

C2C12 근관세포에서 betulinic acid가 β -oxidation에 미치는 효과 검증 The Effect of Betulinic Acid on β -oxidation in C2C12 Myotubes

김 하 윤, 고 광 웅*

한양대학교 생활과학대학 식품영양학과

Ha Yoon Kim, Gwang-woong Go*

Department of Food and Nutrition, Hanyang University

Abstract

An increased free fatty acid is a predominant biomarker for insulin resistance, causing metabolic dysfunction in skeletal muscle. Betulinic acid, a pentacyclic triterpene, has various biological benefits, including anti-inflammatory and anti-diabetic effects. We tested whether betulinic acid modulates β -oxidation as an indicator of fatty acid clearance in C2C12 myotubes. MTT assay for cell viability was performed using betulinic acid (0, 0.5, 1, 1.5, 2, and 3 μ M), and it was proved that there was no cytotoxicity up to 1 μ M. The expression of proteins of interest was assessed by immunoblotting in differentiated C2C12 myotubes. Lipoprotein lipase (LPL), cluster of differentiation 36 (CD36), and carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) were examined as pivotal proteins for β -oxidation in skeletal muscle. As a result, LPL, an enzyme that releases fatty acids from lipoproteins, decreased by 26% with 1 μ M betulinic acid. CD36, an integral membrane protein that transports free fatty acids into the cytosol, was reduced by 4% with 1 μ M betulinic acid. CPT1, the rate-limiting enzyme for long-chain fatty acid oxidation, decreased by 13% with 1 μ M betulinic acid. In conclusion, our results suggest that betulinic acid diminishes beta-oxidation in the C2C12 myotube.

Key words : betulinic acid, C2C12 cell line, CD36, CPT1, β -oxidation, LPL

주제어 : 베툴린산, C2C12 세포주, CD36, CPT1, 베타산화, LPL

1. 서론

비만은 체내에 지방조직이 과다하게 축적되어 대사 장애가 유발된 상태로 체질량지수(body mass index, kg/m²)가 25 이상인 상태를 의미한다. 국내 만 19세 이상 성인 비만 유병률(체질량지수 25 kg/m² 이상)은 2005년 30%를 초과한 이후 지속적으로 증가하여, 2020년 38.3%인 것으로 나타났다. 특히, 2020년 성인 남성 비만 유병률은 48.0%로, 10명 중 5명 이상이 비만에 해당된다(질병관리청, 2020). 국내 비만 인구가 증가함에 따라, 비만으로 인한 사회경제적 손실 규모는 의료비, 생산성 저하, 생산성손실, 간병비 등을 포함하여 최근 10년 사이 2배 이상 증가하였다(국민건강보험,

2021).

비만의 병태생리학적 관점에서 체지방 축적 및 감소에 관여하는 주요 조직은 크게 백색지방, 간, 근육으로 나눌 수 있다. 백색지방조직은 체내 지방 축적의 주된 장소이자 인슐린 저항성과 에너지 항상성을 조절한다(Sarjeant & Stephens, 2012). 백색지방조직에서 지방 전구세포가 성숙한 지방세포로 분화하는 과정을 adipogenesis라 한다. Adipogenesis를 통한 지방세포의 축적이 과도해지면 비만을 유발할 뿐 아니라 대사증후군까지 동반할 수 있다(Ghaben & Scherer, 2019). 반면, 백색지방조직에 축적된 중성지방을 글리세롤과 유리지방산으로 분해시키는 과정을 lipolysis라 한다. Lipolysis를 통해 체내 축적된 지방을 분해할 수 있어 체지방 감소 연구의 주요 타겟이 된다(Ahmadian et al., 2009). 이처럼 백색지방조직은 체지방 축적과 감소를 조절

* Corresponding Author ; Gwang-woong Go

Tel : 82-2-2220-1206, E-mail : gwgo1015@hanyang.ac.kr

할 수 있는 핵심이다. 간은 체내 지방 합성과 지방산 대사의 핵심 조직이다(Alves-Bezerra & Cohen, 2017). 간에서 과잉의 포도당을 지방산으로 전환 후 에스터화를 거쳐 중성지방을 합성하는 과정을 *de novo* lipogenesis라 한다. 간에서 합성된 중성지방은 지방조직에서 저장되거나 간 내 β -oxidation을 통해 에너지로 소비할 수 있다. 체지방 감소 연구 동향은 주로 백색지방의 adipogenesis, lipolysis 그리고 간의 *de novo* lipogenesis를 위주로 해석한다.

하지만, 체내 유리지방산을 산화시켜 에너지를 생성하는 β -oxidation은 체지방 감소의 또다른 핵심 기전이다(Watt & Hoy, 2012). 근육은 체내 β -oxidation의 약 80%를 담당하는 조직이다. Lipoprotein lipase (LPL)에 의해 분해된 지단백질에서 나온 유리지방산은 근육의 막 단백질인 cluster of differentiation 36 (CD36)를 통해 세포질 내로 유입된다. 세포질 내 유리지방산은 carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1)을 통해 미토콘드리아 내로 유입되고 β -oxidation 과정을 거쳐 ATP를 생성한다(Sebastián et al., 2009). 근육의 β -oxidation 기능이 제대로 작동하지 못할 경우, 체내 과도한 유리지방산은 인슐린 저항성과 지질대사의 기능 저하를 일으킬 수 있다. 따라서 체지방 감소와 비만으로 인한 합병증을 예방하기 위해서는 근육의 β -oxidation 기능을 향상시킬 필요가 있다.

Betulinic acid은 자작나무 껍질에서 추출한 pentacyclic triterpene 구조의 천연 생리활성 물질이다. Betulinic acid은 항염증, 항암, 항당뇨 효과 등 다양한 생리활성 효과를 지닌다(Lou et al., 2021). 최근 betulinic acid가 지질 대사에 영향을 끼친다는 연구가 보고되고 있다. Betulinic acid은 mTOR 기전의 상위 조절자인 insulin과 IGF1 신호 기전을 억제하여 간에서의 지질 합성을 억제하였고 대사증후군을 치료할 수 있는 잠재적 천연 생리활성 물질로 가능성을 인정받은 바 있다(Kim et al., 2021). 또한, betulinic acid가 AMPK를 활성화시켜 SREBP1C, mTOR, S6K의 발현량을

감소시키고 간 내 지질 합성을 억제하여 비알코올성지방간의 치료 가능성을 높인 연구가 보고되었다(Quan et al., 2013).

이처럼 betulinic acid은 간에서의 지질 합성을 억제하여 지질 대사를 조절하는 연구가 진행되고 있지만, 체지방 감소의 핵심 조직인 근육에서의 작용은 보고된 바 없다. 근육의 β -oxidation 기능을 향상시켜 유리지방산을 산화시키고 에너지를 생성하는 작용이 비만 환자에게 도움이 되는 것(Fritzen, 2020)이 밝혀진 바 있으며 비만 치료를 위해 근육의 β -oxidation을 향상시키는 연구가 필요하다. 따라서, 본 연구에서는 근육세포주로 알려진 C2C12 근원세포를 근관세포로 분화하여 betulinic acid을 처리하고, β -oxidation의 지표인 LPL, CD36, CPT1의 발현량을 확인하여 항비만 효과가 기대되는 betulinic acid의 β -oxidation 기능 향상 정도를 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료 및 시약

본 실험에 이용된 betulinic acid은 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 100% dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 3 μ g/mL 농도의 stock solution을 만들어서 냉동 보관하였다. 세포 배양을 위한 배지는 Dulbecco's Modified eagle Medium (DMEM)을 사용하였고, fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin antibiotics, 0.25% trypsin-EDTA는 웰진(Wellgene Inc., Gyeongsangbuk-do, Korea)에서 구입하였다. 세포 분화용 배지에 사용된 horse serum HS은 Gibco (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium

bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich Chemical Co.에서 구입하였다. Immunoblotting 실험에 사용한 LPL, CD36 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 구매하였고, GAPDH 항체는 Cell Signaling (Danvers, MA, USA)에서 구매하였다.

2. 세포배양

C2C12 근원세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구매하였다. 세포는 DMEM 배지에 10% FBS, 1x penicillin-streptomycin를 혼합하여 만든 배지를 이용하여 5% CO₂, 37°C 조건으로 배양하였다. 근관세포 분화를 위하여 세포는 6-well plate에 well 당 4.0 x 10⁵개 분주하였다. 근관세포로 분화 후, MTT 세포 생존율 분석 결과에 따라 betulinic acid을 glucose-free medium과 함께 0 µg/mL 부터 1 µg/mL까지 처리하였다. 24시간 후, β-oxidation 효과 검증을 위해 근관세포를 수확하여 immunoblotting을 실시하였다.

3. 세포분화

C2C12 근원세포를 근관세포로 분화를 위해 6-well plate에 well 당 4.0 x 10⁵개 분주하였다. 현미경 관찰 하에서 80-90% 정도 증식한 경우, 2% horse serum, 1x penicillin-streptomycin을 포함한 DMEM 분화용 배지로 교체하였다. 배지는 분화가 진행되는 5일간 매일 교체하였다. 세포 분화 상태를 확인하기 위해 C2C12 세포 분화 선행연구를 참고하여(Kislinger et al., 2005) 일자 별 세포 morphology를 Leica Application Suite EZ 현미경으로 관찰하였다(Leica, Wetzlar, Germany).

4. 세포 생존율 분석

MTT assay 기법을 이용하여 betulinic acid에 대한 C2C12 세포의 생존율을 측정하였다. 24-well plate에 well 당 1.0 x 10⁴개 분주하였다. 세포 주기를 통일시키기 위해 18시간 serum-free medium에서 배양하였다. 이후 betulinic acid의 최종농도가 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3 µg/mL이 되도록 처리하였다. Betulinic acid 처리 후 24시간동안 반응시키고, 반응 후 형성된 formazan염은 100% DMSO로 녹였다. 그 후 분광광도계를 이용해 540nm에서 흡광도를 측정하였다 (BioTek, Winooski, VT, USA).

5. Immunoblotting 기법

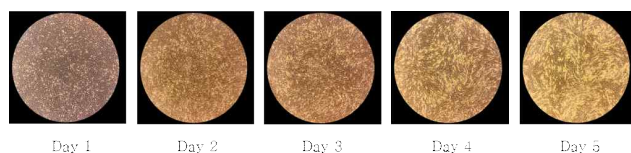
C2C12 근관세포에 betulinic acid 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1 µg/mL의 최종농도로 처리하고 24시간동안 반응시킨 후 세포를 수확하였다. 총 단백질을 얻기 위해 세포들을 protease inhibitor와 phosphorylase inhibitor를 첨가한 RIPA lysis buffer (Cell Signaling, Danvers, MA, USA)를 이용하여 ice 상태에서 용해시켰고, 13,572g로 4°C에서 15분간 원심 분리하였다. 상층액을 취해서 추출된 단백질의 농도는 BCA Protein assay 기법을 통해 정량하였다. 일정량의 단백질을 취하여 10% sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE) loading 하여 전기영동을 통해 단백질을 크기별로 분리하였다. Gel 내에서 분리된 단백질은 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane으로 이동시켰다. Membrane은 5% bovine serum albumin (GenDepot, Barker, TX, USA)에 담가 실온에서 1시간 동안 비특이적인 단백질에 대해 blocking시켰고, 1차 항체인 GAPDH, LPL, CD36, CPT1을 이용하여 4°C에서 overnight 반응시켰다. 다음 날 TBST로 10분씩 4번 세척하고 2차 항체를 사용하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후, TBST로 15분씩 4번 세척하고 enhanced

chemiluminescence (ECL) solution으로 발색시켜 ChemiDoc Imaging Systems으로 분석하였다(Bio-Rad, Hercules, CA, USA). 이후 ImageLab 프로그램으로 발현 정도를 정량분석하였다(Bio-Rad).

III. 결과 및 고찰

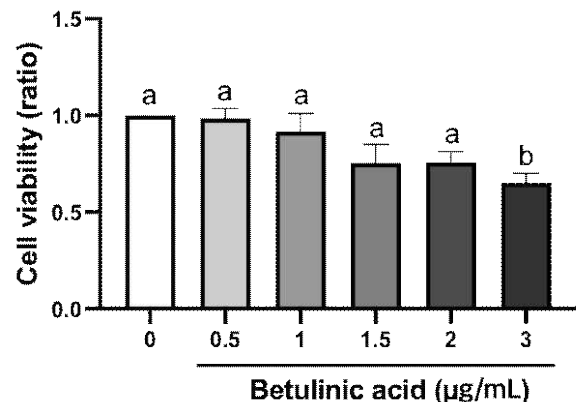
1. C2C12 근관세포 분화

C2C12 근관세포에서 betulinic acid에 의한 β -oxidation 효과를 보기 위해 먼저 C2C12 근원세포를 5일간 근관세포로 분화 유도하였다. 분화 종료는 C2C12 분화 선행연구를 참고하여(Kislinger et al., 2005) 형태학적 표현형으로 종료 시점을 설정하였다. 분화 종료 후, 6-well plate의 모든 well에서 80%이상 근관세포로 분화가 유도됨을 관측하였다(Figure 1). 분화 1일차에 근원세포가 100%이상 증식하여 세포끼리 접촉하였다. 2일차에 세포의 핵이 융합되고 세포 길이가 길어지는 양상을 보였다. 3일차에 핵 융합과 세포의 길어짐의 정도가 증가하였다. 4일차에 분화되어 다핵의 원통형 세포를 관측하였다. 5일차에 분화가 완료되어 원통형의 근관세포가 80%이상 관찰되었다. 이를 통해 근관세포를 형성하였고 이후 betulinic acid가 C2C12 세포에 미치는 독성을 평가 후 β -oxidation 효과를 검증하는 실험을 수행하였다.



<Figure 1> C2C12 myoblasts were differentiated to myotube for 5 days. C2C12 myoblasts were differentiated to myotube up to 80% confluency.

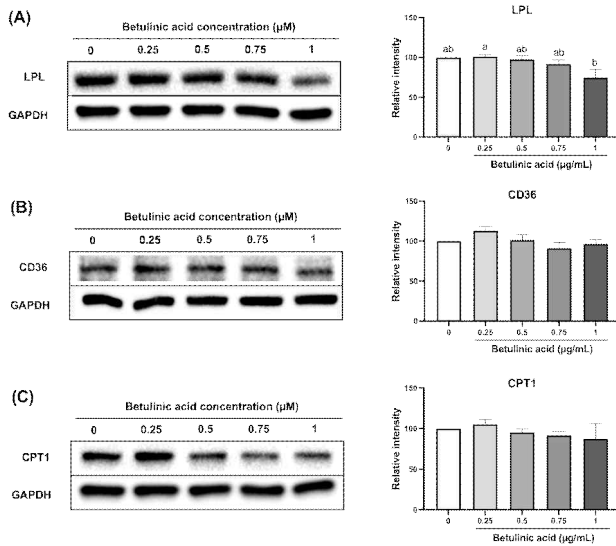
2. 세포 독성 평가



<Figure 2> Cell viability of C2C12 myoblast treated with various concentrations of betulinic acid. The cells represented approximately 10% cytotoxicity at a concentration of 1.5 µM betulinic acid. At a concentration of 3 µM betulinic acid, the cell viability decreased by 35% ($p=0.01$). Data shows mean \pm SEM.

C2C12 미분화 근원세포에서 betulinic acid에 의한 독성 정도를 평가하기 위해 MTT assay를 수행하였다. 그 결과, 물질을 처리하지 않은 세포의 생존율(cell viability)을 100%로 하였을 때 betulinic acid 0.5, 1, 1.5, 2, 3 µg/mL 처리 농도에서 세포 생존율이 각각 98%, 91%, 75%, 75%, 65%으로 측정되었다(Figure 2). Betulinic acid 3 µg/mL 농도에서 대조군 대비 통계적으로 유의하게 세포 생존율이 감소하였다($p<0.05$). 세포 독성은 betulinic acid 처리 후 현미경 관측 하에 세포의 형태학적 변화를 기준으로 평가하였다. 세포 생존율 10% 감소 이상에서 세포의 형태학적 변화가 두드러져 내부적으로 세포 생존율 10% 감소를 기준으로 세포에 미치는 독성이 없다고 판단하였다. 이후 실험에서는 betulinic acid 처리 농도를 세분화하여 독성이 없는 0.25, 0.5, 0.75, 1 µg/mL 농도 범위를 설정하였다. 이후 C2C12 근관세포에 betulinic acid를 최대 1 µg/mL 처리하여 LPL, CD36, CPT1의 발현을 확인하는 β -oxidation 검증 실험을 수행하였다.

3. C2C12 분화 근관세포 내 β -oxidation 분석



<Figure 3> Effects of betulinic acid on β -oxidation via LPL/CD36/CPT1 in C2C12 myotubes. LPL, CD36, and CPT1 were measured after betulinic acid treatment for 24 h. LPL decreased by 26% with 1 μ M betulinic acid ($p < 0.05$). CD36 was reduced by 4% with 1 μ M betulinic acid. CPT1 decreased by 13%. Data shows mean \pm SEM.

근육은 에너지를 생성하여 체내 에너지 항상성을 유지해주고 지방산의 완전 산화에 기여하는 조직이다. 근육에서의 유리지방산 β -oxidation의 기능이 저하될 경우, 인슐린 저항성을 유발하며 비만을 악화시키고 체내 항상성을 파괴한다(Houmard, 2008). CPT1, PPAR α 등 미토콘드리아의 β -oxidation 기능을 저하시킨 쥐를 통해 병태생리학적 연구를 한 결과, 고혈당을 포함한 대사 장애가 나타남을 확인하였다(Spiekerkoetter & Wood, 2010). 악액질(Cachexia)이 유도하는 대사과잉증과 관련하여 근육 내 과잉의 β -oxidation은 오히려 근위축을 일으켜 β -oxidation을 억제하는 치료제를 사용하기도 한다(Fukawa et al., 2016). 하지만 근육 내 β -oxidation은 유리지방산 유입을 증가시켜 근육 수축에 필요한 에너지를 공급하는 핵심적인 방법이다(Zhang et al., 2010). PPAR δ 활성을 높여 근육 세포의 β -oxidation 기능을 촉진한 연구는 비만이 유도하는 대사증후군을 감소시킬 가능성을 인정받았다(Tanaka et al., 2003). 고지혈증 치료제

인 fibrate는 peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α)의 작용자로써 고지혈증을 치료하기도 하지만 근육에서 β -oxidation 기능을 향상시킨 사례가 있다(Pettersen et al., 2012). 레티산(Retinoic acid)은 근육 내 β -oxidation 기능에 관여하는 단백질의 발현량을 증가시켜 영양성분 내 레티산의 효능을 입증한 바 있다(Amengual et al., 2012). 이처럼 근육의 β -oxidation 기능의 중요성을 강조하며 작용자를 찾는 연구가 활성화 되고 있는 추세이다.

따라서 본 연구에서는 C2C12 근관세포에서 betulinic acid을 통한 β -oxidation 조절 효과를 확인하기 위해 β -oxidation의 주요 단백질인 LPL, CD36, CPT1의 발현량을 western blot 방법을 통해 확인하였다. 지단백질을 분해하여 유리지방산을 배출하는 LPL의 발현량은 betulinic acid 0.5 μ g/mL 처리 농도부터 감소하였다 (Figure 3A). Betulinic acid의 농도가 증가할수록 LPL 발현량은 감소하였고 betulinic acid을 처리하지 않은 대조군 대비 1 μ g/mL 처리 농도에서 통계적으로 유의하게 약 26% 감소하였다 ($p < 0.05$). 유리지방산을 세포질로 이동시키는 내막단백질인 CD36의 발현량은 betulinic acid 0.75 μ g/mL 처리 농도부터 감소하였다. 대조군 대비 betulinic acid 0.75 μ g/mL 처리 농도에서 9% 감소하였고 1 μ g/mL 처리 농도에서 약 4% 감소하였다(Figure 3B). 통계적으로 유의한 감소치는 나타나지 않았다($p = 0.17$). 장쇄지방산 산화의 핵심 조절 인자인 CPT1의 발현량은 betulinic acid 0.5 μ g/mL 처리 농도부터 감소하였다. Betulinic acid 0.5, 0.75, 1 μ g/mL 처리 농도에서 발현량이 감소하였고 대조군 대비 1 μ g/mL 처리 농도에서 약 13% 감소하였다(Figure 3C). 통계적으로 유의한 감소치는 나타나지 않았다($p = 0.67$).

이처럼 betulinic acid은 지방산을 세포 내 미토콘드리아로 이동시키는 주요단백질의 발현에 영향을 주지 않거나 감소시켰다. 이러한 결과는 본 연구진의 선행연구와 일치하지 않는 것으로, 선행연구에서는 C57BL/6 mice에게

betulinic acid 급여 시 체중, 체지방, 지방산산화 증가와 같은 물리적, 대사적 표현형이 개선되었다(unpublished). 최근 betulinic acid의 지질 대사 관련 생리활성 기능은 검증되고 있지만, 체지방 감소의 핵심 조직인 근육에서의 작용은 연구가 부족한 추세이다. 본 연구는 betulinic acid의 근육 내 작용을 *in vitro* 세포주 실험을 통해 검증한 것에 의미가 있다. 연구 결과를 바탕으로 추후 연구를 통해 *in vivo* 실험에서 확인된 betulinic acid에 의한 대사증후군 개선에서 근육조직 및 근육세포가 기여한 기전을 검증하는 작업이 필요하다고 판단된다. 종합하면, betulinic acid은 C2C12 근관세포에서 β -oxidation와 관련한 핵심 단백질들(LPL, CD36, CPT1)의 발현량을 감소시키거나 유의미한 영향을 주지 않았다.

참고문헌

- Ahmadian, M., Wang, Y., Sul, H. S.(2010). Lipolysis in adipocytes. *Int J Biochem Cell Biol*, 42(5), 555-559.
- Alves-Bezerra, M., Cohen, D. E.(2017). Triglyceride Metabolism in the Liver. *Compr Physiol*, 8(1), 1-8.
- Amengual, J., Ribot, J., Bonet, M. L., Palou, A.(2008). Retinoic Acid Treatment Increases Lipid Oxidation Capacity in Skeletal Muscle of Mice. *Obesity (Silver Spring)*, 16(3), 585-591.
- Fritzen, A. M., Lundsgaard, A. M., Kiens, B.(2020). Tuning fatty acid oxidation in skeletal muscle with dietary fat and exercise. *Nat Rev Endocrinol*, 16(12), 683-696.
- Fukawa, T., Yan-Jiang, B. C., Min-Wen, J. C., Jun-Hao, E. T., Huang, D., Qian, C. N., Ong, P., Li, Z., Chen, S., Mak, S. Y., Lim, W. J., Kanayama, H. O., Mohan, R. E., Wang, R. R., Lai, J. H., Chua, C., Ong, H. S., Tan, K. K., Ho, Y. S., Tan, I. B., The, B. T., Shyh-Chang, N.(2016). Excessive fatty acid oxidation induces muscle atrophy in cancer cachexia. *Nat Med*, 22(6), 666-671.
- Ghaben, A. L., Scherer, P. E.(2019). Adipogenesis and metabolic health. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20(4), 242-258.
- Houmard, J. A.(2008). Intramuscular lipid oxidation and obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 294(4), R1111-1116.
- Kim, H. K., Park, Y., Shin, M., Kim, J. M., Go, G. W.(2021). Betulinic Acid Suppresses de novo Lipogenesis by Inhibiting Insulin and IGF1 Signaling as Upstream Effectors of the Nutrient-Sensing mTOR Pathway. *J Agric Food Chem*, 69(42), 12465-12473.
- Kislinger, T., Gramolini, A. O., Pan, Y., Rahman, K., MacLennan, D. H., Emili, A.(2005). Proteome Dynamics during C2C12 Myoblast Differentiation. *Mol Cell Proteomics*, 4(7), 887-901.
- Lou, H., Li, H., Zhang, S., Lu, H., Chen, Q.(2021). A Review on Preparation of Betulinic Acid and Its Biological Activities. *Molecules*, 26(18), 5583.
- Pettersen, J. C., Pruijboom-Brees, I., Francione, O. L., Amacher, D. E., Boldt, S. E., Kerlin, R. L., Ballinger, W. E.(2012). The PPAR α agonists fenofibrate and CP-778875 cause increased β -oxidation, leading to oxidative injury in skeletal and cardiac muscle in the rat. *Toxicol Pathol*, 40(3), 435-447.
- Quan, H. Y., Kim, D. Y., Kim, S. J., Jo, H. K., Kim, G. W., Chung, S. H.(2013). Betulinic acid alleviates non-alcoholic fatty liver by inhibiting SREBP1 activity via the AMPK-mTOR-SREBP signaling pathway. *Biochem Pharmacol*, 85(9), 1330-1340.
- Sarjeant, K., Stephens, J. M.(2012). Adipogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(9), a008417.
- Sebastián, D., Guitart, M., García-Martínez, C., Mauvezin, C., Orellana-Gavaldà, J. M., Serra, D., Gómez-Foix, A. M., Hegardt, F. G., Asins, G.(2009). Novel role of FATP1 in mitochondrial fatty acid oxidation in skeletal muscle cells. *J*

Lipid Res, 50(9), 1789-1799.

Spiekerkoetter, U., Wood, P. A.(2010). Mitochondrial fatty acid oxidation disorders: pathophysiological studies in mouse models. *J Inherit Metab Dis*, 33(5), 539-546.

Tanaka, T., Yamamoto, J., Iwasaki, S., Asaba, H., Hamura, H., Ikeda, Y., Watanabe, M., Magoori, K., Ioka, R. X., Tachibana, K., Watanabe, Y., Uchiyama, Y., Sumi, K., Iguchi, H., Ito, S., Doi, T., Hamakubo, T., Naito, M., Auwerx, J., Yanagisawa, M., Kodama, T., Sakai, J.(2003). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor δ induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(26), 15924-15929.

Watt, M. J., Hoy, A. J.(2012). Lipid metabolism in skeletal muscle: generation of adaptive and maladaptive intracellular signals for cellular function. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 302(11), E1315-1328.

Zhang, L., Keung, W., Samokhvalov, V., Wang, W., Lopaschuk, G. D.(2010). Role of fatty acid uptake and fatty acid β -oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*, 1801(1), 1-22.