

# Retinoic Acid가 돼지 지방전구세포의 분화와 유전자 발현에 미치는 영향

임희경\* · 최강덕\*\* · Baatartsogt Oyungerel\* · 최영숙\*\*\* · 정정수\*\*\*

한경대학교 생물환경, 정보통신전문대학원\*, 한경대학교 생명공학부\*\*,  
충북대학교 농업생명환경대학 축산학과\*\*\*

## Effects of Retinoic Acid on Differentiation and Gene Expression of Pig Preadipocytes

Heekyong Lim\*, Kangduk Choi\*\*, Baatartsogt Oyungerel\*, Young-suk Choi\*\*\*, Chung Soo Chung\*\*\*

Graduate School of Biotechnology & Information Technology, Hankyong National University, Gyonggi 456-749\*, School of Biotechnology, Hankyong National University, Ansong-city, Korea, 456-749\*\*, Department of Animal Science, Chungbuk National University, Cheongju 361-763\*\*\*

### ABSTRACT

The current study was undertaken to determine the effect of retinoic acid (RA) on differentiation and gene expression of pig preadipocytes. The preadipocytes were isolated from the backfat of the new-born pigs. RA was treated to the cultured cells for 4 days and RNA was extracted from the cells. Isolated RNA went through in situ hybridization using the 14,688-gene cDNA microarray chip. Degree of cell differentiation was determined by measuring glycerol 3-phosphate dehydrogenase activity. RA decreased differentiation of pig preadipocytes by 78%. Fourteen genes were significantly up-regulated by RA, including genes known to be involved in lipid metabolism, particularly sphingomyelin phosphodiesterase, apolipoprotein R precursor, growth factor receptor-bound protein 14, retinoic acid receptor RXR gamma. However, the expression of vascular endothelial growth factor D precursor and growth hormone receptor precursor genes playing a central role in cell growth, was greatly decreased. These results suggest that RA inhibits differentiation of pig preadipocytes by regulation of gene expression of the growth factor or growth hormone receptor.

(Key words : Retinoic acid, Pig, Preadipocytes, Differentiation, Microarray, Gene expression)

### I. 서론

최근에 동물성 지방의 섭취에 의한 성인병 발생의 우려 때문에 지방이 적은 육류의 생산이 중요한 과제로 인식되고 있다. 지방이 적은 축산물 생산은 사료효율 생산을 수반하기에 더욱 중요시 되고 있다. 지방축적 증가는 세포

수의 증가(hyperplasia) 또는 세포크기의 증가(hypertrophy)에 의해서 이뤄지는데, 지방축적 감소를 위해서는 세포크기 보다는 세포수를 조절하는 것이 훨씬 효율적이다. 이와 관련해서 cell line 또는 primary fat cell을 이용해서 이들 세포의 분화에 대한 연구가 많았다(Guo와 Liao, 2000; Harmelen 등, 2004; Yagi 등, 2004).

Corresponding author : Chung Soo Chung, Department of Animal Science, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea  
Tel : 582-43-261-2549, Fax : 582-43-276-3146, E-mail : chungpig@hotmail.com

비만은 지속된 에너지 과잉으로 인해 초래되며 과잉 에너지가 지방산을 거쳐 triglyceride의 형태로 지방세포에 축적되는데, 지방세포의 숫자나 크기가 증가되면서 지방축적이 시작된다. 지방전구세포 증식에 관여하는 cytokine은 IGF-1, EGF,  $\beta$ -FGF 등이 있으며 분화에 관여되는 것은 insulin, 성장호르몬, cAMP, glucocorticoid, 갑상선 호르몬 등이 있으며 분화를 억제하는 물질로는 TNF, TGF 등이 있다(Simons 등, 2005). Retinoic acid(RA)는 3T3-L1 cell의 분화를 억제한 사실이 여러 보고에 의해 확인되었다(Stone과 Bernlohr, 1990; Xue 등, 1996). 돼지에서는 Suryawan과 Hu(1997)가 20 $\mu$ M의 RA가 갓난 돼지에서 채취한 지방전구세포(stroma-vascular cell)의 분화를 억제시키며, 분화 초기 즉 세포의 증식이 왕성한 시기에 억제정도가 컸고 분화 후기에는 억제작용이 미미했다고 보고했다. 또한 Torii 등(1996)은 retinol이 양의 지방전구세포의 adipogenesis를 억제하였다고 보고하였다. Retinoid는 핵내 수용체인 retinoic acid receptors(RAR)에 결합하여 유전자 발현을 조절한다고 알려져 있다(Neerven 등, 2008).

RNA는 유전자의 발현양상을 반영하므로 유전자 발현의 연구에 있어 microarray를 이용한 mRNA의 관찰은 유전자 발현에 대한 신속하고 정량적인 평가와 수많은 유전자의 발현을 동시에 관찰할 수 있는 장점이 있다. 이러한 특성으로 인해 microarray 기법은 세포내 유전자들의 복합적인 상호연관 관계의 구명과 세포 내 환경변화에 의한 세포 내 유전자들의 활성 변화 등 대량의 유전자 기능 분석을 위한 매우 유용한 도구로 이용되고 있다. 그러나 지금까지 RA가 돼지 지방세포의 분화와 관련된 유전자 발현에 미치는 영향에 관한 보고는 전무한 편이다. 따라서 본 연구에서는 RA가 지방세포의 분화에 미치는 작용을 먼저 구명하고, microarray를 이용하여 RA를 처리한 지방전구세포들에서 발현되는 유전자를 비교해서 돼지 지방세포 분화와 관련된 유전자를 확인하고자 한다. 본 연구의 결과는 앞으로 RA가 돼지 지방축적억제제로 사용될 경우 중요한 기초자료를 제공해 줄 것이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 돼지 지방전구세포의 분리 및 배양

생후 1~2일령 된 체중 1.6~1.7 kg 신생 자돈을 CO<sub>2</sub> gas를 이용하여 질식사 시킨 후 비눗물로 씻고 Iodine과 70% 에탄올을 이용하여 소독하였다. 돼지의 머리 밑에서 견갑골까지 I자 모양으로 자른 후 지방조직을 채취했다. 지방조직의 무게 당 2000 unit collagenase를 3 ml KRB (Kreb's ringer bicarbonate) buffer에 녹여 40분 동안 incubation한 후 250  $\mu$ m nylon mesh로 걸렸다. Mature fat cell을 제거하기 위해서 37 $^{\circ}$ C water bath에 15분 동안 두었다. 2800 RPM으로 10분 동안 centrifuge 시키고 KRB buffer로 현탁한 후 2000 RPM으로 10분 동안 centrifuge 시켰다. DMEM/F12 (10% FBS)를 5 ml 넣어 tube 바닥의 stroma-vascular (S-V) cell들을 현탁한 후 75  $\mu$ m mesh filter를 이용해서 걸렸다. 분리된 S-V cell들을 Hemacytometer를 이용해 counting 하고 6-well plate에 1 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/well로 seeding 하였다. Seeding 1일 후에 FBS가 없는 F-12 DMEM으로 2회 세척하여 RBC 등을 제거한 후 5% FBS를 함유한 F-12 DMEM에 insulin (100 ng/ml), transferrin (100 ng/ml) 및 hydrocortisone (50 ng/ml)을 첨가해서 분화를 유도했다(day 0). 이들 분화유도 물질을 분화완료시 까지 처리했다.

### 2. Retinoic acid (RA) 처리 및 RNA 추출

RA가 지방전구세포의 분화에 미치는 영향을 조사하기 위해서 4일 동안(day 0~4) 10  $\mu$ M의 RA를 처리하였다. 대조군으로 RA를 녹이는데 사용된 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 처리하였다. Microarray를 이용한 유전자 발현 변화 분석을 위해서는 RA를 day 0~4에 처리하고 day 4에 cell로부터 Mini RNA isolation II<sup>TM</sup> (ZYMO Reserch cat: R1030) Kit를 이용하여 RNA를 추출하였다.

### 3. 지방전구세포의 분화 측정

지방전구세포의 성숙세포들의 분화 정도는 배양중인 세포의 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH)의 활성도를 측정함으로써 구명했는데 Wise와 Green (1979)의 방법을 따랐다. GPDH는 dihydroxy acetone phosphate가 glycerol-3-phosphate 로 바뀌는데 관여하는 효소이고, glycerol-3-phosphate는 triglyceride 합성의 원료가 된다.

#### 4. 지방전구세포로부터 RNA 분리 후 cDNA 합성

Day 4에 cell로부터 RNA 추출은 Mini RNA isolation II™ (ZYMO Reserch cat: R1030) Kit를 이용하였다. Cell homogenization를 위해 우선 Cell culture한 sample들의 배지를 제거한 뒤 PBS로 3회 세척하였고 ZR Buffer를  $10^2 \sim 5 \times 10^6$  cells당 600  $\mu$ l씩 넣어주었다. ZR Buffer가 들어 있는 sample을 잘 모아 Zymo-spin III Column Tube에 옮겨준 후 1분 동안 원심분리를 수행하였다. Column에 걸리진 폐액을 버리고 Washing을 위해 350  $\mu$ l의 RNA Wash Buffer를 Zymo-spin III Column에 넣은 다음 1분 동안 원심을 해 주었다.

Washing 과정을 한 번 더 반복한 뒤 Column을 새 1.5 ml Tube에 옮긴 다음 50  $\mu$ l의 RNase-free Water 50  $\mu$ l를 넣어주었다. elute를 위해 1분 동안 기다린 후 Spin down을 해 주었다. 추출된 RNA는 OD 260 nm에서 농도를 측정하였다. Total RNA 5  $\mu$ g과 oligo dT을 섞은 후 70°C에서 10분간 반응시킨 후 얼음 위에서 2  $\mu$ l SuperScript II (200 units/ $\mu$ l), 0.6  $\mu$ l 50 $\times$ dNTP mix, 4  $\mu$ l 5 $\times$ reaction buffer를 첨가하여 42°C에서 2시간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

#### 5. Microarray 실험

14,688개 유전자를 함유한 DNACHIP을 미국 아이오와대학의 Dr. Rothschild로부터 구입하여 실험을 수행하였다. 이 칩은 7,000여 개의 미지 유전자가 포함되어 있다.

각각의 cDNA 1  $\mu$ g에 DMSO군에는 Cy3로 형

광표지 된 Primer를, RA군에는 Cy5로 형광표지 된 primer를 각각 넣은 후 3DNA Array 900 kit (Genisphere Inc.)의 방법을 이용하여 실험하였다. Microarray에 부착된 형광 염색의 산화를 막기 위해 DyeSaver2를 이용하여 microarray의 표면을 coating 하였다. 형광이미지는 ScanArray 4000 (GSI Lumonics)을 이용하여 Cy3는 550 nm의 파장에서 스캔하였고 Cy5는 650nm의 파장에서 스캔하여 얻었다. Microarray에서의 유전자의 발현양상은 GenePix 5.0과 Vector Xpression 3.0을 사용하여 global intensity normalization, background subtraction method를 위한 normalization, MA, Lowess (Locally Weighted Linear Regression) normalization을 통해 분석하였다.

### III. 결과 및 고찰

본 연구는 갓난 돼지의 지방조직에서 분리한 지방전구세포를 배양 중 RA를 처리해서, RA가 세포분화에 미치는 작용을 구명하고 또 배양중인 세포로부터 RNA를 추출해서 유전자 발현을 구명하였다. 유전자 14,688개의 발현양상을 동시에 측정할 수 있는 microarray를 이용했는데 대조군과 RA 처리군 사이에 유전자 발현정도가 2배 이상 차이 나는 것은 유의한 것으로 판단했다.

#### 1. RA가 지방전구세포의 분화에 미치는 영향

Fig. 1에서 보는 대로 RA는 돼지 지방전구세포의 분화를 78%를 억제했다. Fig. 2는 Fig. 1의 결과를 뒷받침해 주는 결과를 보여주고 있는데 RA를 처리 받은 지방전구세포의 분화가 크게 억제되었다.

#### 2. cDNA microarray에서의 hybridization 양상

cDNA microarray에 fluorescence hybridization한 뒤 세척과정을 거친 후 형광이미지는 ScanArray 4000 (GSI Lumonics)을 이용하여 스캔하였고 유전자의 발현양상은 GenePix 5.0과 Vector Xpression 3.0을 사용하여 분석 후 Cy3

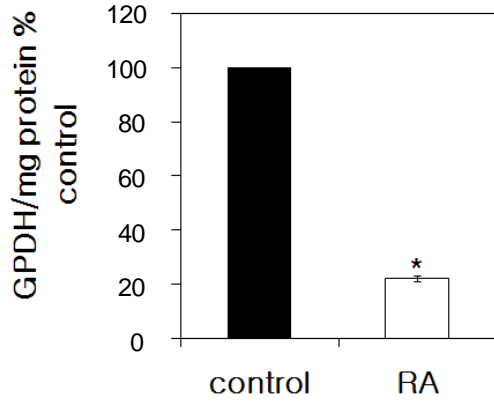


Fig. 1. Effect of RA on differentiation of porcine preadipocytes isolated from new-born pigs. Difference from DMSO-treated cells (\*, p<0.001).

와 Cy5를 plot으로 나타내면 Fig. 3와 같다.

### 3. 발현이 항진된 유전자

지방전구세포에 RA를 처리한 경우 대조군에 비해 발현이 2배이상 증가한 유전자는 전부 258개였으며 이중에 의미있는 유전자 14개를 정리하였다 (Table 1). Histidase가 158.46배 증가를 보여 주었으며 이 이상 증가된 유전자는 없었다. 지방전구세포에 retinoic acid 처리시 대조

군에 비해 발현이 유의하게 증가되는 유전자는 14개였다. Histidase는 histidine을 urocanate로 만드는 역할을 하며 결핍 시에는 혈중 histidine의 증가로 지능장애가 일어날 수 있다 (Kawai 등, 2005). Sphingomyelin phosphodiesterase는 sphingolipid 대사반응에 포함된 가수분해효소이다. Sphingomyelin의 분해산물이 lymphoblastoid Swei 세포의 성장과 분화에 영향을 준다 (Alessenko, 2000). Retinoic acid를 지방전구세포에 처리 시 세포분열 및 분화가 억제되었으며, 이는 sphingomyelin phosphodiesterase 유전자의 발현이 증가됨으로써 기인된 것으로 생각된다. Apolipoprotein R precursor는 lipid binding protein으로 장에서 간으로 지질의 전달에 관여하는 단백질로 여러 sub-classes로 나누어진다. apolipoprotein R precursor는 지방전구세포에서 세포성장의 조절인자로 작용할 것으로 생각된다. Growth factor receptor-bound protein 14는 지방전구세포의 성장 조절에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. Retinoic acid receptor RXR gamma는 9-cis retinoic acid에 의해 활성화 되는 nuclear receptor로 알려져 있다. 이러한 사실로부터 retinoic acid를 처리 시 이 유전자의 발현이 증가된 것은 자연스러운 반응이며 실험이 정상적으로 되었음을 의미한다. Retinoic acid-binding protein II (CRABP-II)는 retinoic acid와 친화성이

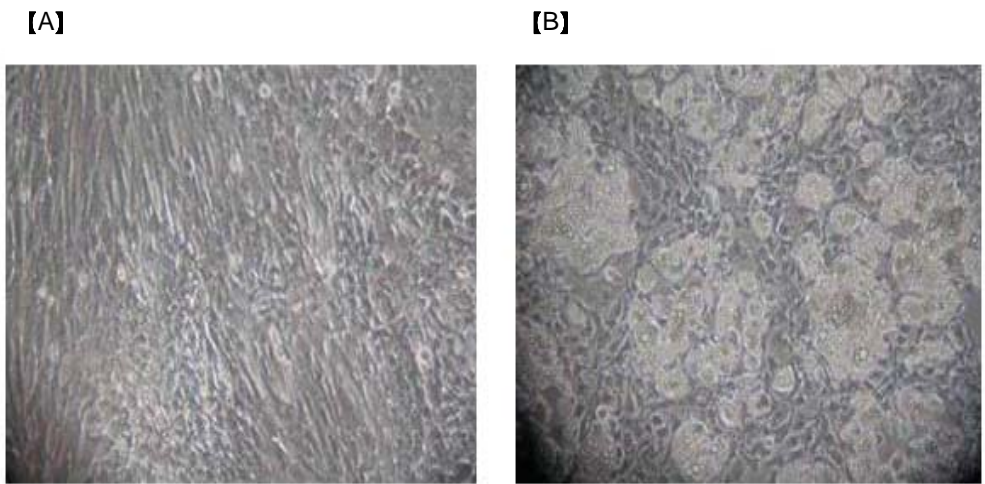


Fig. 2. Micrographs showing differentiation of pig preadipocytes treated with RA or DMSO (control). [A] RA, [B] DMSO.

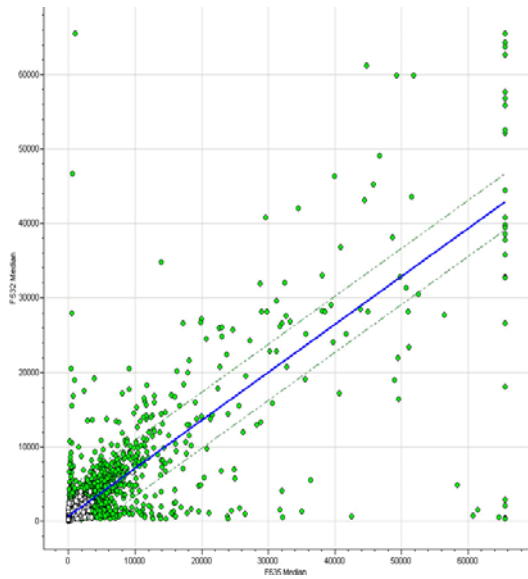


Fig. 3. Scatter plot of microarray test of retinoic acid.

큰 세포내 지질 결합 단백질이다. retinoic acid receptor (RAR)를 공동 리간드로 하여 핵내 수용체의 전사활동을 강화시키는 기능을 갖고 있다. 즉 retinoic acid를 이 수용체로 전달해 주는 역할을 할 것으로 추정된다. CRABP-II는 세포질 단백질이며 retinoic acid와 결합을 통해 핵

내 이동을 한다. Fatty acid-binding protein (FABPs)은 에이코사노이드와 retinoids 같은 지방친화성의 물질과 지방산에 대한 운반단백질이다 (Chmurzynska, 2006). 세포안과 세포 밖의 막 사이에서 지방산의 전달을 용이하게 해주는 단백질이다. Adipocyte fatty acid binding protein (AFABP)는 karitinocyte fatty acid binding protein (KFABP)의 발현을 증가시킨다 (Hotamisligil 등, 1996). 이 유전자의 결핍이 생기면 비만이 발생되는 것을 볼 때, 이 단백질의 발현이 증가한다는 것은 비만을 줄이는 쪽으로 작용하고 있음을 알 수 있다. 즉 retinoic acid가 비만을 억제하는 기능을 갖고 있다는 간접적인 증거가 된다 (Shaughnessy 등, 2000). High density lipoprotein receptor (HDLR)은 지질을 HDL로부터 세포로 전달해주는 역할을 한다. HDLR은 콜레스테롤과 콜레스테릴에스터 물질들을 조직으로 이동시키는 역할을 하는데 이러한 단백질이 많아지면 steroid hormone의 생산을 조절함으로써 비만을 통제하는 것으로 생각된다. (Acton 등, 1996; Rigotti 등, 1996; Landschulz 등, 1996). Steroid 21-hydroxylase (P-450 (C21)B)의 결핍은 선천성 부신과형성이란 질병을 발생시키며 스테로이드 호르몬 합성 첫 단계인 콜

Table 1. Differentially increased genes by retinoic acid

Gene name	Gene bank no	Fold
Histidase	NM_002108	158.46
Sphingomyelin phosphodiesterase 2	NM_003080	102.82
Apolipoprotein R precursor	NM_213942	72.91
Growth factor receptor-bound protein 14	NM_004490	35.07
Retinoic acid receptor RXR gamma	NM_001009598	28.96
Retinoic acid-binding protein II	NM_001009598	8.12
Fatty acid-binding protein	NM_001099931	7.65
Adipocyte fatty acid binding protein	AF102872	6.11
Hightensitylipoproteinreceptor	AF467889	5.91
Steroid 21-hydroxylase	NM_214433	5.51
Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase	NM_004035	5.33
Melanocortin-5 receptor	NM_005913	5.2
Transcriptionfactor E2F-4	NM_001950	2.59
CREB-binding protein	NM_001079846	2.52

레스테롤의 프레그니놀론 (pregnenolone)으로의 전환을 수행하지 못하게 한다. 따라서 부신 피질은 콜레스테롤로 채워지게 된다. 치료를 하지 않으면, 스테로이드 호르몬 부족으로 심한 화학적인 불균형, 탈수, 유아기 사망을 초래한다 (New와 Levine, 1984). 이 단백질의 증가는 비만조절의 기작과 관련이 있을 것으로 생각된다. Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase (PACOX)는 지방산  $\beta$ -산화경로의 첫 번째 효소로서 이 효소의 증가는 지방산의 산화를 활성화 시키는 것으로 볼 때, retinoic acid가 지방의 분해를 촉진시키는 것으로 생각된다. melanocortin-5 receptor (MC5R)는 체온 조절, 면역 조절에 관여한다 (Kraan 등, 1998). Transcription factor E2F-4는 세포 증식과 세포 사멸을 조절하는 세포 주기에 영향을 주며 또한 지방생성기작에서도 중요한 역할을 한다 (Landsberg 등, 2003). CREB-binding protein은 DNA 복구, 분화, 세포의 성장, 세포소멸, 종양억제 등과 같은 기본적인 세포기능을 가지며 돌연변이시 Rubinstein-Taybi syndrome, Rubinstein Taybi 증후군이 나타난다. CREBP (cAMP Response Element Binding protein)는 간에서 지방 발화와 지방 저장, 당 분비를 조절하며 CREB는 지방 저장을 촉진하는 PPAR-gamma라는 분자 생산을 차단하는데, 기아 상

태에서 CREB는 PPAR-gamma를 차단함으로써 자유 지방산이 저장되지 않고 발화되도록 하며, 혈류에서 지방산 축적을 촉진하고, 지방이 에너지로 되는 것을 촉진한다고 보고되어있다 (Herzig 등, 2003).

#### 4. 발현이 저하된 유전자

지방전구세포에 RA를 처리한 경우 대조군에 비해 발현이 2배 이상 감소한 유전자는 전부 167개였으며 이중에 의미 있는 유전자 13개를 정리하였다. 특히 4배 (ratio상 0.25) 이상으로 발현이 감소된 유전자를 나열하면 Vascular endothelial growth factor D precursor (VEGF D precursor), growth hormone receptor precursor, retinal short-chain dehydrogenase/reductase 등이 있다 (Table 2). 이중 가장 감소된 것은 VEGF D precursor로 17배 이상이었다.

Vascular endothelial growth factor D (VEGFD) precursor는 내피세포 성장과 기능의 모듈레이터이며, 유사분열을 촉진하는 VEGFD의 전구물질이다 (Ferrara 등, 2004). Growth hormone receptor (GH-R) precursor의 유전자 발현의 감소는 지방조직 성장의 억제와 연관지어 생각할 수 있다 (Vikman 등, 1991).

Table 2. Differentially decreased genes by retinoic acid

Gene Name	Gene bank no	Fold
Vascular endothelial growth factor D precursor	NM_004469	0.01
Growth hormone receptor precursor	NM_214254	0.08
Retinal short-chain dehydrogenase/reductase	NM_004753	0.18
Nuclear receptor binding protein	NM_013392	0.28
C/EBP-induced protein	NM_030802	0.31
Prostaglandin G/H synthase 1 precursor	P05979	0.32
Peroxisome proliferator activated receptor alpha	NM_001044526	0.37
Catalase	NM_214301	0.41
Transcription factor TFII-I	NM_001518	0.45
Insulin-like growth factor-binding protein3	NM_001005156	0.46
5-lipoxygenase-activating protein	M96555	0.47
CyclinD2	NM_214088	0.49
Carnitine palmitoyltransferase I	NM_001007191	0.5

Retinal short-chain dehydrogenase / reductase는 nuclear receptor signaling pathway에 포함되어 있다(Duester, 1996). Nuclear receptor binding protein (NRBP)은 세포질 망상 구조 (ER)와 골지의 사이에서 수송에 영향을 주는 호스트 세포 단백질로서 Rac3 (Rho-GTPase family member)와 상호 작용한다(Chua 등, 2004). C/EBP-induced protein 는 지방세포와 간세포의 분화를 관리하는 역할을 한다(Scott 등, 1992). Prostaglandin G/H synthase 1 precursor는 arachidonic acid를 thromboxane A2로 신진대사 시키는 과정을 촉매 작용하는 효소이다(Funk 등, 1991). Peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR)는 핵에 존재하는 호르몬 수용체로 지질, 포도당대사 및 에너지 항상성과 관련된 유전자를 조절하는 transcription factor로 알려져 있으며  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$ ,  $\gamma$ 의 세 종류가 있는데 각기 다른 유전자에 의해 발현되고 다른 생물학적 기능을 가진다. PPAR은 ligand에 의해 활성화된 후 RXR과 heterodimer를 이루며 다음 단계에서 표적유전자의 promoter인 PPRE (PPAR response element)에 결합함으로써 target gene들의 전사를 증가시킨다. PPAR $\alpha$ 는 지방산의 분해 작용이 활발한 조직에서 발현되며 지질 및 지단백질 대사에 관여하는 유전자를 조절한다. PPAR $\alpha$ 의 target gene 들은 지방산 유입을 촉진하고 유입된 지방산을 acyl-CoA ester로 활성화시키며 지방산 산화 관련 유전자들을 조절하고, 지단백질의 합성과 운반을 조절한다(Mattern 등, 2007).

Catalase는 과산화수소가 분해되어 물과 산소가 만들어지는 반응을 촉매하는 효소이다(Beckman 등, 1986). Transcription factor TFII-I는 기초 전사 제어 인자이며 최근의 발표된 바에 의하면 TFII-I가 여러 가지 세포 외 신호에 의해서 활성화 될 때, 선택적으로 유전자 발현을 조절하는 유도성 다기능 인자 역할을 한다(Roy 등, 1991; Roy 등, 2001). Insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGFBP-3)은 인슐린 성장 인자 (IGF-I와 II)의 작용을 운반하고 조절한다. IGFBP-3은 IGF-I를 원형질막리셉터에 보내는 것에 의해서 IGF-I의 효과를 향상시키고, 리셉터와의 결합을 통해 IGF-I 활동을 저

해 한다(Jones 등, 1995; DeMellow와 Baxter, 1988). 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP)는 arachidonic acid 대사의 5-lipoxygenase (5-LO) pathway를 거쳐 leukotriene을 생산한다(Bäck 등, 2007). Cyclin D2는 cyclin-dependent kinases (CDK)와 활동성 복합체를 이루며(Ewen 등, 1993; Higashi 등, 1996), 조직 특이 전사 제어 인자(에스트로겐 리셉터, 안드로겐 리셉터, 갑상선의 리셉터와 retinoic acid receptor- $\alpha$ )와 서로 작용한다(Coqueret, 2002; Lamb 등, 2003). Carnitine palmitoyltransferase I (CPT1)는 미토콘드리아 효소로서 미토콘드리아 외부의 막과 연관되어있다. CPT1는 카르니틴과 결합하여 막 전체에 long chain fatty acids 의 수송을 조절한다. 이 효소는 malonyl CoA에 의해서 저해된다(Esser 등, 1993).

#### IV. 요약

본 연구는 retinoic acid (RA)가 돼지지방전구세포의 분화와 유전자 발현에 미치는 영향을 구명하기 위해서 수행하였다. 지방전구세포는 갓난 돼지의 등지방에서 분리했으며 RA는 배양중인 세포에 4일 동안 처리하였다. 배양중인 세포에서 RNA를 추출한 후 14,688개의 유전자가 부착되어 있는 cDNA microarray와 혼성화하여 유전자 발현 양상을 분석하였다. 지방전구세포의 분화는 GPDH의 활성도에 의해 측정했다. RA는 돼지지방전구세포의 분화를 78% 억제했다. Retinoic acid 처리에 의해 지질 대사에 관계된 유전자를 포함하여 특히 sphingomyelin phosphodiesterase, apolipoprotein R precursor, growth factor receptor-bound protein 14, retinoic receptor RXR gamma의 발현이 증가되었다. 그리고 세포 성장에 중요 역할을 하는 vascular endothelial growth factor D precursor, growth hormone receptor precursor의 유전자의 발현이 감소되었다. 이러한 결과는, RA가 성장 촉진인자 또는 성장호르몬 수용체의 조절을 통해서 돼지 지방전구세포의 분화를 억제함을 나타낸다.

## V. 사 사

이 논문은 2002년도 정부의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (R01-2002-000-00581-0).

## VI. 인 용 문 헌

1. Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K. T., Xu, S., Hobbs, H. H. and Krieger, M. 1996. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*. 271:518-520.
2. Alessenko, A. V. 2000. The role of sphingomyelin cycle metabolites in transduction of signals of cell proliferation, differentiation and death. *Membr Cell Biol*. 13:303-20.
3. Bäck, M., Sultan, A., Ovchinnikova, O. and Hansson, G. K. 2007. 5-Lipoxygenase-activating protein: a potential link between innate and adaptive immunity in atherosclerosis and adipose tissue inflammation. *Circ Res*. 100:946-49.
4. Beckman, J. S., Minor, R. L. and Jr, Freeman, B. A. 1986. Augmentation of antioxidant enzymes in vascular endothelium. *J Free Radic Biol Med*. 2(5-6):359-65.
5. Chmurzynska, A. 2006. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): Function, structure and polymorphism. *Journal of Applied Genetics*. 47:39-48.
6. Chua, J. J., Ng, M. M. and Chow, V. T. 2004. The non-structural 3 (NS3) protein of dengue virus type 2 interacts with human nuclear receptor binding protein and is associated with alterations in membrane structure. *Virus Research*. 102:151-163.
7. Coqueret, O. 2002. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene*. 299:35-55.
8. DeMellow, J. S. M. and Baxter, R. C. 1988. Growth hormone dependent insulin like growth factor (IGF) binding protein both inhibits and potentiates IGF-I stimulated DNA synthesis in human fibroblasts. *Biochem Biophys. Res Commun*. 156:199-204.
9. Duester, G. 1996. Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis. *Biochemistry*. 35(38): 12221-27.
10. Esser, V., Kuwajima, M., Britton, C. H., Krishnan, K., Foster, D. W. and McGarry, J. D. 1993. Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat liver carnitine palmitoyl-transferase I. Direct evidence that a single polypeptide is involved in inhibitor interaction and catalytic function. *J. Biol. Chem*. 268:5817-22.
11. Ewen, M. E., Sluss, H. K., Sherr, C. J., Matsushime, H., Kato, J. and Livingston, D. M. 1993. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 73: 487-497.
12. Ferrara, N. 2004. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocrine Reviews*. 25:581-611.
13. Funk, C. D., Funk, L. B., Kennedy, M. E., Pong, A. S. and Fitzgerald, G. A. 1991. Human platelet /erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J*. 5:2304-12.
14. Guo, X. and Liao, K. 2000. Analysis of gene expression profile during 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Gene*. 251:45-53.
15. Van Harmelen, V., Röhrig, K. and Hauner, H. 2004. Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism*, Vol 53: 632-37.
16. Herzig, S., Hedrick, S., Morantte, I., Koo, S. H., Galimi, F. and Montminy, M. 2003. CREB controls hepatic lipid metabolism through nuclear hormone receptor PPAR-gamma. *Nature*. 426: 190-3.
17. Higashi, H., Suzuki-Takahashi, I., Saitoh, S.,



- Segawa, K., Taya, Y., Okuyama, A., Nishimura, S. and Kitagawa, M. 1996. Cyclin-dependent kinase-2 (Cdk2) forms an inactive complex with cyclin D1 since Cdk2 associated with cyclin D1 is not phosphorylated by Cdk7-cyclin-H. *Eur. J. Biochem.* 237:460-467.
18. Hotamisligil, G. S., Johnson, R. S., Distel, R. J., Ellis, R., Papaioannou, V. E. and Spiegelman, B. M. 1996. Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science.* 274:1377-79.
19. Jones, J. I. and Clemmons, D. R. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev.* 16:3-34.
20. Kawai, Y., Moriyama, A., Asai, K., Coleman-Campbell, CM., Sumi, S., Morishita, H. and Suchi, M. 2005. Molecular characterization of histidinemia: identification of four missense mutations in the histidase gene. *Hum Genet.* 118: 531-2.
21. van der Kraan, M., Adan, R. A., Entwistle, M. L., Gispen, W. H., Burbach, J. P. and Tatro, J. B. Roger. 1998 Expression of Melanocortin-5 Receptor in Secretory Epithelia Supports a Functional Role in Exocrine and Endocrine Glands. *Endocrinology* 139:2348-2355.
22. Lamb, J., Ramaswamy, S., Ford, H. L., Contreras, B., Martinez, R. V., Kittrell, F. S., Zahnow, C. A., Patterson, N., Golub, T. R. and Ewen, M. E. 2003. A mechanism of cyclin D1 action encoded in the patterns of gene expression in human cancer. *Cell* 114:323-334.
23. Landsberg, R. L., Sero, J. E., Danielian, P. S., Yuan, T. L., Lee, E. Y. and Lees, J. A. 2003. The role of E2F4 in adipogenesis is independent of its cell cycle regulatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:2456-61.
24. Landschulz, K. T., Pathak, R. K., Rigotti, A., Krieger, M. and Hobbs, H. H. 1996. Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J. Clin. Invest.* 98:984-95.
25. Mattern, H. M., Lloyd, P. G., Sturek, M. and Hardin, C. D. 2007. Gender and genetic differences in bladder smooth muscle PPAR mRNA in a porcine model of the metabolic syndrome. *Mol Cell Biochem.* 302:43-9.
26. van Neerven, S., Kampmann, E. and Mey, J. 2008. RAR/RXR and PPAR/RXR signaling in neurological and psychiatric diseases. *Prog Neurobiol.* 85(4):433-51.
27. New, M. I. and Levine, L. S. 1984. Recent advances in 21-hydroxylase deficiency. *Annu. Rev. Med.* 35:649-63.
28. Rigotti, A., Edelman, E. R., Seifert, P., Iqbal, S. N., DeMattos, R. B., Temel, R. E., Krieger, M. and Williams, D. L. 1996 Regulation by adrenocorticotrophic hormone of the *in vivo* expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI), a high density lipoprotein receptor, in steroidogenic cells of the murine adrenal gland. *J. Biol. Chem.* 271: 33545-49.
29. Roy, A. L. 2001. Biochemistry and biology of the inducible multifunctional transcription factor TFII-I. *Gene.* 274:1-13.
30. Roy, A. L., Meisterernst, M., Pognonec, P. and Roeder, R. G. 1991. Cooperative interaction of an initiator-binding transcription initiation factor and the helix-loop-helix activator USF. *Nature.* 354: 245-248.
31. Scott, L. M., Civin, C. I., Rorth, P. and Friedman, A. D. 1992. A novel temporal expression pattern of three C/EBP family members in differentiating myelomonocytic cells. *Blood.* 80:1725-35.
32. Shaughnessy, S., Smith, E. R., Kodukula, S., Storch, J. and Fried, S. K. 2000. Adipocyte metabolism in adipocyte fatty acid binding protein knockout mice (aP2<sup>-/-</sup>) after short-term high-fat feeding: functional compensation by the keratinocyte [correction of keratinocyte] fatty acid binding protein. *Diabetes.* 49:904-11.

33. Simons, P. J., van den Pangaart, P. S., van Roomen, C. P. A. A., Aerts, J. M. F. G. and Boon, L. 2005. Cytokine-mediated modulation of leptin and adiponectin secretion during *in vitro* adipogenesis: Evidence that tumor necrosis factor- $\alpha$ - and interleukin-1 $\beta$ -treated human preadipocytes are potent leptin producers. *Cytokine*. 32(2):94-103(10).
34. Stone, R. L. and Bernlohr, D. A. 1990. The molecular basis for inhibition of adipose conversion of murine 3T3-L1 cells by retinoic acid *Differentiation* 45:119-27.
35. Suryawan, A. and Hu, C. Y. 1997, Effect of retinoic acid on differentiation of cultured pig preadipocytes, *J. Anim. Sci* 75:112-17.
36. Torii, S., Matsui, T. and Yano, H. 1996. Development of intramuscular fat in Wagyu beef cattle depends on adiogenic of antiadipogenic substances present in serum. *Anim. Sci.*63:73-78.
37. Vikman, K., Carlsson, B., Billig, H. and Eden, S. 1991. Expression and regulation of growth hormone (GH) receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) in rat adipose tissue, adipocytes, and adipocyte precursor cells: GH regulation of GH receptor mRN. *Endocrinology*. 129:1155-61.
38. Wise, L. S. and Green, H. 1979. Participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate in adipose conversion of 3T3 cell. *J. Biol. Chem.* 254:274-275.
39. Xue, J. C., Schwarz, E. J., Chawia, A. and Lazar, M. A. 1996. Distinct stages in adipogenesis revealed by retinoid inhibition of differentiation after induction of PPAR gamma *Mol Cell Biol* 16:1567-75.
40. Yagi, K., Kondo, D., Okazaki, Y. and Kano, K. 2004. A novel preadipocyte cell line established from mouse adult mature adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 321: 967-74.
- (접수일자 : 2008. 7. 22. / 수정일자 : 2008. 8. 13. / 채택일자 : 2008. 8. 20.)