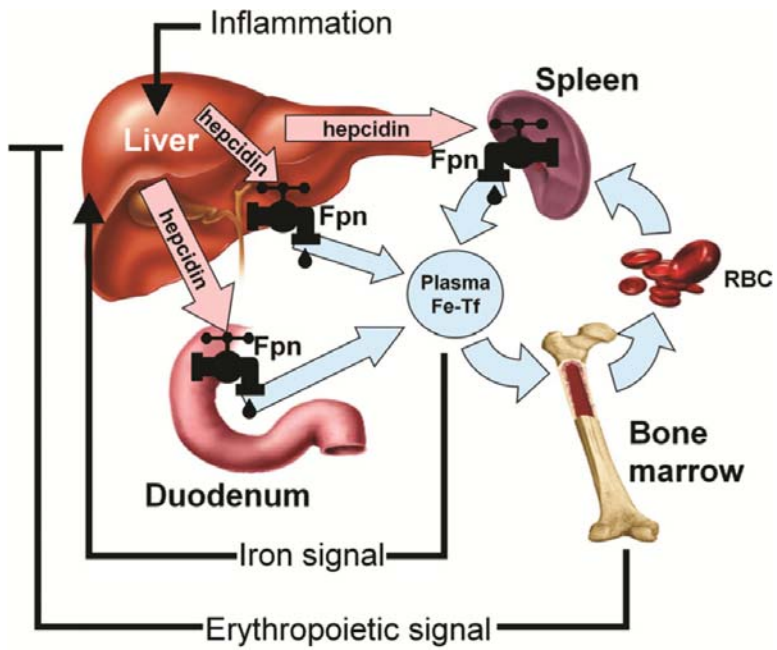


Figure 2. Role of hepcidin in iron homeostasis (Koenig et al. 2014)

Fpn, ferroportin.

Hepcidin 발현 조절

Hepcidin (*Hamp*)의 mRNA 발현 수준은 체내 철 저장량에 의해 조절 받는다. Pigeon et al. (2001)의 연구에서 철 보충 식이를 섭취한 BALB/cJ 마우스의 간에서의 *Hamp* mRNA 수준이 대조군에 비해 유의적으로 낮았다. 식이 철의 보충 정도가 증가함에 따라 간의 철 농도가 증가하였고 간의 *Hamp* mRNA 발현량 또한 용량 의존적으로 감소하였다. *In vitro*에서 진행된 또 다른 연구에서는 마우스의 간세포를 분리하여 배양하면서 transferrin에 대한 *Hamp* mRNA 발현량 변화를 비교하였다. 그 결과 철이 결합하지 않은 형태인 apotransferrin에는 간세포의 *Hamp* mRNA가 반응하지 않은 반면, 철이 모두 결합한 형태인 holotransferrin에는 반응하여 발현 정도가 증가하였다 (Lin et al. 2007). 이는 간의 철 함량과 혈중 transferrin 포화도의 변화가 간의 *Hamp* 발현의 변화를 유도함을 시사한다.

Hamp 발현에 관여하는 주요한 신호 전달 체계 중 하나는 Bone morphogenetic protein (BMP)-Smad pathway이다 (Figure 3). BMP는 transforming growth factor (TGF)- β superfamily에 속하는 단백질로서, 간세포 막에 존재하는 BMP 수용체 (BMPR)에 결합하여 복합체를 형성하면 세포 내에서 신호전달물질이 활성화되어 *Hamp*의 mRNA 발현 수준에 영향을 미친다 (Knutson 2010). BMPR은 세린/트레오닌 키나아제 수용체로 막관통단백질이며 BMPRI, BMPRII의 두 종류가 있다. 두 개의 BMPRI과 두 개의 BMPRII가 BMP 단백질을 리간드로 하여 복합체를 형성하면

BMPRII가 BMPRI의 인산화를 일으킨다. 인산화된 BMPRI은 세포 내부의 신호 전달 물질인 Smad 단백질 (Smad 1, Smad5, Smad9)를 다시 인산화한다. Smad1/5/9의 인산화는 Smad4와의 결합을 가능하게 하고, 결합된 이형이량체 (heterodimer)는 핵 속으로 이동하여 *Hamp*의 발현에 영향을 미치는 전사 인자로 작용하게 된다 (Wrana 2013; Camaschella 2009). BMP 단백질에는 여러 종류가 있으며 BMP2, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP9 등이 *Hamp*의 발현을 유도할 수 있는 것으로 보고되었으나, 이 중 BMP6가 가장 주요한 hepcidin 조절 인자로 증명되었다. *Bmp6* 유전자가 없는 마우스는 유전성 혈색소침착증 (hemochromatosis)과 유사한 표현형을 보였으며 (Andriopoulos et al. 2009), 간에 매우 과도한 철 축적이 발생하였다 (Meynard et al. 2009). 이를 통해 BMP6의 *Hamp* mRNA 발현 유도 작용은 다른 종류의 BMP 단백질로는 대체될 수 없음이 확인되었다.

체내 철의 수준이 어떤 기전으로 BMP-Smad pathway에 영향을 미치는지에 대해서는 정확히 알려지지 않았다. Corradini et al. (2011)이 발표한 연구에 따르면 간의 철 농도가 간의 *Bmp6* mRNA 발현 수준 및 Smad 단백질의 인산화 정도와 양의 상관관계가 있었다. 반면 높은 혈중 transferrin 포화도는 간의 Smad1/5/9 활성화를 유도하였지만 간의 *Bmp6* mRNA 수준에는 영향을 미치지 못하였다. 따라서 혈중 철과 조직에 저장된 철은 BMP-Smad pathway에 영향을 미치는 기전이 서로 다를 것으로 생각된다.

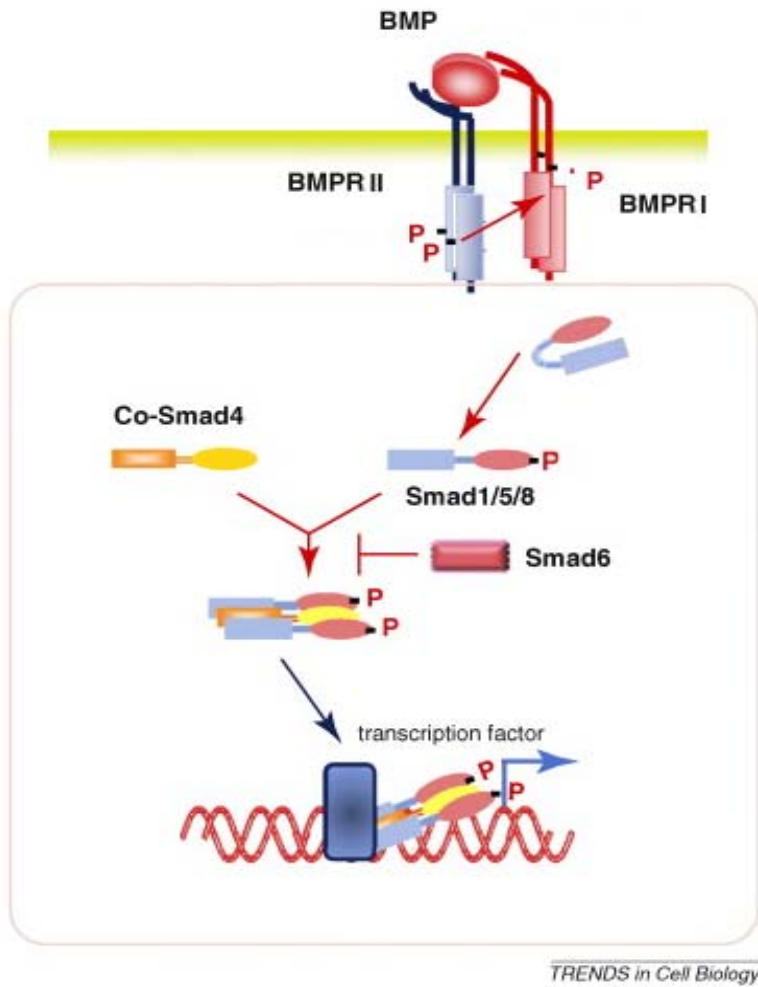


Figure 3. Induction of hepcidin expression by BMP6-Smad pathway (Pardali et al. 2010)

체중 감량에 따른 철 영양상태 변화

비록 명확한 기전에 대해서는 더 많은 연구가 진행되어야 하지만, 고지방 식이로 유도된 비만이 철 영양 상태의 저하를 유발한다는 것은 이미 많은 연구들을 통하여 증명된 바 있다. 하지만 비만과 관련된 철 영양 상태의 변화들이 비만을 완화시켰을 때 같이 해결될 수 있는 가역적인 변화인지에 대한 연구는 아직 부족한 실정이다. Tussing-Humphreys et al. (2012)은 리뷰 논문을 통해 체중 감량에 따른 철 상태 변화를 관찰한 여러 연구들을 정리하였으나, 연구들 간의 결과가 서로 일치하지 않고 있다.

병적인 비만 환자에게서 비만수술 (bariatric surgery)을 시행한 이후, 체중 감량에 따른 환자의 영양 상태의 변화에 대한 연구는 많이 수행되어 왔다. 전통적인 관점에서 보았을 때 비만수술은 1) 위산 생성의 감소로 인한 철 환원 감소, 2) 소화 능력의 저하로 인한 육류 섭취 감소, 3) 위장관 용적 감소로 인한 철 흡수율 감소 등으로 인하여 철 결핍을 유발할 것으로 생각되어 왔다 (Shankar et al. 2010). 이에 상응하게 몇몇 연구들에서는 비만수술 이후 철 흡수 감소, 헤모글로빈 수치 감소, 철 결핍 유병률 증가 등의 결과가 보고되었다 (Ruz et al. 2009; Toh et al. 2009). 반면 Anty et al. (2008)은 비만 수술 후 수술 전에 비해 오히려 증가된

transferrin 포화도를 관찰하였다. 또한 비만 수술 이후 철 영양 상태의 변화가 관찰되지 않은 연구들도 있었다 (Updegraff and Neufeld 1981; Gasteyger et al. 2006).

수술적 접근이 아닌 식이 변화를 통해 유도된 체중 감량이 철 영양 상태에 미치는 영향에 대한 연구 결과들도 서로 일치하지 않고 있다. Amato et al. (2010)은 6개월 간의 체중 감량 프로그램에 참가하여 BMI가 감소한 소아를 대상으로 철 영양 상태를 비교하였다. 소장에서의 철 흡수 정도와 혈중 철 농도를 측정한 결과, 체중 감량 전과 비교하여 유의한 증가가 관찰되었다. 성인 여성을 대상으로 한 연구에서는 두 종류의 저열량 식이를 6주간 섭취시키고 혈액 지표를 분석하여 철 영양 상태의 변화를 관찰하였다. 저열량 식이 섭취 결과 식이 변경 전과 비교하여 헴철의 섭취는 감소하고 비헴철의 섭취는 증가하였으며, 혈중 헤모글로빈 농도의 증가가 나타났다 (Rodríguez-Rodríguez et al. 2007). 이러한 연구 결과들은 식이 변화를 통한 체중 감량이 철 영양 상태를 개선시킬 수 있다는 것을 의미한다.

반면, 비만인 소아들을 대상으로 한 다른 연구에서는 13주 간 저열량 식사의 섭취를 통해 체중 감량을 유도하였을 때 혈중 철 지표들에서 유의한 변화가 관찰되지 않았다 (Di Toro et al. 1997). 또한 비만한 폐경 전 여성에게 충분한 철을 보충시키면서 15주 간의 열량 제한을 통해 체

중을 평균 12.3 kg (체지방량 평균 10.4 kg) 감량을 유도한 다른 논문에서는 혈중 헤모글로빈, 헤마토크릿 수치와 적혈구 수가 오히려 유의적으로 감소하였다 (Kretsch et al. 1998). 따라서 체중 감량에 따른 철 영양 상태의 정확한 변화를 파악하기 위한 추가적 연구가 필요할 것으로 생각된다.

III. 연구 방법

1. 실험 설계

4주령의 암컷 마우스 (C57BL/6 mouse)를 The Jackson Laboratory의 JAX® Mice (Bar Harbor, ME, USA)에서 구입하여 Tufts University의 Jean Mayer USDA Human Nutrition Research Center on Aging (HNRCA) 동물사육장의 SPF (specific pathogen-free) room에서 사육하였다. 실험동물은 5일간 대조 식이로 적응기간을 거쳤고 평균체중이 유사하도록 6~8마리씩 세 군에 나누어 임의 배정하였다. 개략적인 실험 설계는 **Figure 4**에 정리하여 나타내었다. 실험 동물의 구입 및 사육, 희생의 전 과정은 Tufts University의 Jean Mayer USDA HNRCA Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)의 승인을 받았으며, 규정에 따라 수행되었다.

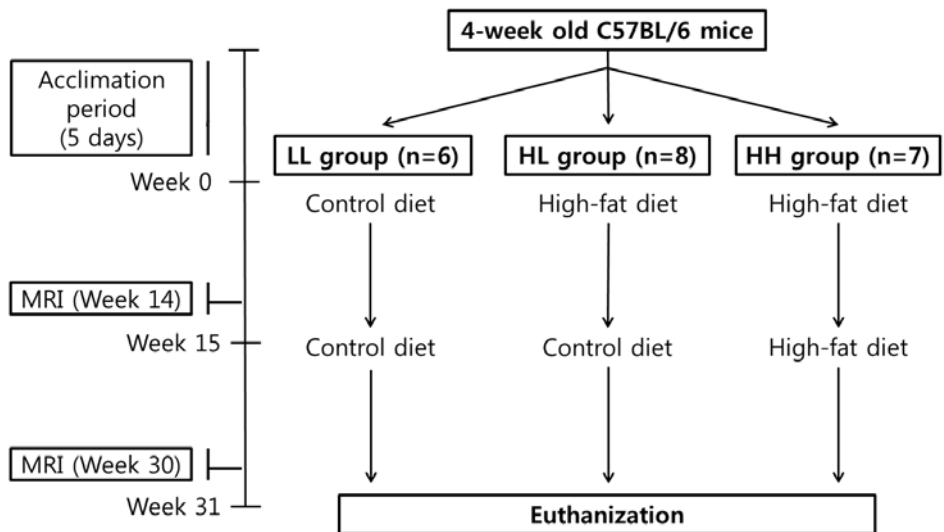


Figure 4. The experimental design

2. 실험식이

실험 식이는 AIN-76A 정제 식이 조성을 바탕으로 하여 식이 지방 함량에 따라 대조군 식이와 고지방 식이의 두 가지로 공급하였다. 두 식이 모두 Research Diets Inc. (New Brunswick, NJ, USA)에서 주문되었으며 대조군 식이는 D12450B, 고지방 식이는 D12492 제품을 이용하였다. 대조군 식이는 전체 열량의 10%를 지방으로 공급하였고, 고지방 식이는 전체 열량의 60%를 지방으로 공급하였다. 실험 식이의 전체 조성은 **Table 1**에 나타내었다.

LL (Low fat - Low fat) 군은 사육하는 31주 동안 대조군 식이를 섭취시켰고 HH (High fat - High fat) 군은 같은 기간 동안 고지방 식이를 섭취시켰다. HL (High fat - Low fat) 군은 처음 15주 동안은 고지방 식이를 공급하다가 이후 16주 동안은 대조군 식이로 바꾸어 섭취시켰다.

실험 식이는 수령 후 실험 동물에게 제공되기 전까지 4 °C에서 보관되었고 식이 및 멸균된 3차 탈 이온수는 자유급여 (*ad libitum*) 되었다.

Table 1. Composition of the experimental diets

	Standard 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 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. 사육 방법, 체성분 측정 및 시료 수집

실험 동물은 한 케이지 당 한 마리씩 분리하여 사육되었으며, 사육실 환경은 온도 23 ± 3 °C, 상대습도 55 ± 10 %, 명암은 12시간 주기로 유지되었다. 실험 동물의 체중은 주 1회 측정되었고 식이섭취량은 0, 4, 8, 12, 30주에 한번씩 측정하였다.

사육 14주차와 30주차에 EchoMRI™-700 (Houston, TX, USA)을 이용하여 실험 동물의 체성분을 측정하였다. 튜브에 쥐를 한 마리씩 넣고 튜브 안쪽으로 끝까지 이동하게 만든 후 움직임이 최소화되도록 막대를 천천히 밀어서 고정한 다음 스캔하였다. 한 쥐 당 세 번씩 측정하여 체지방량과 체지방량의 평균값을 기록하였다.

실험 식이 기간이 끝난 후 실험동물을 12시간 동안 금식시키고 CO₂ 과다 흡입 방식을 이용하여 희생시켰다. 희생 직후 해부하여 간 및 소장을 적출하였고 십이지장과 회장을 분리하였다. 조직은 액체질소로 즉시 동결시킨 다음 분석 전까지 -80 °C에서 보관하였다.

4. 간의 철 저장량 분석

간조직 200 mg을 취하여 55 °C 건조 오븐에서 60시간 동안 건조하였다. 건조 중량을 측정 및 기록하고 US environmental protection agency (EPA)의 방법 3051에 따라 샘플을 산분해하였다 (Test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods (SW-846) 1996). 건조된 간조직을 perfluoroalkoxy (PFA) 테플론 용기에 넣고 70% 질산 용액 10 mL를 넣은 다음 밀봉하였다. 용기를 MDS-2000 Microwave Sample Digestion System (CEM Corp., Matthews, NC, USA)에 넣고 **Table 2**의 조건으로 가열하였다. 시료를 냉각한 다음 Whatman No. 40으로 거르고 20 mL 용량플라스크에 3차 증류수 (DW)를 이용하여 정용하였다. 분해된 용액의 철 함량을 Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (ICP-MS; Varian 820-MS, Mulgrave, Australia)를 통해 측정하였다. ICP-MS의 작동 조건은 **Table 3**에 제시하였다.

Table 2. Microwave heating program

Stage	Max	Power (%)	Time (min.)	Pressure (psi)	Temperature (°C)	Hold (min.)
1	1200 W	100	20	300	165	0
2	1200 W	100	10	300	175	10

Table 3. ICP-MS operating parameters

Parameters	Value
R.F.Power (kW)	1.4
Plasma gas flow (L/min)	18.0
Auxiliary gas flow (L/min)	1.60
Nebulizer gas flow (L/min)	1.00
Sheath gas flow (L/min)	0.22
Pump Rate (rpm)	5
Stabilization delay (s)	30
<i>Mass spectrometer parameters</i>	
Scan time (ms)	492
Replicates time (s)	9.83
Replicates	3
Isotope monitored	⁵⁶ Fe

5. RNA 추출, cDNA 합성 및 real-time PCR

5.1. RNA 추출

간조직 50 mg 또는 소장조직 20 mg을 취한 후 RNAiso Plus (Takara, Shiga, Japan)를 이용하여 RNA를 추출하였다. 조직을 잘라 RNAiso Plus 용액 1 mL에 넣고 균질화 (homogenization)하였다. 그대로 상온에서 5분간 두었다가 chloroform (Sigma, St. Louis, MO, USA) 200 μ L를 넣고 15초 이상 vortexing하였다. 다시 상온에서 3분간 두었다가 12000 \times g, 4 $^{\circ}$ C에서 15분간 원심분리 하였다. 분리된 층 중 상층액을 취하여 새로운 e-tube에 옮겨 담고 500 μ L isopropanol (Sigma)을 넣은 후 vortexing하였다. 이를 상온에서 10분간 두었다가 12000 \times g, 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 원심분리 하였다. Pellet이 생긴 것을 확인하고 상층액을 버린 다음 75% ethanol 1 mL로 1회 washing하였다. 다시 7500 \times g, 4 $^{\circ}$ C에서 2분간 centrifuge하여 ethanol을 모두 버리고 pellet을 완전히 말렸다. Pellet이 다 마른 후 0.05% DEPC-treated DW 50 μ L를 분주하고 pipetting하여 pellet을 잘 녹였다. 이중 소량을 다시 희석해서 분광광도계 (DU530, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)를 이용하여 260 nm, 280 nm 파장에서의 흡광도를 측정함으로써 RNA의 농도와 순도를 측정하였다. A280 대비 A260값이 1.7 이상인 것을 확인하고 측정된 농도를 바탕으로 RNA를 0.5 μ g/ μ L의 농도가 되도록 희석하여 agarose 전기영동으로 추출된 RNA의 질을 확인하였다. 사용시까지 -80 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

5.2. cDNA 합성

Takara사의 PrimeScript 1st strand cDNA synthesis kit를 사용하여 추출된 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. PCR tube에 RNA stock 4 μ L, dNTP (10 mM each) 1 μ L, oligo dT primer (50 μ M) 1 μ L, RNase free DW 4 μ L를 넣은 후 spin down하여 RNA:primer mixture를 만들었다. 이를 65 $^{\circ}$ C와 4 $^{\circ}$ C에서 각각 5분씩 incubation한 다음, 여기에 5 \times PrimeScript buffer 4 μ L, RNase inhibitor (40 U/ μ L) 0.5 μ L, PrimeScript Rtase (200 U/ μ L) 1 μ L, RNase free DW 4 μ L를 더해 reaction mixture를 만들었다. Spin down하고 vortexing한 후 다시 spin down하여 상온에서 10분간 방치하였다. 2720 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 42 $^{\circ}$ C에서 50분, 95 $^{\circ}$ C에서 5분동안 차례로 반응시켜서 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 -4 $^{\circ}$ C로 냉각시킨 후 꺼내어 사용시까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

5.3 Quantitative real-time PCR

Real-time PCR용 Fast 8-tube (Applied Biosystems)에 forward와 reverse primer 각각 0.4 μ L, ROX reference dye (50 \times) 0.4 μ L, SYBR Premix Ex Taq (2 \times) 10 μ L, autoclaved DW 7.8 μ L를 cDNA 5배 희석액 1 μ L와 섞고 spin down하여 공기방울을 완전히 없앤 후, StepOne Real-time PCR system (Applied Biosystems)을 사용하여 반응시켰다. SYBR Premix와 ROX dye는 Takara사의 제품을 사용하였으며, primers는 측정하고자 하는 유전

자에 특이적으로 조건에 맞게 검색하여 Biomedica사 (Bucheon, Korea)를 통해 제조하여 사용하였다. 각 유전자 별 primer 염기 서열은 **Table 4**에 나타내었다. 반응 조건은 우선 95 °C에서 30초간 유지시키고, 95 °C에서 5초간 변성 (denaturation) 후 60 °C에서 30초간 결합 및 신장 (annealing & extension)시키는 조건을 40회 반복하였다. 이후 95 °C에서 15초, 60 °C에서 60초, 95 °C에서 15초간 반응시켜 melt curve를 얻었고 각 유전자당 하나의 특이적 peak가 나오는 것을 확인하였다. 각 실험은 duplicate하여 평균값을 사용하였으며 Ct 값은 house-keeping 유전자인 *Gapdh*의 발현량으로 보정하였다. 유전자 발현량은 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 계산법을 이용하여 control군 대비 상대정량 하였다.

Table 4. Primer sequences for real-time quantitative PCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>Hamp</i>	TTGCGATAACCAATGCAGAAGA	GATGTGGCTCTAGGCTATGTT
<i>Bmp6</i>	GGGGAGGCGAACATTAGGTA	AAACCACGAAACAAACAGCACA
<i>Dcytb</i>	GCAGCGGGCTCGAGTTTA	TTCCAGGTCCATGGCAGTCT
<i>Heph</i>	TTGTCTCATGAAAGAACATTACAGCAC	CATATGGCAATCAAAAGCAGAAGA
<i>Gapdh</i>	GGAGAAACCTGCCAAAGTA	AAGAGTGGGAGTTGCTGTTG

Hamp, hepcidin; *Bmp6*, bone morphogenetic protein 6; *Dcytb*, duodenal cytochrome B; *Heph*, Hephaestin; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

6. 단백질 추출과 Western blot analysis

6.1. 총 단백질 추출 및 정량

보관해 두었던 간조직을 500 mg 취하여 RIPA 용액 500 μ L에 넣고 균질화하였다. 사용한 RIPA 용액은 50 mM Tris-Cl (pH 7.4), 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF, 1 mM Na pyrophosphate, 1 mM β -glycerophosphate, 10% glycerol 조성의 용액을 만들고 용액 10 mL 당 protease inhibitor cocktail tablet (cOmplete Mini, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)을 1개 넣어 제조하였다. 균질화된 용액을 얼음에서 30분간 두어 충분히 용해될 수 있도록 한 후 12000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ 조건에서 20분 동안 원심분리 하였다. 단백질 용액 층을 새 튜브에 분리하여 수집하였다.

단백질의 정량은 Bradford method를 이용하여 수행하였다. 96-well plate에 농도별로 희석한 소혈청 알부민 (BSA) 표준 시료와 간에서 추출한 단백질 용액 희석액을 10 μ L씩 분주하였다. 여기에 Protein assay dye reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 5배 희석하여 200 μ L씩 분주하고 상온에서 5분간 incubation한 후 SpectraMax 190 Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 분광광도계를 이용하여 595 nm 파장에서의 흡광도를 측정하였다. 표준 시료로부터 도출된 표준 곡선을 바탕으로 시료의 단백질 농도를 계산하였다. 추출된 단백질 용액은 분석 전까지 -80 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

6.2. Western blot analysis

Laemmli sample buffer (Bio-Rad)에 β -mercaptoethanol (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA)을 5% 부피비로 섞은 용액과 $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (ferritin 측정 시) 또는 $5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Smad 측정 시)의 단백질 용액을 1:1로 혼합한 후 100°C heat block에서 5분간 단백질을 변성시켜 시료를 준비하였다. 10% polyacrylamide gel에 준비된 시료를 각 well당 $20 \mu\text{L}$ 씩 분주하고 SDS-PAGE를 수행하여 단백질을 분리하였다. Gel의 단백질을 80V에서 2시간 동안 전류를 이용하여 PVDF membrane으로 이동시킨 후 이를 immunoblot에 사용하였다. Ponceau S 용액으로 PVDF membrane을 염색하여 단백질이 membrane으로 이동되었음을 확인한 후 Tris-buffered saline/0.1% Tween-20 (TBST) 용액으로 세척하였다.

Loading control로 사용된 β -actin을 측정하기 위해서는 PVDF membrane을 5% skim milk/TBST 용액으로 상온에서 1시간 동안 blocking한 후, 같은 용액에 1차 항체인 anti- β -actin antibody (Sigma)를 1:10000으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. TBST 용액으로 5분씩 3회 세척하고 2차 항체인 anti-mouse IgG HRP-linked antibody (Sigma)를 1:20000으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 TBST 용액으로 5분씩 3회 세척하고 ECL 용액 (ImmunoCruz Western blotting Luminol reagent, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)의 A 용액과 B 용액을 1:1로 섞은 후 membrane을 적셔서 발광시켰다. 이를 암실에서 X-ray film에 노출시켜 밴드를 확인하였다.

Ferritin을 측정하기 위해서는 3% BSA/TBST 용액이 blocking 및 1,

2차 항체 희석 용액으로 사용되었다. 1차 항체는 anti-ferritin heavy chain (Y-16) antibody (Santa Cruz Biotechnology)를 1:500으로 희석하여 4 °C에서 12시간 동안 반응시켰고, 2차 항체는 rabbit anti-goat IgG HRP antibody (Abcam, Cambridge, UK)를 1:8500으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다.

p-Smad1/5를 측정하기 위해서는 membrane을 5% skim milk/TBST 용액으로 blocking하였고, 1차 항체인 anti-phospho-Smad1(Ser463/465)/Smad5 (Ser463/465) antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)를 1:1000으로 희석하여 4 °C에서 12시간 동안 반응시켰다. 2차 항체는 anti-rabbit IgG HRP-linked antibody (Cell Signaling Technology)를 5% skim milk/TBST 용액에 1:3000으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시킨 다음 X-ray film에 현상하여 밴드를 확인하였다. 0.2 M glycine, 0.1% SDS, 1% Tween-20의 조성으로 제조한 stripping 용액의 강한 산성 (pH 2.2)을 이용하여 PVDF membrane에 붙인 antibody를 떼어내었다. PVDF membrane을 다량의 stripping 용액에 담가 58 °C 오븐에서 10분씩 세 번, PBS에 담가 상온에서 10분씩 두 번 흔들어 주었다. TBST 용액으로 2회 세척해주었다.

Smad1을 측정하기 위해서는 3% BSA/TBST 용액이 blocking 및 1, 2차 항체 희석 용액으로 사용되었다. 앞서 stripping한 PVDF membrane을 blocking한 후 1차 항체인 anti-Smad1 antibody (Cell Signaling Technology)를 1:1000으로 희석하여 4 °C에서 6시간 동안 반응시켰다. 2차 항체는 p-Smad1/5와 같은 항체 및 조건을 사용하였다.

단백질의 양은 필름에 나타난 밴드 크기를 β -actin의 밴드 크기로 보정하여 나타내었다. 분석에는 Bio-Rad Laboratories의 QuantityOne 프로그램을 사용하였다.

7. 통계분석

모든 통계분석에는 SAS 9.3 statistical software (SAS Institute Inc.) 프로그램을 이용하였다. 세 그룹 간의 비교는 일원분산분석 (one-way ANOVA)으로 수행되었고, ANOVA 결과가 유의적일 경우 사후검정은 Fisher's Least Significant Difference (LSD) test로 수행하였다. 두 지표 간의 상관관계를 결정하기 위해서는 Pearson correlation 분석을 사용하였다. 모든 결과는 평균 \pm 표준오차 (mean \pm SEM)로 나타내었으며 통계 검증은 $P < 0.05$ 수준에서 이루어졌다.

IV. 실험 결과

1. 체중과 체지방량 변화 및 식이 섭취량

각 군의 0주, 15주, 31주의 체중 및 체중 증가량, 체지방량과 체지방량을 측정된 결과를 통계 분석결과와 함께 **Table 5**에 나타내었다. **Figure 5**는 체지방량과 체지방량의 비율을 계산하여 나타낸 결과이다. 실험 시작 시의 체중은 군 간에 차이가 없었으나, 15주차에는 HL과 HH군이 LL군에 비해 유의적으로 체중 증가량 및 체지방량이 높았다. HL군과 HH군은 15주차까지는 동일한 식이를 섭취시켰기 때문에 차이가 발생하지 않았다. 이후 HL군의 식이를 고지방 식이에서 대조 식이로 전환시킨 다음 31주에 다시 체중 지표를 측정하였다. 그 결과 LL군의 체중이 가장 낮았고 HH군이 가장 높았으며, HL군은 LL군과 HH군의 중간 정도의 체중을 나타내었다. LL군과 HH군은 실험 기간 동안 지속적으로 체중이 증가하였다. 반면 HL군의 체중은 대조 식이를 섭취한 15주와 31주 사이에 거의 변동이 일어나지 않았으며, 체지방량은 15주차에 비해 3.2 ± 0.65 g 감소하였다. 체중과 체지방량 모두 HH군보다는 LL군에 근접한 양상을 보였다.

Table 5. Body weight, fat mass, lean mass, and liver weight of LL, HL, and HH groups

	LL	HL	HH
Body weight at 0 week (g)	15.4 ± 0.3	15.9 ± 0.3	15.8 ± 0.2
Body weight at 15 th week (g)	26.8 ± 1.1 ^b	40.9 ± 1.8 ^a	39.4 ± 2.0 ^a
Body weight at 31 st week (g)	35.8 ± 1.9 ^c	40.6 ± 1.4 ^b	63.1 ± 1.5 ^a
Fat mass at 14 th week (g)	6.1 ± 1.1 ^b	19.0 ± 1.1 ^a	17.1 ± 1.4 ^a
Fat mass at 30 th week (g)	11.4 ± 2.0 ^c	15.8 ± 1.0 ^b	37.5 ± 1.1 ^a
Lean mass at 14 th week (g)	17.4 ± 1.8	18.4 ± 1.2	18.4 ± 1.5
Lean mass at 30 th week (g)	20.4 ± 0.6	20.7 ± 0.6	22.0 ± 0.4
Liver weight at 31 st week (g)	1.7 ± 0.1 ^b	2.3 ± 0.1 ^a	1.7 ± 0.1 ^b

Values are presented as means ± SEM. One-way ANOVA was used to determine statistical differences followed by post hoc Fisher's LSD test. Means in a row without common letters significantly differ ($P < 0.05$).

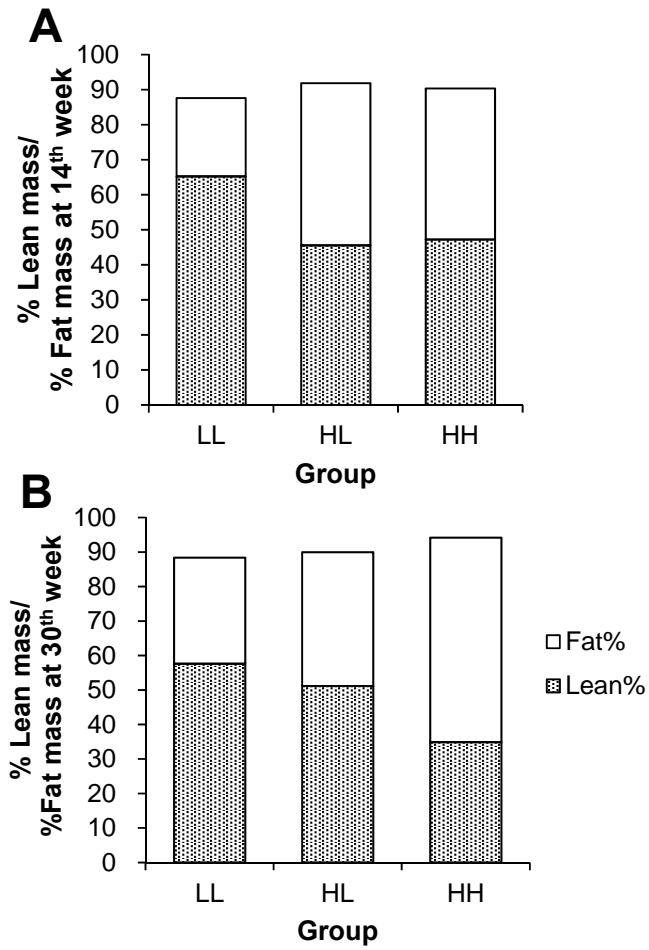


Figure 5. Percentage of fat and lean body mass of LL, HL, and HH groups at 14th week (A) and 30th week (B)

2. 간의 철 저장량

체내 철 영양상태를 파악하기 위해 31주 후 희생한 쥐의 간 조직 내 철 농도를 측정한 결과, HL군의 철 농도는 LL군과 비슷하였으며 HH군의 철 농도는 LL군에 비해 유의하게 낮았다 ($P<0.05$). 간 조직 양 대비 철 농도를 비교한 결과 HH군이 LL군의 75% 수준으로 낮았다 (**Figure 6A**). HL군은 LL군과 유의한 차이가 없었다. 간의 철 농도를 간의 단백질량으로 보정한 결과 이 차이는 더욱 크게 나타나 HH군의 철 농도가 LL군 및 HL군의 철 농도 대비 40% 가량 낮게 나타났다 (**Figure 6B**).

간의 철 함량의 차이가 철 저장에 관여하는 단백질인 ferritin 수준에도 반영되는지를 확인하기 위하여, ferritin의 단백질 수준을 간에서 측정한 결과를 **Figure 7**에 나타내었다. Ferritin 수준 역시 HL군은 LL군과 유의한 차이가 없었다. HH군은 LL 및 HL군에 비해 ferritin 수준이 유의하게 낮았다 ($P<0.05$). 체지방량과 간의 철 농도 및 ferritin 수준과 상관관계를 분석한 결과, 체지방량은 간의 철 농도 ($r=-0.627$, $P<0.01$) (**Figure 8A**) 및 간의 ferritin 수준 ($r=-0.687$, $P<0.001$) (**Figure 8B**)과 유의미한 음의 상관관계를 나타내었다.

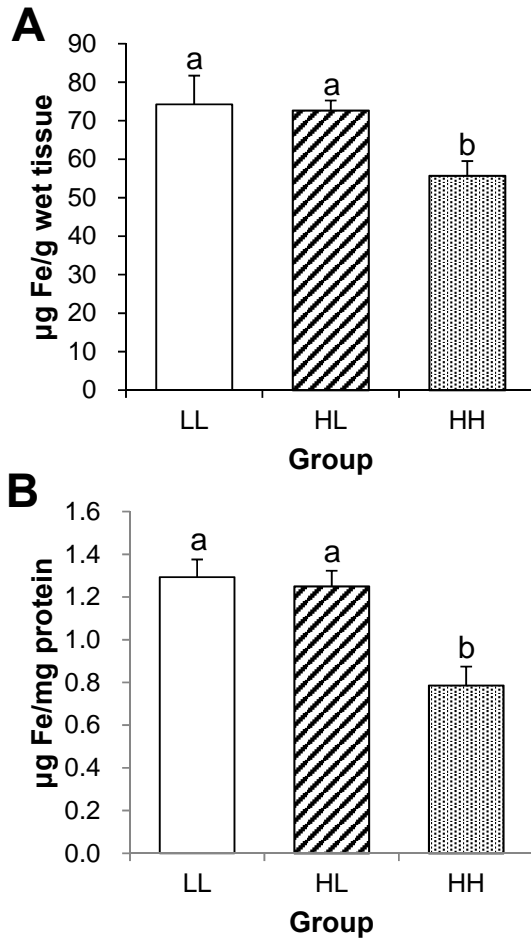


Figure 6. Hepatic iron content expressed as microgram of iron per gram wet tissue (A) and microgram of iron per milligram of protein (B) in LL, HL, and HH groups

Values are presented as means \pm SEM, n=6 to 8 per group. One-way ANOVA was used to determine statistical difference followed by post hoc Fisher's LSD test. Means without common letters significantly differ ($P < 0.05$).

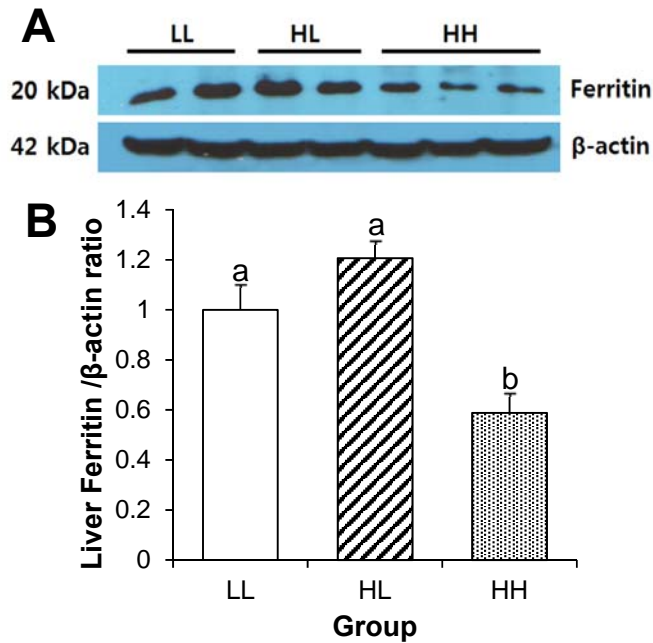


Figure 7. Hepatic ferritin protein levels in LL, HL, and HH groups

A representative experiment is shown (A). The intensity of ferritin 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 statistical differences followed by post hoc Fisher's LSD test. Means without common letters significantly differ ($P < 0.05$)

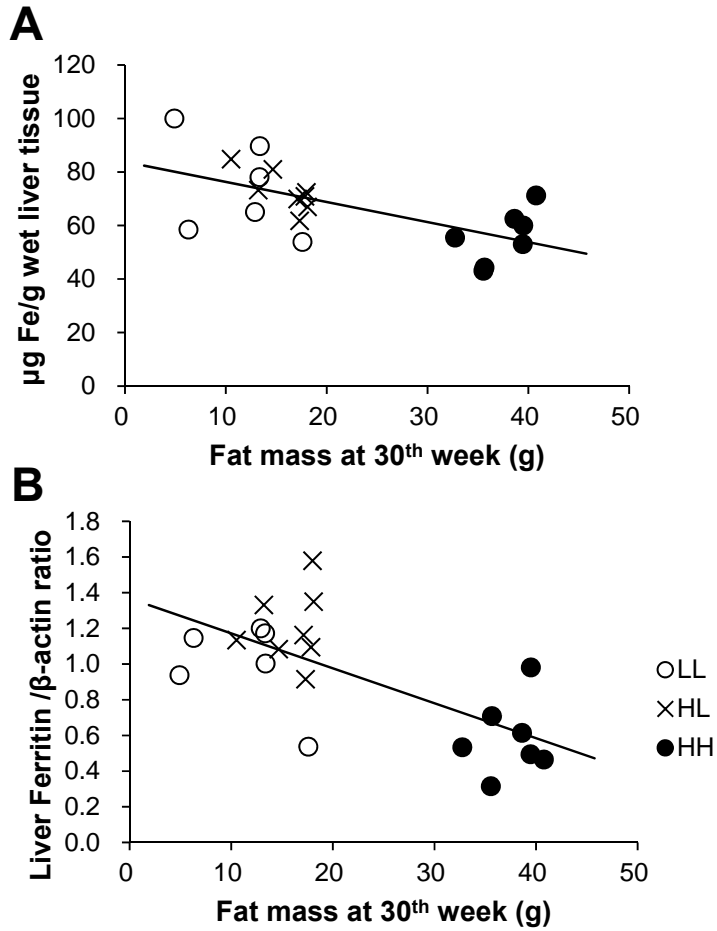


Figure 8. Correlation between liver iron status indicators and body fat mass

(A) Correlation between total hepatic iron content and fat mass at 30th week (g), $r=-0.627$, $P<0.01$. (B) Correlation between liver ferritin protein level and fat mass at 30th week (g), $r=-0.687$, $P<0.001$.

3. 소장 조직에서 *Dcytb* 및 *Heph* mRNA 수준

비만 및 식이변화로 유도된 체지방량 감소가 소장에서의 철 흡수 정도에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여, 소장세포의 기저측면 막 (basolateral membrane)에서 철 흡수를 돕는 *Dcytb*와 꼭지면 막 (apical membrane)에서 철 방출을 돕는 hephaestin을 비교하였다.

*Dcytb*와 *Heph*의 mRNA 발현 정도를 측정한 결과를 **Figure 9A**와 **9B**에 각각 나타내었다. 소장의 *Dcytb* mRNA 수준은 LL군과 HH군 사이에는 차이가 없었으나, HL군에서는 HH군에 비해 유의적으로 높은 발현량을 나타내었다 ($P=0.05$). 소장의 *Heph* mRNA 수준은 세 군 간의 유의한 차이가 나타나지 않았다 ($P=0.553$).

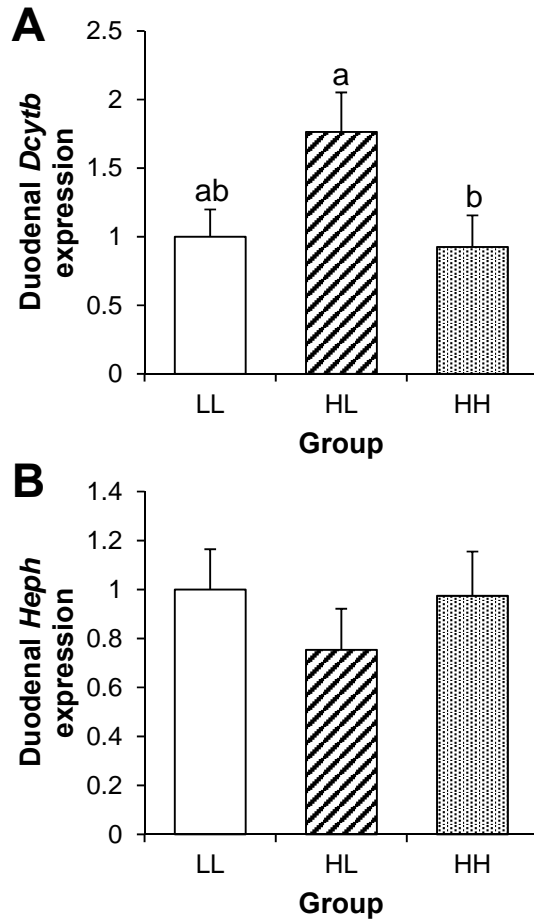


Figure 9. mRNA levels of duodenal iron transporters

(A) Duodenal *Dcytb* expression, $P=0.05$. (B) Duodenal *Heph* expression, $P=0.553$. Values are presented as means \pm SEM, $n=6$ to 8 per group. One-way ANOVA was used to determine statistical differences followed by post hoc Fisher's LSD test. Means without common letters significantly differ.

4. 간 조직에서 *Hamp* mRNA 수준

Hepcidin은 철의 항상성에 관여하는 호르몬으로서, hepcidin의 발현 변화가 비만에 따른 철 영양 상태 변화를 유발하는 요인이 될 수 있다. 따라서 hepcidin을 주로 생성하는 것으로 알려진 간에서의 hepcidin 생성 정도를 비교하고자 하였다.

간조직에서 *Hamp*의 mRNA 발현량을 측정한 결과를 **Figure 10A**에 나타내었다. 간의 *Hamp* mRNA 수준은 군 간에 통계적으로 유의미한 차이는 없었다 ($P=0.117$). 하지만 평균치를 비교해 본다면 HH군의 *Hamp* mRNA 수준은 LL군 및 HL군에 비하여 30% 가량 낮은 정도를 나타내었으며, 간의 *Hamp* 발현량과 간 철 저장량 간의 상관관계를 분석한 결과 유의적인 양의 상관관계가 관찰되었다 ($r=0.675$, $P<0.001$) (**Figure 10B**).

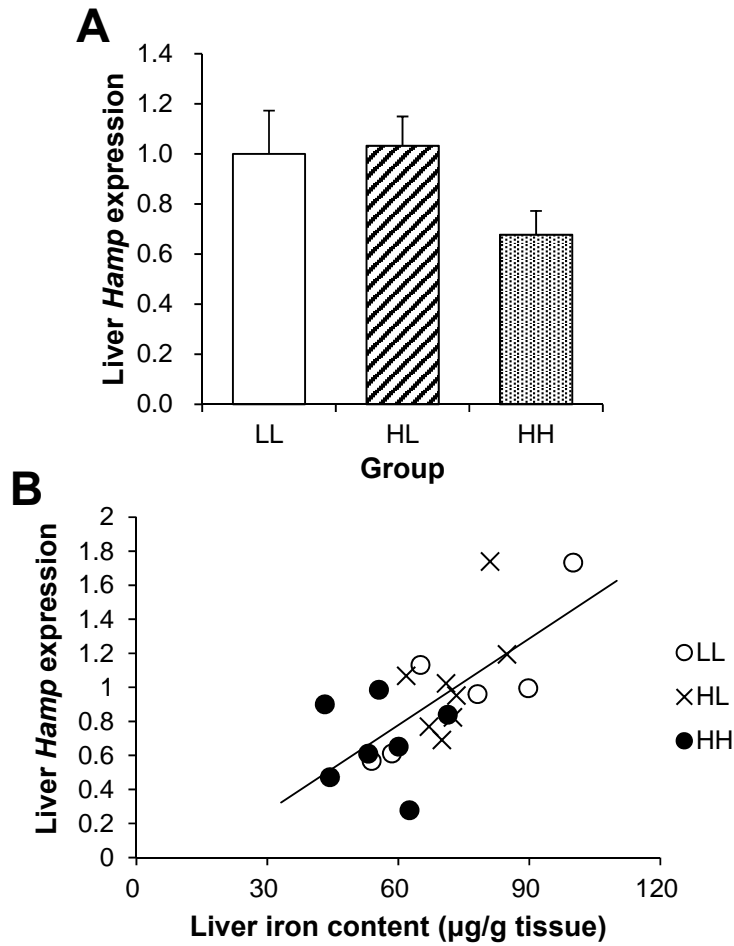


Figure 10. *Hamp* mRNA levels in the liver tissues (A), and correlation between *Hamp* mRNA expression and liver iron content (B) in LL, HL, and HH groups

(A) Values are presented as means \pm SEM, n=6 to 8 per group. One-way ANOVA was used to determine statistical differences. (B) Pearson correlation was $r=-0.675$, $P<0.001$.

5. 간 및 소장 조직에서 *Bmp6* mRNA 수준

Hepcidin의 발현을 조절하는 BMP6의 간 및 소장 조직에서 mRNA 발현 정도를 측정된 결과는 **Figure 11**에 제시하였다. 간에서의 *Bmp6* mRNA 발현 정도에는 유의적인 차이가 없었다 ($P=0.436$). 반면 소장의 *Bmp6* mRNA 발현 수준은 LL군 및 HL군에 비해 HH군에서 유의적으로 낮았다 ($P<0.05$).

소장의 *Bmp6* mRNA 발현 수준과 간의 철 저장량 간의 상관관계를 분석해 본 결과 유의적인 양의 상관관계가 관찰되었다 ($r=0.576$, $P<0.05$) (**Figure 12A**). 또한 소장의 *Bmp6* mRNA 발현량은 간의 *Hamp* mRNA 발현 정도와도 유의적인 양의 상관관계가 있었다 ($r=0.517$, $P<0.05$) (**Figure 12B**).

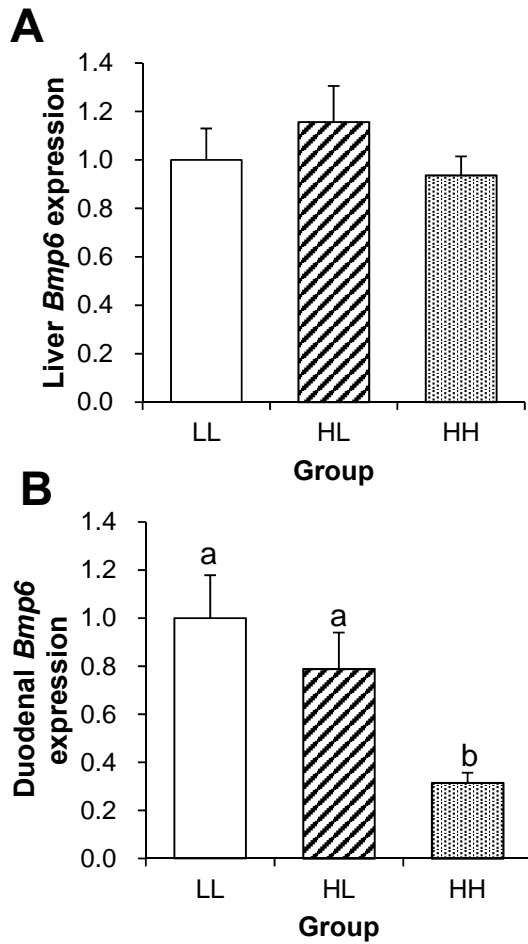


Figure 11. *Bmp6* mRNA levels in the liver (A) and the duodenum (B) of LL, HL, and HH groups

Values are presented as means \pm SEM, n=6 to 8 per group. One-way ANOVA was used to determine statistical differences followed by post hoc Fisher's LSD tests. Means without common letters significantly differ ($P < 0.05$).

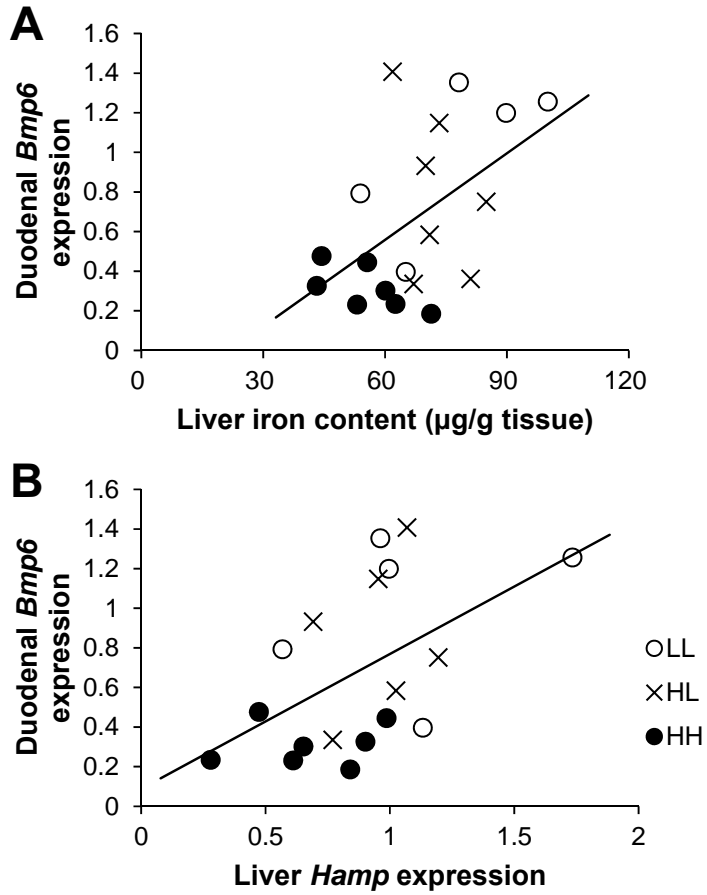


Figure 12. Correlation analysis of duodenal *Bmp6* with liver iron content ($\mu\text{g/g}$ tissue) (A) and liver *Hamp* mRNA expression (B)

Pearson correlation was (A) $r=0.576$, $P<0.05$, (B) $r=0.517$, $P<0.05$.

6. 간 조직에서 Smad 단백질의 인산화 정도

BMP6가 hepcidin 발현에 영향을 미치는 과정에서 Smad 단백질을 통한 신호 전달 경로의 활성화 또는 억제 정도를 파악하기 위해, 인산화된 형태의 Smad1/5 (p-Smad1/5)와 인산화되지 않은 형태의 Smad1의 간에서의 단백질 수준을 측정하였다. 간조직 내 Smad1 대비 p-Smad1/5의 비율을 비교한 결과 군 간 유의적인 차이가 있었다 ($P<0.05$). HL군은 LL군과 유의한 차이가 없었고, HH군은 LL 및 HL군에 비해 Smad 단백질의 인산화 정도가 유의하게 낮았다 (**Figure 13**).

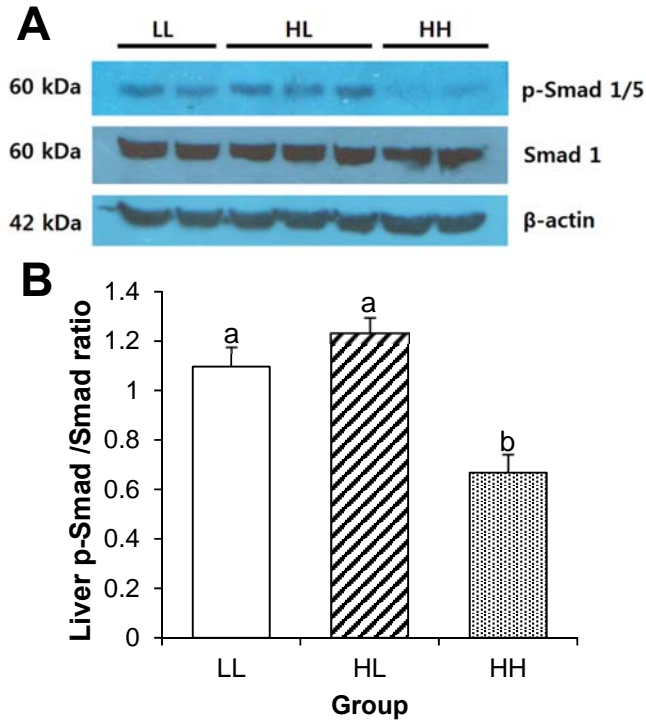


Figure 13. Hepatic p-Smad/Smad ratio in LL, HL, and HH groups

Blots were stripped and reprobbed in the order of p-Smad, Smad, and β-actin. A representative experiment is shown (A). The intensity of the bands was densitometrically measured to calculate the ratio of phosphorylated-Smad1/5 relative to unphosphorylated-Smad1 (B). Values are presented as means ± SEM, n=6 to 8 per group. One-way ANOVA was used to determine statistical differences followed by post hoc Fisher's LSD test. Means without common letters significantly differ ($P<0.05$).

V. 고 찰

본 연구에서는 고지방 식이로 유도된 비만이 저하된 철 영양 상태와 관련성이 있으며, 저지방 식이로의 식이 변경을 통해 체지방량을 감소시킴으로써 저하된 철 영양 상태를 회복시킬 수 있음을 보였다. LL군 및 HH군은 동일한 식이를 지속적으로 공급한 결과 사육 기간 동안 꾸준한 체중 증가를 보였다. HL군은 고지방 식이에서 대조 식이로 전환한 이후부터는 체중에 변화가 일어나지 않았으며, 체지방량은 오히려 유의적으로 감소하였다. 사육 기간이 끝난 후 HL군의 체지방률은 LL군과 HH군의 중간 정도가 되었으며, HH군 보다는 LL군에 더 가까운 양상을 보였다. HL군의 간 철 저장량은 LL군과 비슷한 값을 나타내었고, HH군은 이들에 비하여 30% 가량 낮은 철 저장량을 보였다.

이러한 비만에서의 간의 철 저장량 변화에 영향을 미칠 수 있는 기전을 알아보기 위하여 소장에서의 철 흡수에 관여하는 지표들의 mRNA 발현 수준을 비교하여 보았다. 소장에서의 철 흡수율은 철 운반체의 발현 정도에 따라 달라지는데, 이러한 철 운반체의 발현은 체내 철 상태에 의해 조절 받는다는 것이 잘 알려져 있다 (Frazer et al. 2002). Sonnweber et al. (2012)은 고지방 식이를 섭취한 마우스의 소장에서 *Dcytb*와 *Heph* mRNA 발현 정도가 유의적으로 낮아졌음을 보고하였다. 태국 여성을 대상으로 한 연구에서, 동위원소로 표지한 철이 포함된 기준 식이를 섭취한 후 소장에서 철이 흡수되는 정도를 비교한 결과 비만일 경우 소장의 철 흡수 정도가 더 낮게 나타났다 (Zimmermann et al.

2008). 본 연구의 결과, 소장외의 기저측면 막에서 철의 흡수에 관여하는 *Heph*의 mRNA 수준은 군 간 차이가 없었다. 꼭지면 막에서 작용하는 *Dcytb*의 mRNA 수준은 HL군에서 HH군에 비해 유의적으로 높았다. 하지만 선행 연구들의 결과와는 달리 LL군과 HH군 사이에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 소장외의 *Dcytb* mRNA 수준이 높은 것은 소장외에서의 철 흡수가 증가했을 수 있음을 의미하므로, 본 연구에서 HL군의 간 철 저장량이 HH군에 비해 높았던 것은 *Dcytb* mRNA 발현 정도의 차이로 일부 설명될 수 있다. 하지만 LL군과 HH군 사이에는 *Dcytb* mRNA 발현 정도에 차이가 없었기 때문에, 비만에서의 철 저장량 저하에는 *Dcytb* 이외의 다른 요인이 관여하였을 것으로 생각된다.

간의 *Hamp* mRNA 발현 정도는 통계적으로 군 간 유의한 차이가 없었다. 하지만 평균값을 비교하였을 때 HH군의 *Hamp* mRNA 수준은 LL군 및 HL군에 비하여 약 30% 낮았으며, 간의 *Hamp* mRNA 수준과 간의 철 상태를 반영하는 지표들 (간의 철저장량 및 ferritin 단백질 수준) 사이에는 양의 상관관계가 관찰되었다. Heparin은 철 방출 수송체인 ferroportin에 붙어서 ferroportin의 내재화와 유비퀴틴화, 리소좀을 통한 분해를 유도함으로써 철이 세포 외로 방출되는 것을 막는다. Ferroportin은 소장세포, 대식세포, 간세포 등의 표면에서 발현되며, 따라서 hepcidin의 증가는 소장외의 철 흡수율을 낮추고 간에서의 철 방출을 억제하는 결과를 낳는다 (Nemeth et al. 2004). 본 연구에서 관찰된 간의 *Hamp* mRNA 발현량과 간의 철저장량 간 양의 상관관계는

hepcidin이 간의 철 저장량을 조절하는 데 영향을 미쳤을 수 있음을 시사하며, 따라서 군 간 철 저장량의 차이에 hepcidin이 기여하였을 수 있다.

비만 관련 간의 철 저장량 변화에 관여하는 조절 기전에 대해 좀 더 알아보기 위하여 BMP6-Smad 신호 전달 경로의 변화를 살펴보았다. BMP6는 transforming growth factor (TGF)- β superfamily에 속하는 단백질로서, BMP6가 간세포 막에 존재하는 BMP 수용체 (BMPRI, BMPRII)에 결합하여 복합체를 형성하면 세포 내의 신호 전달 물질인 Smad 단백질 (Smad 1, Smad5, Smad9)의 인산화를 통해 신호 전달 경로가 활성화된다 (Andriopoulos et al. 2009; Meynard et al. 2009). Smad1/5/9의 인산화는 Smad4와의 결합을 가능하게 하고, 결합된 이형이량체 (heterodimer)는 핵 속으로 이동하여 *Hamp*의 발현에 영향을 미치는 전사 인자로 작용하게 된다 (Wrana 2013; Camaschella 2009). 본 연구에서는 간의 *Bmp6* mRNA 수준에는 군 간 차이가 나타나지 않았으나, Smad1/5 단백질의 인산화 정도에는 유의한 차이가 관찰되었다. Smad1 대비 p-Smad1/5의 비율을 비교한 결과, LL군 및 HL군에 비해 HH군에서 인산화 정도가 유의하게 낮았다. 이러한 결과는 비만이 간의 *Bmp6* mRNA 발현 정도에는 영향을 미치지 못하였으나 hepcidin 발현을 조절하는 데 관여하는 신호 전달 경로에는 영향을 미칠 수 있었음을 의미한다.

간의 *Hamp* mRNA 수준을 조절하는 BMP6가 주로 어디에서 생성되는지에 대해서는 여전히 논란이 있다. 현재로서는 체내 철 상태에 반응하여 BMP6를 생성하는 주된 장소로 간의 비실질 세포

(nonparenchymal cells)가 제안되고 있다. 마우스에게 3주 간 철 보충 식이를 섭취시킬 경우 간의 비실질 세포인 쿠퍼 세포 (kupffer cell)와 혈관내피세포 (sinusoidal endothelial cell)의 *Bmp6* mRNA 수준은 유의적으로 증가하였으나, 간세포에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았다 (Enns et al. 2013). 하지만 Arndt et al. (2010)의 체외 실험 (*ex vivo*)에서는 마우스에서 분리한 세포에 FeSO₄ 또는 holotransferrin을 처리하였을 때, 간세포뿐만 아니라 간 성상세포 (hepatic stellate cell)와 쿠퍼 세포에서도 *Bmp6*와 *Hamp* mRNA 발현 수준에 차이가 관찰되지 않았다. 또한 분리된 간 조직 자체에 FeSO₄ 또는 holotransferrin을 처리하였을 경우에도 *Bmp6*와 *Hamp* mRNA 수준에 유의적인 차이를 유발하지 않았으며, 대신 분리된 소장 조직에서 *Bmp6* mRNA 발현량의 차이가 유발되었다. *Bmp6*^{-/-} 마우스에서 분리한 간 조직과 *Bmp6*^{+/+} 마우스에서 분리한 소장 조직을 공동배양 하였을 때 FeSO₄ 처리에 반응하여 간 조직에서의 *Hamp* mRNA 발현이 유도되었으며, 반대로 *Bmp6*^{+/+} 마우스에서 분리한 간 조직과 *Bmp6*^{-/-} 마우스에서 분리한 소장 조직을 공동배양 하였을 때는 FeSO₄로 처리했을 때 간 조직에서의 *Hamp* mRNA 발현이 유도되지 않는 것이 관찰되었다. 또한 마우스에게 3주 간 철 보충 식이를 섭취시킨 결과 간 뿐만 아니라 소장에서도 *Bmp6* mRNA의 발현량이 증가하였다고 보고하였다. 이러한 관찰 결과에 기반해서, 소장에서 철에 반응하여 BMP6가 생산되며 이것이 문맥을 통해 이동하여 간에서 BMP6-Smad 신호 전달 경로를 활성화시킬 수 있다는 가설이 제안되었다. 하지만 Kautz et al. (2011)은 마우스에게 철 보충 식이를 섭취시키고 변화를 관찰한 비슷한 실험에서 간에서는 *Bmp6*

mRNA 수준의 차이를 관찰하였지만 소장에서는 차이를 관찰하지 못하였다고 보고함으로써 이 가설에 반박하였다.

본 연구에서는 간에서 *Bmp6* mRNA 수준에 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 반면 소장에서는 *Bmp6* mRNA 수준이 LL군 및 HL군에 비하여 HH군에서 유의적으로 낮은 것으로 나타났다. 간에서 *Bmp6* mRNA 발현 정도에는 차이가 없으면서 *Smad1/5* 단백질의 인산화 정도에는 차이가 있었기 때문에, 이러한 결과를 통해 Arndt et al. (2010)이 제안한 것과 같이 소장과 간 사이의 연계 가능성을 제시해볼 수 있다. 비만이 아닌 마우스에게서 과도한 철 섭취가 소장에서 BMP6의 생산을 유발할 수 있는지에 대해서는 선행 결과들이 서로 일치하지 않고 있으나, 본 연구 결과는 고지방 식이로 유도된 비만이 소장의 *Bmp6* mRNA 발현 정도에 부정적인 영향을 미칠 수 있음을 제시하였다. 선행 연구에서는 체외 실험을 통해, 소장 조직에서 생성되는 BMP6가 간 조직에서의 *Hamp* mRNA 발현을 유도할 수 있는 잠재적 능력이 있음이 보여진 바 있다. 따라서 소장에서의 *Bmp6* mRNA 발현 정도의 차이가 간의 BMP6-Smad 신호 전달 경로의 활성화에 영향을 미쳤을 가능성이 있다. 이를 증명하기 위해서는 소장에서 생성된 BMP6가 문맥을 통해 이동될 수 있는지를 확인하는 추후 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로, 본 연구에서는 고지방 식이로 유도된 비만이 간 철 저장량의 저하를 유발한다는 것을 확인하였다. 또한 고지방 식이로 유도된 비만 마우스에게 저지방 식이를 섭취시킴으로써 체지방량의 감소를 유도할 경우, 비만으로 인해 유발된 간의 철 저장량 저하가 다시

회복될 수 있음을 보였다. 이러한 결과는 철 영양 상태에 있어서 비만으로 인해 유발되는 부정적인 영향과 식이 변경을 통한 철 영양 상태의 회복에 대한 새로운 정보를 제공하였으며, 이는 앞으로 임상 실무의 수행에 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.

VI. 요약 및 결론

본 연구에서는 고지방 식이로 비만을 유도시킨 후 다시 저지방 식이로 바꾸어 체지방량의 감소를 유도할 경우, 비만으로 인해 발생하는 철 결핍이 해소될 수 있을지에 대하여 살펴보았다. 또한 간의 철 저장량을 조절하는 지표들을 비교 분석하여 비만이 철 영양 상태에 영향을 미치는 기전을 파악하고자 하였다. 섭취한 식이 유형에 따라 LL군 (저지방→저지방 식이), HL군 (고지방→저지방 식이), HH군 (고지방→고지방 식이)의 세 군으로 그룹을 나누어 비교하였다.

- 1) HL군의 체지방량은 고지방 식이를 섭취하는 동안에는 HH군과 차이가 없다가, 저지방 식이를 섭취하는 동안 감소하였다. 반면 HH군의 체지방량은 꾸준히 증가하였다. 30주차에 HL군은 LL군과 HH군의 중간 정도의 체지방량을 가졌으며 HH군보다는 LL군에 근접한 양상을 보였다.
- 2) 간의 철 농도는 HH군이 LL군의 75% 수준으로 유의하게 낮았고, HL군은 LL군과 비슷한 철 수준을 가졌다. Ferritin 단백질 수준 역시 LL군에 비해 HH군에서 유의하게 낮았으며, HL군은 LL군과 유의적 차이가 없었다. 간의 철 농도 및 ferritin 수준은 체지방량과 음의 상관관계를 보였다.
- 3) 소장에서 *Dcytb*의 mRNA 수준은 LL군과 HH군 사이에는 차이가 없었으나, HL군에서는 HH군에 비해 유의적으로 높았다. 소장 *Heph*

mRNA 수준은 군 간 차이가 관찰되지 않았다.

- 4) 간의 *Hamp* mRNA수준은 군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 하지만 평균적으로는 LL군과 HL군에서 유사하고 HH군에서 30% 가량 낮았으며, *Hamp* mRNA 수준과 간의 철 저장량 사이에는 양의 상관관계가 관찰되었다.
- 5) *Bmp6*의 mRNA 수준은 간에서는 군 간 차이가 없었으나, 소장에서는 LL군 및 HL군에 비해 HH군에서 유의하게 낮았다. 소장의 *Bmp6* 발현량은 간의 철 저장량 및 간의 *Hamp* mRNA 수준과 유의한 양의 상관관계가 있었다. 간에서 p-Smad/Smad 비율을 비교한 결과 HH군이 LL군 및 HL군에 비해 인산화 정도가 유의하게 낮았다.

이상의 결과를 통해 비만은 간의 철 저장량의 저하를 유발하며, 식이 변경을 통해 체지방량을 감소시킬 경우 간의 철 저장량이 회복됨을 보였다. HH군에 비해 높은 HL군의 철저장량은 소장의 *Dcytb* 발현 정도의 차이로 일부 설명될 수 있으나, LL군에서는 HH군과 차이가 없었으므로 비만에서 철 저장량 감소 기전은 설명되지 않았다. *Hamp* 발현량과 철 저장량 간의 상관관계를 통해 hepcidin이 철 저장량 조절에 관여하였음을 확인할 수 있었다. 간의 *Bmp6* 발현량은 군간 차이가 없었으나 BMP6 하류 (downstream)의 신호 단백질인 Smad의 인산화 정도에는 차이가 있었다. 소장의 *Bmp6* mRNA 수준은 HH군에서 유의하게 낮았고 간의 철 저장량 및 *Hamp* mRNA 수준과 상관관계가 있었으며, 이를 통해 소장과의 연계 가능성을 제시해볼 수 있다.

참 고 문 헌

- Amato, A., N. Santoro, P. Calabro, A. Grandone, D. W. Swinkels, L. Perrone, and E. M. del Giudice. 2010. Effect of body mass index reduction on serum hepcidin levels and iron status in obese children. *Int J Obes (Lond)* 34 (12):1772-1774.
- Andriopoulos, B., Jr., E. Corradini, Y. Xia, S. A. Faasse, S. Chen, L. Grgurevic, M. D. Knutson, A. Pietrangelo, S. Vukicevic, H. Y. Lin, and J. L. Babitt. 2009. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet* 41 (4):482-487.
- Anty, R., M. Dahman, A. Iannelli, P. Gual, A. Staccini-Myx, I. B. Amor, N. Luciani, M. C. Saint-Paul, P. M. Huet, J. L. Sadoul, S. K. Srai, R. Unwin, J. Gugenheim, Y. Le Marchand-Brustel, A. Tran, and S. Bekri. 2008. Bariatric surgery can correct iron depletion in morbidly obese women: a link with chronic inflammation. *Obes Surg* 18 (6):709-714.
- Arndt, S., U. Maegdefrau, C. Dorn, K. Schardt, C. Hellerbrand, and A. K. Bosserhoff. 2010. Iron-induced expression of bone morphogenic protein 6 in intestinal cells is the main regulator of hepatic hepcidin expression in vivo. *Gastroenterology* 138 (1):372-382.
- Ausk, K. J., and G. N. Ioannou. 2008. Is obesity associated with anemia of chronic disease? A population-based study. *Obesity (Silver Spring)* 16 (10):2356-2361.
- Bekri, S., P. Gual, R. Anty, N. Luciani, M. Dahman, B. Ramesh, A. Iannelli, A. Staccini-Myx, D. Casanova, I. Ben Amor, M. C. Saint-Paul, P. M. Huet, J. L. Sadoul, J. Gugenheim, S. K. Srai, A. Tran, and Y. Le Marchand-Brustel.

2006. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology* 131 (3):788-796.
- Bertinato, J., C. Aroche, L. J. Plouffe, M. Lee, Z. Murtaza, L. Kenney, C. Lavergne, and A. Aziz. 2014. Diet-induced obese rats have higher iron requirements and are more vulnerable to iron deficiency. *Eur J Nutr* 53 (3):885-895.
- Cairo, G., F. Bernuzzi, and S. Recalcati. 2006. A precious metal: iron, an essential nutrient for all cells. *Genes & Nutrition* 1 (1):25-40.
- Camaschella, C. 2009. Genetics of cardiac repolarization. *Nat Genet* 41 (4):386-388.
- Cepeda-Lopez, A. C., S. J. Osendarp, A. Melse-Boonstra, I. Aeberli, F. Gonzalez-Salazar, E. Feskens, S. Villalpando, and M. B. Zimmermann. 2011. Sharply higher rates of iron deficiency in obese Mexican women and children are predicted by obesity-related inflammation rather than by differences in dietary iron intake. *Am J Clin Nutr* 93 (5):975-983.
- Chung, J., M. S. Kim, and S. N. Han. 2011. Diet-induced obesity leads to decreased hepatic iron storage in mice. *Nutr Res* 31 (12):915-921.
- Corradini, E., D. Meynard, Q. Wu, S. Chen, P. Ventura, A. Pietrangelo, and J. L. Babitt. 2011. Serum and liver iron differently regulate the bone morphogenetic protein 6 (BMP6)-SMAD signaling pathway in mice. *Hepatology* 54 (1):273-284.
- Di Toro, A., A. Marotta, N. Todisco, E. Ponticiello, R. Collini, R. Di Lascio, and L. Perrone. 1997. Unchanged iron and copper and increased zinc in the blood of obese children after two hypocaloric diets. *Biol Trace Elem Res* 57:97-104.
- Enns, C. A., R. Ahmed, J. Wang, A. Ueno, C. Worthen, H. Tsukamoto, and A. S. Zhang. 2013. Increased iron loading induces Bmp6 expression in the non-

- parenchymal cells of the liver independent of the BMP-signaling pathway. *PLoS One* 8 (4):e60534.
- Frazer, D. M., S. J. Wilkins, E. M. Becker, C. D. Vulpe, A. T. McKie, D. Trinder, and G. J. Anderson. 2002. Hcpidin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats. *Gastroenterology* 123 (3):835-844.
- Gasteyger, C., M. Suter, J. M. Calmes, R. C. Gaillard, and V. Glusti. 2006. Changes in body composition, metabolic profile and nutritional status 24 months after gastric banding. *Obes Surg* 16:243-250.
- Gunshin, H., Y. Fujiwara, A. O. Custodio, C. Drenzo, S. Robine, and N. C. Andrews. 2005. Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver. *J Clin Invest* 115 (5):1258-1266.
- Hentze, M. W., M. U. Muckenthaler, B. Galy, and C. Camaschella. 2010. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 142 (1):24-38.
- Iron deficiency--United States, 1999-2000. 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 51 (40):897-899.
- Kautz, L., C. Besson-Fournier, D. Meynard, C. Latour, M. P. Roth, and H. Coppin. 2011. Iron overload induces BMP6 expression in the liver but not in the duodenum. *Haematologica* 96 (2):199-203.
- Knutson, M. D. 2010. Iron-sensing proteins that regulate hepcidin and enteric iron absorption. *Annu Rev Nutr* 30:149-171.
- Koenig, M. D., L. Tussing-Humphreys, J. Day, B. Cadwell, and E. Nemeth. 2014. Hcpidin and iron homeostasis during pregnancy. *Nutrients* 6 (8):3062-3083.
- Kretsch, M. J., A. K. H. Fong, M. W. Green, and H. L. Johnson. 1998. Cognitive

- function, iron status, and hemoglobin concentration in obese dieting women. *Eur J Clin Nutr* 52:512-518.
- Lecube, A., A. Carrera, E. Losada, C. Hernandez, R. Simo, and J. Mesa. 2006. Iron deficiency in obese postmenopausal women. *Obesity* 14 (10).
- Lin, L., E. V. Valore, E. Nemeth, J. B. Goodnough, V. Gabayan, and T. Ganz. 2007. Iron transferrin regulates hepcidin synthesis in primary hepatocyte culture through hemojuvelin and BMP2/4. *Blood* 110 (6):2182-2189.
- Mackenzie, B., and M. D. Garrick. 2005. Iron Imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289 (6):G981-986.
- Menzie, C. M., L. B. Yanoff, B. I. Denking, T. McHugh, N. G. Sebring, K. A. Calis, and J. A. Yanovski. 2008. Obesity-related hypoferrremia is not explained by differences in reported intake of heme and nonheme iron or intake of dietary factors that can affect iron absorption. *J Am Diet Assoc* 108 (1):145-148.
- Meynard, D., L. Kautz, V. Darnaud, F. Canonne-Hergaux, H. Coppin, and M. P. Roth. 2009. Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat Genet* 41 (4):478-481.
- Moayeri, H., K. Bidad, S. Zadhoush, N. Gholami, and S. Anari. 2006. Increasing prevalence of iron deficiency in overweight and obese children and adolescents (Tehran Adolescent Obesity Study). *Eur J Pediatr* 165 (11):813-814.
- Nead, K. G., J. S. Halterman, J. M. Kaczorowski, P. Auinger, and M. Weitzman. 2004. Overweight children and adolescents: A risk group for iron deficiency. *Pediatrics* 114 (1):104-108.
- Nemeth, E., M. S. Tuttle, J. Powelson, M. B. Vaughn, D. A., D. M. Ward, T. Ganz,

- and J. Kaplan. 2004. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306.
- Ohgami, R. S., D. R. Campagna, A. McDonald, and M. D. Fleming. 2006. The Steap proteins are metalloreductases. *Blood* 108 (4):1388-1394.
- Pardali, E., M.-J. Goumans, and P. ten Dijke. 2010. Signaling by members of the TGF- β family in vascular morphogenesis and disease. *Trends in Cell Biology* 20 (9):556-567.
- Pigeon, C., G. Ilyin, B. Courselaud, P. Leroyer, B. Turlin, P. Brissot, and O. Loreal. 2001. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 276 (11):7811-7819.
- Pinhas-Hamiel, O., R. S. Newfield, I. Koren, A. Agmon, P. Lilos, and M. Phillip. 2003. Greater prevalence of iron deficiency in overweight and obese children and adolescents. *int J Obes* 27:416-418.
- Rodríguez-Rodríguez, E., A. M. López-Sobaler, P. Andrés, A. Aparicio, B. Navia, and R. M. Ortega. 2007. Modification of Iron Status in Young Overweight/Mildly Obese Women by Two Dietary Interventions Designed to Achieve Weight Loss. *Annals of Nutrition and Metabolism* 51 (4):367-373.
- Ruz, M., F. Carrasco, P. Rojas, J. Codoceo, J. Inostroza, A. Rebolledo, K. Basfi-fer, A. Csendes, K. Papapietro, F. Pizarro, M. Olivares, L. Sian, J. L. Westcott, K. M. Hambidge, and N. F. Krebs. 2009. Iron absorption and iron status are reduced after Roux-en-Y gastric bypass. *Am J Clin Nutr* 90 (3):527-532.
- Shankar, P., M. Boylan, and K. Sriram. 2010. Micronutrient deficiencies after bariatric surgery. *Nutrition* 26 (11-12):1031-1037.
- Sonnweber, T., C. Röss, M. Nairz, I. Theurl, A. Schroll, A. T. Murphy, V.

- Wroblewski, D. R. Witcher, P. Moser, C. F. Ebenbichler, S. Kaser, and G. Weiss. 2012. High-fat diet causes iron deficiency via hepcidin-independent reduction of duodenal iron absorption. *J Nutr Biochem* 23 (12):1600-1608.
- Stein, J., F. Hartmann, and A. U. Dignass. 2010. Diagnosis and management of iron deficiency anemia in patients with IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7 (11):599-610.
- Test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods (SW-846). Version 1. Washington, D.C. : U.S. Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste ; Springfield, Va. : U.S. Dept. of Commerce, National Technical Information Service, 1996.
- Toh, S. Y., N. Zarshenas, and J. Jorgensen. 2009. Prevalence of nutrient deficiencies in bariatric patients. *Nutrition* 25 (11-12):1150-1156.
- Tussing-Humphreys, L., C. Pusatcioglu, E. Nemeth, and C. Braunschweig. 2012. Rethinking iron regulation and assessment in iron deficiency, anemia of chronic disease, and obesity: introducing hepcidin. *J Acad Nutr Diet* 112 (3):391-400.
- Tussing-Humphreys, L. M., E. Nemeth, G. Fantuzzi, S. Freels, G. Guzman, A. X. Holterman, and C. Braunschweig. 2010. Elevated systemic hepcidin and iron depletion in obese premenopausal females. *Obesity (Silver Spring)* 18 (7):1449-1456.
- Updegraff, T. A., and N. J. Neufeld. 1981. Protein, iron, and folate status of patients prior to and following surgery for morbid obesity. *J Am Diet Assoc* 78 (2):135-140.
- Wrana, J. L. 2013. Signaling by the TGFbeta superfamily. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5 (10):a011197.
- Wyman, S., R. J. Simpson, A. T. McKie, and P. A. Sharp. 2008. Dcytb (Cybrd1)

functions as both a ferric and a cupric reductase in vitro. *FEBS Lett* 582 (13):1901-1906.

Zafon, C., A. Lecube, and R. Simo. 2010. Iron in obesity. An ancient micronutrient for a modern disease. *Obes Rev* 11 (4):322-328.

Zimmermann, M. B., C. Zeder, S. Muthayya, P. Winichagoon, N. Chaouki, I. Aeberli, and R. F. Hurrell. 2008. Adiposity in women and children from transition countries predicts decreased iron absorption, iron deficiency and a reduced response to iron fortification. *Int J Obes (Lond)* 32 (7):1098-1104.

Abstract

The effect of diet-induced change in fat mass on hepatic iron status in obese mice

Hak Chung

Department of Food and Nutrition

The Graduate School

Seoul National University

High fat diet (HFD)-induced obesity was reported to result in low hepatic iron storage. We investigated whether obesity-related changes in hepatic iron status could be reversed by decreasing fat mass through feeding low fat diet. Five-week-old C57BL/6 mice were assigned to three 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 and switched to control diet for 16 weeks. Fat mass and lean body mass were measured by MRI at 14th and 30th weeks. To assess the hepatic iron storage, total iron content was measured by ICP-MS and ferritin protein levels were determined by Western blot analysis. mRNA levels of duodenal cytochrome *b* (*Dcytb*) and hephaestin (*Heph*),

which participate in duodenal iron absorption, were measured by real time PCR. mRNA levels of hepatic hepcidin (*Hamp*) (the key factor which regulates body iron level) and hepatic and duodenal BMP6 (*Bmp6*) (a signaling molecule known to affect hepcidin expression) were also determined. To assess the activation or repression of Smad signaling pathway in relation to BMP6 and hepcidin, the ratio of p-Smad1/5 to unphosphorylated-Smad1 in liver was determined by Western blot analysis. Fat mass of HL group decreased by 3.2 g from 14th to 30th wk. Fat mass was significantly different among groups (11.4 g in LL, 15.8 g in HL, and 37.5 g in HH groups, $P<0.05$). Liver iron content of HL group was similar to that of LL group, which was about 30% higher than that of HH group (74.2 $\mu\text{g/g}$ in LL, 72.7 $\mu\text{g/g}$ in HL, and 55.7 $\mu\text{g/g}$ in HH groups, $P<0.05$). *Dcytb* mRNA level was higher in HL group than in HH group. While *Bmp6* mRNA level showed no significant difference in liver, duodenal *Bmp6* mRNA level was significantly lower in HH group compared with LL and HL groups. Liver Smad1/5 proteins were differentially activated – HH group had significantly less phosphorylated Smads than LL and HL groups. In conclusion, in this study we provided evidence to demonstrate that obesity induces a depletion of hepatic iron. More importantly, we clearly demonstrated that reducing body fat mass by feeding a lower fat diet to HFD-induced obese mice could restore liver iron storage. These findings in mice have expanded our knowledge for the obesity-induced adverse change in iron status and its reversal by dietary modulation and could have significant implications to human clinical practice.

Keywords: Obesity; Diet change; Body fat loss; Iron status; Dcytb; BMP6-Smad;
mouse