

Conjugated Linoleic Acid 이성체가 3T3-L1 지방전구세포 분화중 세포증식, 세포사멸 및 Ucp 유전자 발현에 미치는 영향*

권 소 영 · 강 금 지[§]

덕성여자대학교 자연과학대학 식품영양학과

The Effect of Conjugated Linoleic Acid Isomers on the Cell Proliferation, Apoptosis and Expressions of Uncoupling Protein (Ucp) Genes during Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes*

Kwon, So-Young · Kang, Keum-Jee[§]

Department of Food and Nutrition, DukSung Women's University, Seoul 132-714, Korea

ABSTRACT

It has been reported that CLA decreases fat deposition in vivo and in vitro experiments. Among CLA isomers, c9t11 and t10c12 have been shown to exert active biological activities. For example, t10c12 reduces body weight and increases lean body mass, whereas, c9t11 has little effect on body fatness. However, the underlying molecular mechanism for the anti-obesity action of CLA isomers are not well understood. The purpose of this study was to examine the effects of t10c12 and c9t11 on lipid accumulation, cell proliferation, cell death and the expression levels of Ucp genes which are proposed as targets for anti-obesity in 3T3-L1 preadipocytes. Isomers of CLA at 50 μM were added into preadipocyte differentiation medium for 3, 6 and 9 days. Control cells received only the vehicle in the differentiation medium. Cytochemical analyses for lipid accumulation, cell proliferation and apoptosis were carried out to compare lipidogenesis and cellular activity. RT-PCR analysis of GAPDH, Ucp 2, 3 and 4 were also performed to find any modulatory effects of CLA isomers on the metabolic genes. Lipid accumulation indicated by Oil Red-O staining was inhibited in CLA isomers as compared to the control. T10c12 isomer showed less lipidogenesis than c9t11 did. A decrease occurred in CLA isomers as shown by BrdU incorporation. Apoptosis has occurred at higher level in t10c12 when compared to that of t9c11. Ucp 2, 3 and 4 genes were also upregulated in CLA isomers. T10c12 showed higher level of Ucp gene expressions than the c9t11 did. The biological activities of CLA isomers were also found to be different during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, suggesting that different isomers may be active in certain stage of lipidogenesis. The results indicate that both c9t11 and t10c12 CLA isomers decrease lipidogenesis, inhibit cell proliferation, increase cell death and upregulate in Ucp gene expressions during 3T3-L1 preadipocyte differentiation. T10c12 isomer was more effective than c9t11 in overall anti-obesity activity. (*Korean J Nutrition* 37 (7): 533~539, 2004)

KEY WORDS : CLA isomers, 3T3-L1 preadipocytes, differentiation, apoptosis, Ucp gene expressions.

서 론

CLA는 linolate (cis9 cis12-octadecadienonate)의 위치 및 기하학적 이성체를 총칭한다. 이중 결합의 위치와 cis 또는 trans 형에 따라 많은 이성체가 존재하는데 cis-9,

trans-11 (c9t11)와 trans-10, cis12 (t10c12) isomer가 생리활성이 높은 것으로 알려졌다.¹⁻⁴⁾ 반추위에 서식하는 *B.fibrisolvens*는 linoleic acid로부터 cis-9, trans-11 CLA를 생성하고 화학적으로는 linoleic acid로부터 trans-10, cis-12 CLA가 생성된다. 따라서 CLA는 반추위 동물에서 유래한 고기 (쇠고기등)와 낙농제품 (예 : 우유와 치즈)에 많이 함유되어 있다.⁵⁾ CLA의 알려진 생리활성 중에 CLA가 체지방을 감소시키는 기전으로는 지방전구세포의 분화와 증식의 감소, 지방산과 중성지방의 합성 감소 및 에너지 이용, 지방분해 및 지방산 산화의 증가로 알려졌다.⁶⁻¹⁹⁾ 특히 CLA의 주요 이성체인 t10c12는 체지방을 감소시키고

접수일 : 2004년 6월 7일

채택일 : 2004년 8월 23일

*This research was supported by a research grant from the Natural Science Research Center, DukSung Women's University in 2003.

[§]To whom correspondence should be addressed.

체단백질을 증가시키나,^{10-12,18,19)} c9t11의 체지방 감소효과는 아주 작다고 한다.¹¹⁾

비만과 관계가 있다고 알려진 Uncoupling protein (Ucp)은 proton 농도 기울기를 분산시키는 능력을 갖고 있는 미토콘드리아의 수송체로서 열을 생산한다.^{20,21)} Ucp 중에서 특히 Ucp 2가 체중조절에 관계한다고 한다.²¹⁾ 생쥐에게 CLA를 1%수준으로 먹었을 때 지방조직은 감소하고 Ucp2의 발현이 증가되었다는 보고가 있고,¹⁷⁾ Rodriguez 등²²⁾의 연구에 의하면 t10c12는 흰색과 갈색지방조직에서 Ucp2의 발현을 증가시키고, 지방의 열전도 능력을 향상시켜 체중을 감소시키나, c9t11는 지방 합성을 감소시킨다고 보고하였다. 그러나 West 등²³⁾의 연구에서는 생쥐에게 고지방 식이를 먹었을 때 체중은 감소되었으나 Ucp2의 발현에는 영향을 미치지 않는다고 보고하였다.

Ucps가 과발현 되면 세포 내의 ATP 감소를 가져오고, 이는 세포사멸의 원인이 된다고 보고되었다.^{21,24)} Tsuboyama-Kassoka의 보고⁷⁾에 의하면 생쥐에게 1% (wt/wt) CLA를 먹었을 때 체지방 감소는 세포사멸이 원인이라고 보고하고, 이는 Ucp2 발현이 증가하고, 이어서 TNF- α 를 증가시켜, 세포사멸을 일으킨다고 하였다.

지금까지 CLA의 혼합물에 의한 체지방 감소 효과에 관한 연구는 많이 이루어졌으나 CLA isomer 중 c9t11과 t10c12의 체지방 감소 효과를 분자생물학적인 측면에서 비교한 연구는 미비한 편이다. 그러므로 본 연구에서는 3T3-L1 지방전구세포에 CLA isomers (c9t11, t10c12)를 첨가하여 3, 6, 9일간 배양하여 세포 분화, 증식, 세포사멸과 Ucps의 유전자 발현을 경시적으로 분석하여 isomer 종류에 따른 체지방 감소 효과를 3T3-L1 전구세포의 분화 중 결정함으로써 지방축적에 대한 억제효과의 원인을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시 약

CLA의 두 이성체인 c9t11과 t10c12 isomer는 Nu Check (Elysian, MN U.S.A., 순도 98%)으로부터 구입하였으며 다른 시약의 구입처는 각각 아래에 표시하였다.

2. 3T3-L1세포배양과 분화유도

세포 배양과 분화 유도하기 위한 처리 및 분석은 Fig. 1과 같이 수행하였다. 시료의 농도는 예비실험에서 각각 군의 지방산의 농도를 결정하기 위하여 9일동안 CLA를 처리하였을 때 세포가 CLA첨가에 의해 독성으로 피사하지 않고 세포가 분화, 증식, 예정된 세포사멸 (apoptosis)을 할 수 있

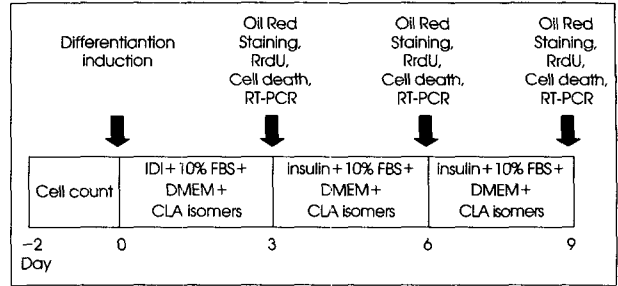


Fig. 1. A schematic diagram showing time schedule for cell differentiation and assays for lipid accumulation, cell proliferation, cell death and gene expression. 3T3-L1 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA) containing 10% fetal bovine serum (FBS; PAA, Exton PA, USA) for appropriate intervals depending on culture periods. 50 μ M of CLA isomers were added at the beginning of cell culture in the presence of insulin, dexamethasone and IBMX (IDI) for 3 days, and then only with insulin for the rest of cell culture. Some of the cells were plated on gelatin-coated coverslips to ease subsequent procedures for the analyses of lipid accumulation, cell proliferation and death. Abbreviations: BrdU: Bromodeoxy uridine DMEM; Dulbecco's modified eagles medium FBS; Fetal bovine serum, IBMX; 1-me-thyl-3-isobutylxanthine, IDI; Insulin + dexamethason + IBMX. RT-PCR; Reverse transcript polymerase chain reaction.

는 농도인 50 μ M c9t11, 50 μ M t10c12 CLA로 하였다. 3T3-L1 세포 (한국세포주 은행)에 10% fetal bovine serum (FBS; PAA, Exton PA, U. S. A.)을 넣은 Dulbecco's modified Eagle's medium (GibcoBRL, Grand Island, NY U. S. A.)으로 배양하고, 세포가 confluent하게 자라기 시작하면 1.7 μ M insulin (Sigma), 1 μ M dexamethasone (Sigma), 500 M isobuthylmethylxanthine (IBMX, Sigma)을 첨가하여 지방세포분화를 유도하였다. 세포 분화 후 각각 3, 6, 9일간 분화 시키면서 분화 중인 세포에서 지방축적, 세포 증식과 세포 사멸을 관찰하기 위해 gelatin-coated coverslip 위에 3T3-L1세포를 부착하여 현미경적 분석을 용이하게 하였다.

3. Oil Red-O 염색

지방적 (lipid droplets)의 지방에 특이적으로 반응하는 Oil Red-O 염색법을 수행하여 축적 중인 지방산을 분석하였다. 3T3-L1 세포배양 중 각각 3, 6, 9일에, 배양액 성분을 완전히 제거하기 위하여 phosphate buffered saline (PBS pH7.2)로 3번 세정하고 그 후 4% p-formaldehyde 용액으로 20분간 세포를 고정 하였다. Absolute ethanol에 1.8 mg/ml농도의 Oil Red-O용액을 준비 한 후 약 12시간 동안 염색하고 PBS에 남아있는 염기성분을 제거하기 위하여 증류수로 30분간 세정하고, 100 μ g/ml propidium iodide (PI, Sigma)로 10분간 핵을 염색하였다. 염색된 세포는 다시 0.05% PBS-Tween 20 (PBT)로 10분간 3회 세정하

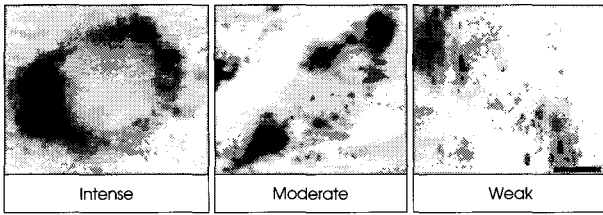


Fig. 2. The intensity and distribution of the lipid accumulation in differentiating 3T3-L1 preadipocytes were arbitrarily determined as intense, moderate or weak staining. Magnification = 400×. Scale bar = 10 μm.

여 glass slide에 antifading solution으로 p-phenylene-diamine 용액으로 처리한 후 coverslip으로 덮고 현미경 분석에 이용하였다. c9t11, t10c12, 대조군 별로 3반복 실험하여 Oil Red-O 염색된 정도에 따라 강한 염색 (intensive staining), 중간 정도 염색 (moderate staining), 및 약한 염색 (weak staining)으로 세포염색 정도를 각각 분류하였다 (Fig. 2). 각 군 당 세포 수를 반복 당 300개 이상 세포를 분석하여 총 세포 수에 대한 각 염색정도를 보이는 세포비율 (%)을 결정하고 그 각각의 값을 통계처리 ($p < 0.05$) 하여 평균치 (mean ± S.D.)를 그래프로 표현하였다.

4. Bromodeoxyuridine (BrdU)을 이용한 세포증식 분석

지방전구세포 증식정도를 보여주기 위하여 BrdU를 배양액에 첨가하여 증식세포를 표지하고, BrdU가 표지된 세포를 PBS에 10% normal goat serum (NGS)가 첨가된 시약에 고정된 세포를 1시간 동안 상온에서 incubation하여 비특이적 항체반응을 억제하였다. Anti-BrdU 항체로 1차 배양, 세정한 후, goat anti-mouse Ig conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC, Sigma; 1 : 200 희석)로 표지하여 시각화 하였다. 핵 염색을 100 μg/ml propidium iodide (PI, Sigma)로 10분간 수행한 후, 준비된 세포는 Oil-Red O와 유사하게 glass slide에 mounting하여 형광 현미경을 통하여 관찰하였다.

5. 4, 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) 염색에 의한 세포포도 분석

각 배양중인 세포를 상기한대로 각각 고정한 후 4 μg/ml의 DAPI (Sigma)로 10분간 핵 염색을 실시하였다. 염색된 세포는 Oil-Red O와 유사한 방법으로 분석하였다.

6. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

체의 배양 중인 3T3-L1 지방전구세포의 지방대사에 관여하는 유전자를 관찰하기 위하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA내에서 유전자 발현을 분석하기 위하여 표준

방법²⁵⁾에 따라 역전사 반응을 실시하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 template 하여 각각의 유전자 산물을 증폭하였다 (PCR), PCR의 총 부피는 25 μl이고 1 μl의 RT 산물, 2.5 μl의 10X buffer, 2 μl의 2.5 mM dNTP, 1.5 μl의 25 mM MgCl₂, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH), Ucp2, 3, 4의 primer 쌍은 Kang 등²⁶⁾에 보고한 대로 20 μM의 forward와 reverse primer pair (Bio-Rad, Hercules, Ca, U. S. A.)를 각각 1 μl씩 넣어주고 0.1 μl의 Taq DNA polymerase (Promega)를 넣어준 후 total volume 25 μl에 맞추기 위해서 멸균증류수를 첨가하였다. Denaturation 반응은 94°C에서 5분 동안 시켰다. 그리고 94°C에서 30초, 55, 59°C (Primer마다 annealing온도가 다르다)에서 1분, 72°C에서 1분 30초 동안 35cycles을 반응시킨 후, 72°C에서 10분 동안 post-extension 시켰다.

7. DNA agarose gel 전기영동 및 유전자 산물 정량

PCR 산물을 1.0% agarose (BMA, U. S. A. cat No. 50004) gel (1X Tris-acetate-EDTA buffer, 1.0% agar, 1 mg/ml ethidium bromide)에서 30분 동안 70 voltage에서 전기영동을 한 후, image analyzer로 기록하고 TINA 20 image program을 이용하여 GAPDH에 대한 상대적인 Ucp2, Ucp3, Ucp4 양의 비율 (%)을 결정 한 후 평균치 (mean ± S.D.)의 정도를 정량화 하였다.

8. 통계분석

모든 data는 평균 및 표준편차를 계산하였고 비교군 들 간의 유의성 검증은 SAS program을 이용하여 ANOVA test를 한 후 multiple's range test로 하였다.

결과 및 고찰

1. 세포분화 배양 중 CLA의 지방축적 효과

지방세포 분화를 상기한 바와 같이 분화 유도를 시킨 후 3, 6, 9일에 Oil Red-O로 지방축적을 세포 화학적으로 염색, 분석한 결과, 보면 각 단계의 지방 막성포 (vesicle)에 적색 염색을 보이는 정도에 따라 초기분화, 중기분화, 말기분화 등으로 개략적으로 관찰 할 수 있으며 (미발표 결과). 이와 같은 분화정도에 의하여 첨가 물질인 c9t11과 t10c12의 효과를 분석하였다. McNeel와 Mersmann¹²⁾의 보고에 의하면 Oil Red-O로 염색 하게 되면 중성지방, cholesterol ester만이 염색이 되고, 그 외 유리지방산, 인지질은 염색이 되지 않는다고 하였다. 지방소적의 축적된 부분은 대부분이 중성지방이기 때문에 염색이 가능하다. 따라서 본 실험의

Table 1. The effect of CLA on lipid accumulation in 3T3-L1 cells undergoing adipocyte differentiation in the 3, 6 and 9th day¹⁾

Group	Proportions (%) of cells showing the following staining intensities during cell differentiation at								
	Day 3			Day 6			Day 9		
	Intense	Moderate	Weak	Intense	Moderate	Weak	Intense	Moderate	Weak
Control	94.83 ± 2.03 ^{2b)}	3.26 ± 1.27 ^a	1.94 ± 0.76 ^a	94.76 ± 0.04 ^a	2.24 ± 0.03 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	96.55 ± 2.22 ^a	3.45 ± 2.22 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
c9t11 CLA	32.26 ± 0.19 ^b	65.63 ± 0.04 ^b	2.12 ± 0.14 ^{ab}	25.83 ± 0.19 ^b	71.70 ± 0.23 ^b	2.48 ± 0.41 ^b	39.23 ± 0.40 ^b	60.77 ± 0.39 ^b	0.00 ± 0.00 ^b
t10c12 CLA	40.74 ± 2.40 ^c	55.08 ± 2.53 ^c	4.19 ± 0.12 ^b	44.69 ± 0.98 ^c	48.32 ± 1.06 ^c	6.99 ± 0.12 ^c	26.08 ± 0.44 ^c	71.91 ± 0.2 ^c	2.00 ± 0.18 ^c

¹⁾ Number of cells scored were 900–1500 in an experiment of three replicates. The values were presented as means ± S.D.

²⁾ The values with different superscripts within same column are significantly different at $p < 0.05$ level.

조건하에서 3T3-L1 지방전구세포가 분화유도 물질에 의하여 지방세포로의 분화가 일어남을 확인하였다. 세포 분화 배양 중 Oil Red O로 염색하여 지방축적 및 지방세포 분화 정도를 확인하기 위하여 각각 3, 6, 9일에 Oil Red-O 염색된 정도에 따라 강한 염색 (intensive staining), 중간 정도 염색 (moderate staining), 및 약한 염색 (weak staining) 으로 분류 (Fig. 2) 한 후 각 군 당 세포 수의 비율 (%)을 보면 Table 1과 같다.

대조군, c9t11와 t10c12군을 비교했을 때 3일째 되는 시기에는 완전히 분화된 세포는 대조군이 CLA isomers군 보다 많지만 분화가 일어나는 중인 세포는 대조군보다 CLA isomers군이 유의적으로 더 많았다. 특히 c9t11군이 t10c12군보다 유의적으로 많았다. 특히 6일째 되는 시기에는 대조군에 비해 완전히 분화된 세포가 CLA isomers군이 적은 것을 확인하였고, 분화중인 세포는 대조군보다 오히려 CLA isomers군에서 더 유의적으로 많았다. 따라서 CLA isomers군에서 완전히 분화된 세포를 기준으로 보았을 때, 대조군보다 분화 정도가 적은 것으로 보아 CLA isomer는 세포 분화를 억제해 주는 역할을 한 것으로 추정된다. 9일째에는 완전 분화된 세포는 대조군이 c9t11, t10c12보다 유의적으로 많았고, t10c12군은 c9t11군보다 유의적으로 적었다. 그러나 세포분화 중인 세포들 간에는 대조군에 비해 CLA isomers군에서 세포의 분화가 증가되었다. 특히 대조군에 비하여 분화된 세포는 c9t11군에서 많이 발견되었으며 미분화 세포는 t10c12군에서 가장 많은 것을 확인하였다. 분화된 세포는 t10c12군이 9일째에서 감소하는 경향을 나타냈다.

Satory 등¹⁵⁾은 CLA를 1~6 μM 을 주었을 때 3T3-L1 지방전구세포의 증식을 억제하였으나 PPAR γ 2의 활성화를 통하여 세포 분화를 촉진시킨다고 보고하였다. 그러나 Brodie 등¹⁶⁾의 연구 결과에 의하면 CLA를 25~100 μM 을 농도를 달리하여 각기 주었을 때 CLA를 주는 양에 따라 3T3-L1 지방전구세포의 증식을 억제했고 PPAR γ 2와 C/EBP α 와 aP2는 대조군에 비해 감소되었는데, 이는 지방

전구세포의 분화를 억제하는 것으로 사료된다고 보고 하였다. 여러 연구들^{18,19)}에 의하면 t10c12는 지방전구 세포의 증식과 분화를 억제하나, 영향을 미치는 정도는 t10c12를 주는 양에 따라 다르다고 보고하였다.

연구자에 따라 결과가 다른 이유는 명확히 설명할 수는 없으나 CLA제조 시 CLA이성체의 배합과 이성체의 양이 다르기 때문으로 생각할 수 있다. Han¹¹⁾의 연구에 의하면 20 μM t10c12를 각각 -6일부터 0일, 0일부터 8일, -6일부터 8일까지 처리 했을 때, 분화유도 후 0일부터 8일까지와 배양 전 기간 -6일부터 8일까지 세포의 분화가 억제되었다. 또한, 50 μM CLA를 처리 했을 때, t10c12와 CLA mixture는 분화를 억제시켰지만, c9t11는 분화를 촉진시켰고, 50 μM 여러 CLA 이성체를 pre-confluent 시기 (-6일부터 2일까지)에 처리했을 때, 세포수를 감소시켰으며 CLA의 이성체 중에서 t10c12는 3T3-L1 지방전구세포의 분화를 억제하였으나 다른 이성체의 작용은 확실치 않다고 보고하였다. 본 연구에서는 분화초기에 c9t11의 분화 억제가 t10c12 보다 더 되었으나 말기에는 t10c12의 억제가 더 컸다.

2. CLA의 시기 별 세포증식 효과

3T3-L1 지방전구세포 증식 정도를 시각화하기 위하여 DNA 합성시 BrdU를 첨가하여 새로 합성되는 DNA에 incorporation 되게 하고, 첨가된 BrdU에 의해 세포증식을 분석하여 CLA isomers와 첨가 기간별의 차이를 보았다 (Fig. 3). 3일째에는 t10c12군이 c9t11군보다 유의적으로 증식이 많이 일어났다. 그러나 6일 동안 세포 증식이 일어난 세포는 대조군에 비해 c9t11군과 t10c12군이 적은 것을 볼 수 있었고, isomers군에서는 t10c12군이 c9t11군보다 유의적으로 적었다. 9일째에는 이미 세포 증식이 끝나 더 이상의 증식은 어느 처리군에서도 일어나지 않았다. 즉, c9t11과 t10c12는 세포의 증식을 억제시켜 주었으며 초기에는 c9t11가 증식을 더 억제하였고, 말기에는 t10c12가 증식을 더 억

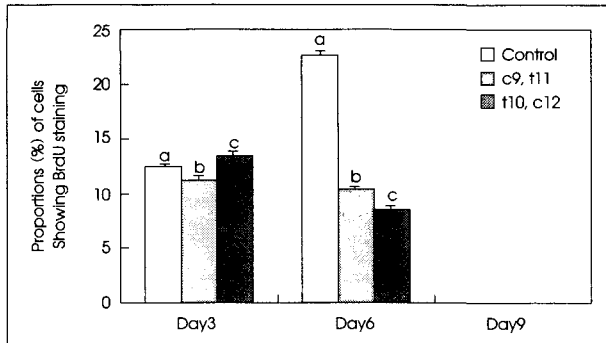


Fig. 3. The time-course effect of CLA on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes undergoing adipogenesis. BrdU-positive cells were quantitated to determine the effect of CLA on 3T3-L1 cell proliferation. No cell proliferation was found at day 9 as evidenced by BRDU incorporation. The values with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ level.

제하였다. Park 등⁸⁾과 Evans 등⁹⁾도 t10c12와 CLA mixture가 세포 증식 동안 세포수를 감소시켰다고 보고하였는데 본 실험에서도 t10c12가 세포증식을 억제하는 것으로 나타났다. Brown 등²⁷⁾의 실험에서는 c9t11은 세포의 분화와 증식에 효과가 없다고 하였으나 본 실험에서는 효과가 있는 것으로 나타났다.

3. CLA의 시기별 세포사멸 효과

우리 몸을 구성하고 있는 세포는 조직의 항상성을 유지하기 위하여 세포 분열과 사멸을 조절하게 된다. 이러한 세포의 능동적인 죽음을 세포 예정사 (programmed cell death) 또는 세포 사멸 (apoptosis)이라고 하며 세포의 수축, 핵단백질의 응축, DNA 손상이 일어나는 특징을 가지고 있다고 한다.²⁸⁾ 세포사멸 현상의 하나로 알려져 있는 염색질농축 (pycnotic chromatin) 현상이 일어나는 세포를 각각 3, 6, 9 일 동안 실험을 통하여 관찰하였다 (Fig. 4). 본 실험 결과 3, 6, 9일 실험 기간동안 c9t11군과 t10c12군이 대조군에 비해 세포 사멸이 증가되는 것을 보였다. 특히 t10c12군이 c9t11군보다 유의적으로 세포사멸이 많은 것을 볼 수 있었다.

CLA는 세포사멸을 유도한다고 보고되었다. C57Bl/6J 생쥐에게 semipurified diet에 (10% fat of total energy) 1% CLA를 먹었을 때 7일 후에 지방의 총무게 감소가 일어났으며, 세포사멸분석에 의해 사멸세포가 증가함이 보고되었다.⁷⁾ 또한 3T3-L1 지방세포에 t10c12를 첨가하였을 때 혈청중성지방은 감소되었고 세포사멸은 증가하였다는 보고도 있다.²⁷⁾ 사멸이 많이 일어날수록 전체의 지방 증가는 억제 된다는 것을 알 수 있었다. 이는 곧 CLA가 지방세포에 분화와 증식을 억제하는데 특히 본 실험 결과에서도 c9t11 보다는 t10c12가 분화, 증식과 세포사멸의 효과가 큰 것으

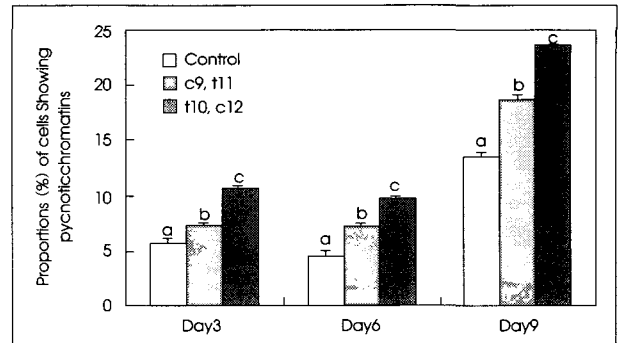


Fig. 4. The time-course effect of CLA on cell death of 3T3-L1 preadipocytes undergoing adipogenesis. apoptosis shown by DAPI staining in 3T3-L1 preadipocytes during differentiation induction. Quantitation of apoptotic cells during 3T3-L1 preadipocyte differentiation. The values with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ level.

로 나타났다.

4. Ucp의 시기별 유전자 발현

CLA는 Ucp의 발현을 증가시켜 에너지 소비를 많이 하여 체지방 감소 시킨다는 보고²⁹⁾가 있고, 특히 t10c12가 Ucp 발현을 증가시키나,^{27,29,30)} c9t11은 Ucp 발현에 영향을 주지 않는다고 보고되었다.³⁰⁾ Ucp2는 갈색지방조직, 골격 근육 조직 및 면역조직 등에 존재하며, Ucp3는 주로 골격근에 존재하고, Ucp4는 신경, 뇌 조직에 특이적으로 발현되고 있다고 알려져 있다.³¹⁾ Ucp2와 3는 미토콘드리아로부터 uncouple ATP를 생산하며 에너지 소비가 많아지면 증가하는 유전자이다.^{20,21)} 이는 특이적인 Ucp isomers 들이 서로 다른 조직에서 에너지 분산에 작용하고 있다는 것을 암시한다.

3, 6, 9일 동안 대조군, c9t11와, t10c12를 처리하여 배양시킨 세포에서 mRNA를 분리하여 RT-PCR한 결과를 agarose gel에 전기영동을 통해 영상기록한 후, 정량적으로 GAPDH에 대한 값으로 표현한 결과 (Fig. 5)를 보면 3가지 유전자 모두 대조군에 비하여 c9t11군과 t10c12군이 높은 것으로 보아 지방세포가 에너지로 쓰이는 것을 증가시켜주는 것을 확인하였다. Ucp2는 3일째에는 대조군에 비해 c9t11군과 t10c12군이 낮은 발현을 보였다. 6일째에는 c9t11군이 대조군에 비해 높았으나 t10c12군에 비하여는 낮은 발현 양을 보였다. 9일째에는 CLA isomers군이 대조군보다 높았으며, t10c12군이 c9t11군보다 높은 발현양을 보였다.

Ucp3는 3일째에는 대조군에 비해 c9t11군이 낮았으나, t10c12군과 대조군은 비슷하였다. 6, 9일째에는 대조군에 비해 CLA isomers군에서 높은 발현을 보였으며, t10c12군이 c9t11군보다 높은 전사물을 생산함을 보였다. 따라서 Ucp2, 3는 CLA isomer에 의해 발현이 지방세포분화 증기,

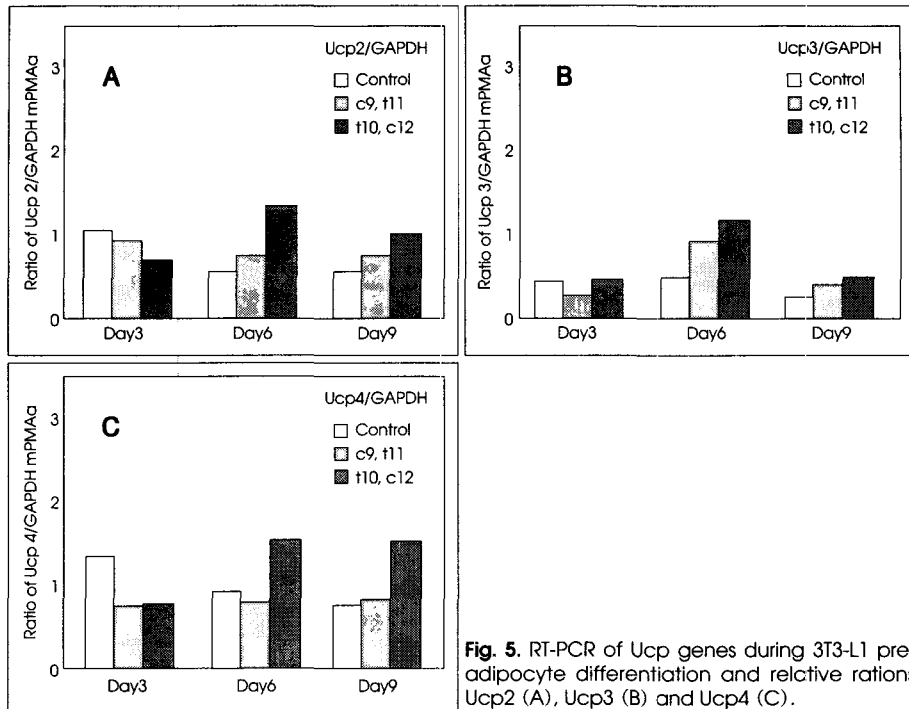


Fig. 5. RT-PCR of Ucp genes during 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation and relative ratios Ucp2 (A), Ucp3 (B) and Ucp4 (C).

후기로 갈수록 증가시키는 효과를 가져와 Ucp 단백질을 생성하여 에너지를 생산하는데 쓰임으로써 지방세포내의 지방 소모를 촉진시키는 역할을 한 것으로 추정된다. t1012가 c9t11보다 이같은 에너지 소모효과를 더 발휘하는 것으로 해석될 수 있을 것이다.

Ucp4는 3일째에는 대조군에 비해 CLA isomers군들에서 발현이 적게 되었으나, 6, 9일째에는 Ucp3의 발현에서와 마찬가지로 t10c12군이 c9t11군보다 높은 발현 양을 보였다. c9t11은 지방 세포 분화, 증식과 Ucp 발현에 영향을 주지 않는다고 보고되었으나³⁰⁾ 본 실험에서는 첫째, 기본적으로 CLA isomers는 지방세포 분화가 중기, 말기로 진행되면서 지방소모를 촉진시키고, 둘째, t10c12의 에너지 소모효과가 c9t11보다 큰 것으로 나타났다. Ucp의 발현과 세포사멸은 양의 상관관계 있다고 보고되었는데,^{7,21,24)} 본 실험 결과에서 Ucp 발현이 많은 t10c12가 c9t11보다 세포사멸이 유의적으로 높아 다른 연구자들의 실험 결과와 일치함을 보였다. CLA isomer 처리에 의해 세포증식의 억제, 세포사멸의 증가 효과 외에도 지방세포 분화 중기부터 분화 말기까지 축적되는 지방의 연소를 증진시키는 효과로 인하여 기 보고된 생체 내에서의 체지방 감소, in vitro에서의 지방세포분화 억제의 다각적인 작용에 의하여 최종적으로 CLA 처리 동물에서의 체중감소 효과를 얻은 것으로 그 작용 기전을 이해할 수 있을 것이다.

요약 및 결론

본 연구에서는 3T3-L1 지방전구세포에 50 μM CLA c9t11, 50 μM CLA t10c12, negative control을 처리하여 각각 3, 6, 9일 동안 세포배양을 하여 지방의 축적, 세포 증식과 사멸 및 Ucp 2, 3, 4 유전자 발현 분석을 하였다.

분화는 분화초기에는 c9t11가 t10c12보다 분화 억제가 더 되었으나 말기에는 t10c12의 억제가 더 컸다. c9t11, t10c12는 세포의 증식을 억제시켰으며 초기에는 c9t11의 억제 효과가 컸으나, 말기에는 t10c12가 c9t11보다 증식을 더 많이 억제하였다. c9t11과 t10c12가 대조군에 비해 세포 사멸이 증가되었다. 특히 t10c12가 c9t11보다 유의적으로 세포사멸이 많은 것을 볼 수 있었다. Ucp2, 3, 4의 발현은 t10c12가 c9t11보다 더 많이 발현하는 것을 볼 수 있었다. 결론적으로 c9t11과 t10c12는 대조군에 비해 지방 세포 증식, 지방 축적을 억제하고 세포사멸을 증가시켜 결국 지방으로 완전히 분화되는 기전을 억제하였으며 Ucps의 발현을 증가시켜 지방 억제의 효과를 보였다. c9t11와 t10c12를 비교하였을때는 t10c12가 지방 억제에 더 효과가 있는 것으로 나타났으며 특히 분화 중기부터 효과가 있는 것으로 나타났다. 다음의 연구에서는 northern blot (보다 많은 세포수가 필요) 및 항체가 이용 가능하면 단백질을 발현을 동

시에 분석하여 재확인하는 실험이 진행되어야 한다고 사료된다.

Literature cited

- 1) Pariza MW, Park YH, Cook ME. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lipid Res* 40: 283-298, 2001
- 2) Evans ME, Brown JM, McIntosh MK. Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism. *J Nutr Biochem* 13 (9) : 508-516, 2002
- 3) Pariza MW, Park YH, Cook ME. Mechanism of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. *Proc Soc Exp Biol Med* 223: 8-13, 2000
- 4) Belury MA. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annu Rev Nutr* 22: 505-531, 2002
- 5) Haumann BF. Conjugated linoleic acid. *Inform* 7(2) : 152-159, 1996
- 6) Delany JP, West DB. Changes in body composition with conjugated linoleic acid. *Am Coll Nutr* 19 (4) : 487s-493s, 2000
- 7) Tsuboyama-Kassoka N, Takahashi M, Tanemura K, Kim HJ, Tange T, Okuyama H, Kasai M, Ikemoto S, Ezaki O. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes* 49: 1534-1542, 2000
- 8) Park YH, Storkson JM, Albright KJ, Liy W, Pariza MW. Evidence that the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids* 34 (3) : 235-241, 1999
- 9) Evans M, Geigerman C, Cook J, Curtis L, Kuebler B, McIntosh M. Conjugated linoleic acid suppresses triglyceride accumulation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. *Lipids* 35: 899-910, 2000
- 10) Evans M, Lin X, Odle J, McIntosh M. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid increases fatty acid oxidation in 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutr* 132: 450-455, 2002
- 11) Han SA. Effects of conjugated linoleic acid (CLA) on 3T3-L1 preadipocyte differentiation. Master thesis, *Chungbuk National Univ*, 2003
- 12) McNeel RL, Mersmann HJ. Effects of isomers of CLA on porcine adipocyte growth and differentiation. *J Nutr Biochem* 14: 266-274, 2003
- 13) Belury MA, Kempa-Steczko A. Conjugated linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice. *Lipids* 32: 199-204, 1997
- 14) Sisk M, Azain MJ, Hausman DB, Jewell DE. Effect of conjugated linoleic acid on fat pad weights and cellularity in Sprague Dawley and Zucker rats. *FASEB* (abstract) 12: A536, 1998
- 15) Satory DL, Smith SB. Conjugated linoleic acid inhibits proliferation but stimulates lipid filling of murine 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutr* 129: 92-97, 1999
- 16) Brodie AE, Manning VA, Ferguson KR, Jewell DE, Hu CY. Conjugated linoleic acid inhibits differentiation of pre- and post-confluent 3T3-L1 preadipocytes but inhibits cell proliferation only in preconfluent cells. *J Nutr* 129: 602-606, 1999
- 17) Takahashi Y, Kushiro M, Shinohara K, Ide K. Dietary conjugated linoleic acid reduces body fat mass and affects gene expression of proteins regulating energy metabolism in mice. *Comp Biochem Physiol* 133 (3) : 395-404, 2002
- 18) Kang KH, Liu W, Albright KJ, Park YH, Pariza MW. Trans-10, cis-12 CLA inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes and decreased PPAR γ expression. *Biochem Biophys Res Commun* 303 (3) : 795-799, 2003
- 19) Choi Y, Kim YC, Han YB, Park Y, Pariza MW, Ntami JM. The trans-10, cis-10 isomer of conjugated linoleic acid downregulates stearyl-Co A desaturase 1 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr* 130: 1920-1924, 2000
- 20) Palou A, Serra F, bonet ML, Pico C. Obesity: molecular bases of a multifactorial problem. *Eur J Nutr* 39: 127-144, 2000
- 21) Jezek P. Possible physiological roles of mitochondrial uncoupling proteins-UCPn. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 1190-1206, 2002
- 22) Rodriguez E, Ribot J, Palou A. Trans-10, cis-12, but not cis-9, trans-11 CLA isomer, inhibits brown adipocyte thermogenic capacity. *Am J Physiol* 282 (6) : R1787-1797, 2002
- 23) West DB, Blohm FY, Truett AA, Delany JP. Conjugated linoleic acid persistently increases total energy expenditure in AKR/J mice without increasing uncoupling protein gene expression. *J Nutr* 130 (10) : 2471-2477, 2000
- 24) Richter c, Schweizer M, cossarizza A, Franceschi C. Control of apoptosis by the cellular ATP level. *FEBS Lett* 378: 107-110, 1996
- 25) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
- 26) Kang KJ, Kwon SY. Effects of wax gourd extracts on adipocytized differentiation and uncoupling gene (Ucp) expressions in 3T3-L1 preadipocytes. *Nutr Sci* 6: 148-154, 2003
- 27) Brown JM, Halvorsen YD, Lea-curry YR, Geigerman C, McIntosh M. Trans-10, cis-12. but not cis-9, trans-11, conjugated linoleic acid attenuates lipogenesis in primary cultures of stromal vascular cells from human adipose tissue. *J Nutr* 131: 2316-2321, 2001
- 28) Hensley C, Gautier J. A developmental timer that regulates apoptosis at the onset of gastrulation. *Mech Dev* 69: 183-195, 1997
- 29) Ealey KN, El-Sohemy A, Archer MC. Effects of dietary conjugated linoleic acid on the expression of uncoupling proteins in mice and rats. *Lipids* 37 (9) : 853-861, 2002
- 30) Roche HM, Noone E, Sewter C, Mc Bennett S, Savage D, Gibney MJ, O'Rahilly S, Vidal-Puig AJ. Isomer-dependent metabolic effects of conjugated linoleic acid: insights from molecular markers sterol regulatory element-binding protein-1c and LXRA. *Diabetes* 51 (7) : 2037-2044, 2002
- 31) Dulloo AG, Samec S. Uncoupling proteins: their roles in adaptive thermogenesis and substrate metabolism reconsidered. *Br J Nutr* 86: 123-139, 2001