

Caffeine이 지방세포주 3T3-L1 분화에 미치는 영향 : 영양유전체학적 접근

김미자¹⁾²⁾ · 김영옥³⁾ · 정주호⁴⁾ · 김종우²⁾⁵⁾ · 김혜경⁶⁾⁸⁾

동덕여자대학교 비만과학대학원 비만관리학과,¹⁾ 이매진 비만 의학연구소,²⁾
동덕여자대학교 식품영양학과,³⁾ 경희대학교 의과대학 약리학교실,⁴⁾
경희대학교 의과대학 신경정신과,⁵⁾ 한서대학교 식품생물공학과⁶⁾

The Effect of Caffeine on 3T3-L1 Adipocyte Differentiation : A Nutrigenomical Approach

Kim, Mi-Ja¹⁾²⁾ · Kim, Youngok³⁾ · Chung, Joo-Ho⁴⁾ · Kim, Jong-Woo²⁾⁵⁾ · Kim, Hye-Kyung⁶⁾⁸⁾

Department of Obesity Management,¹⁾ Graduate School of Obesity Science Dongduk Women's University,
Seoul 136-714, Korea

Imagine Obesity Research Institute,²⁾ Seoul 138-170, Korea

Department of Food and Nutrition,³⁾ Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

Department of Pharmacology,⁴⁾ College of Medicine, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

Department of Neuropsychiatry,⁵⁾ College of Medicine, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

Department of Food and Biotechnology,⁶⁾ Hanseo University, Seosan 356-705, Korea

ABSTRACT

Nutrigenomics refers to research that investigates the interaction between nutrition and the human genome. Caffeine in tea and coffee is widely and routinely consumed by people. This study was performed to confirm the effect of caffeine treatment on the gene expression and cytokine profiling in 3T3-L1 adipocyte cells using microarray and protein array methodology. Treatment of caffeine in 3T3-L1 adipocyte cells increased expression of several genes related with obesity including adipocyte C1Q and collagen domain containing (ACDC), Adipsin (ADN), uncoupling protein 3 (UCP3), while glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), which is known as lipid storage enzyme, was decreased by caffeine treatment. Furthermore, cytokines, such as interleukin-3 (IL-3), interleukin-12 (IL-12), interleukin-13 (IL-13), granulocyte colony stimulating factor (GCSF), granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and vascular endothelial growth factor (VEGF), were decreased in caffeine treated 3T3-L1 adipocyte cells. These results provided interesting information about the genes related with caffeine and cytokine expression profiling in obesity. (*Korean J Nutrition* 38(8): 649~655, 2005)

KEY WORDS : nutrigenomics, caffeine, 3T3-L1, obesity.

서 론

현대인의 사망원인으로 상위그룹을 차지하는 질환들은 식생활을 포함한 생활습관의 불균형에 의한 것으로 보고되고 있다.¹⁾ 올바른 식생활에 의해 섭취된 영양은 무엇보다도 중요하여 영양상태에 따라서 질병이환율의 감소 및 질환의 치

유가 가능하다. 이에 발맞추어 현대에 들어 영양 유전체학 (nutrigenomics)이라는 학문이 각광을 받고 있는데, 영양 유전체학이란, 영양과 인간 유전체와의 관계를 규명하는 학문으로써, 궁극적으로는 인간 삶의 질 향상 및 건강을 증진시키는 영양을 보다 과학적으로 연구하기 위한 것이라고 할 수 있다.^{2,3)} 최근 들어 인간게놈 프로젝트가 완결되므로써 인간의 유전자서열이 밝혀짐에 따라 개개인의 서로 다른 유전적 배경에 따라 약물뿐만 아니라 식품이나 영양소 섭취도 개인 맞춤형으로 이루어져야 한다.^{4,5)}

비만은 에너지 축적과 에너지 소비의 불균형으로 일어나는 생활 습관병으로 이로 인한 합병증이 동반되는 질환이

접수일 : 2005년 4월 21일

채택일 : 2005년 9월 15일

*To whom correspondence should be addressed.

E-mail : hkkim111@hanseo.ac.kr

로 극도의 예방이 필요한 질환이라고 할 수 있다.²⁾ 이러한 이유로 인하여 현대인들은 식품소재로써 비만예방 및 비만치유를 원하고, 수많은 식품소재 및 천연물질이 비만효능을 나타내는 것으로^{6,7)} 보고되고 있으나, 이러한 천연물질로 인한 지방세포내의 수많은 유전자들 및 단백질들의 변화를 관찰하는 연구보고들이 드물다. 일반적으로 지방세포로 분화되어질 때 많은 유전자들이 관여한다. 3T3-L1은 전지방세포주으로써 인슐린이나 유도물질의 존재하에 지방세포로 분화하는 특징을 가지고 있고, 분화시 여러 가지 면에서 포유류지방조직의 성장과 유사한 것으로 알려져 비만에 대한 효과검증을 위한 실험에 주로 쓰이는 세포주이다.^{8,9)}

지방분화를 촉진하는 대표적 전사인자들은 proliferator activated receptor- γ (PPAR γ)와 CCAAT-enhancer binding protein- α (C/EBP α) 등이 관여하여 지방세포를 성숙하게 하고 지질대사에 관여하는 유전자를 자극하여 지방축적에 관여하는데,¹⁰⁾ 현재까지 3T3-L1 전지방세포주가 지방세포로 분화될 때 분화정도에 따른 micro array를 이용한 유전자 검색이 이루어진 상태이다.¹¹⁾ Caffeine은 차나 커피에 들어있는 알칼로이드 (alkaloid) 계의 물질로, 여러 암세포의 세포사멸 (apoptosis)을 유도하여 항암능을 가진다는 연구를 비롯하여,^{12,13)} 피부에 강한 자외선을 처리하여 피부암을 유도한 동물에서, caffeine이 피부암을 저해한 연구보고¹⁴⁾도 있다. 이외에도 caffeine은 마황의 성분인 에페드린 (ephedrine)과 함께 사용하면 체중 감소, 대사의 증가, 지방량 감소를 나타냄이 인체 임상 실험으로 보고되어 있어¹⁵⁾ 실제로 체중감소의 식품소재로 사용하고 있다.

이에 본 연구에서는 microarray 및 protein array를 이용하여 caffeine이 지방 세포 분화시에 유전자들에 미치는 영향과 cytokine류들의 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 3T3-L1 세포주 배양, caffeine 처리 및 세포관찰

Mouse embryo 3T3-L1 전지방세포주는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하여 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin 이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에 2×10^5 cells/ml 농도로 부유시켜 48시간동안 배양하여 confluent 상태가 되게 37°C CO₂ incubator에서 배양하였다. 분화배지 (10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 5 μ g/ml insulin, 1 μ M dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine)로 교체하여 2일간 배양 후, 지방세포로의 분화를 촉진하기 위해 5 μ g/ml insulin이

포함된 DMEM배지로 3일간 배양하였다. Caffeine 처리군은 5 mM caffeine을 분화시에 같이 처리하였다. 세포관찰은 광학현미경 (Olympus, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

2. MTT 방법을 이용한 caffeine의 독성검사

3T3-L1 전지방세포주를 96 well plate에 분주하여 24시간 배양 후, caffeine을 농도별 (10 μ M, 100 μ M, 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM)로 처리하여 24시간 배양하였다. 3-(4, 5-methylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 시약을 10 μ l 처리하여 4시간 배양 후, 배지와 MTT 시약을 제거하고, DMSO 시약 100 μ l를 가하여 570 nm에서 ELISA reader를 이용하여 측정하였다.

3. cDNA microarray 실험

지방세포 분화군과 caffeine 처리군을 대상으로 TwinChip mouse 7.4K cDNA microarray (Digital Genomics, Seoul, Korea)를 사용하여 유전자 발현 상태를 조사하였고 신뢰도를 높이기 위하여 2회 반복 실험하였다.¹⁶⁾

1) 총 RNA 추출

1×10^7 세포수에 1 ml의 Trizol을 첨가하고 chloroform 300 μ l를 가하여 15초 동안 강하게 혼합한 후 상층액을 분리하여 0.6 ml의 isopropanol을 첨가한 후 5분간 반응시켰다. 12,000 \times g에서 15분간 원심분리한 후 70% ethanol로 세척하여 total RNA를 추출하였다.

2) Fluorescence cDNA probe 합성

RNA 500 μ g과 oligo dT 2 μ g을 70°C에서 10분간 반응시킨 후 얼음위에서 SuperScript II 2 μ l (200 units/ μ l), 50 \times dNTP mix 0.6 μ l (최종 부피 500 μ M dATP, dCTP, dGTP, 200 μ M dTTP), 5 \times reaction buffer 6 μ l, Cy3-dUTP 60 μ M 또는 Cy5-dUTP 60 μ M를 첨가하여 37°C에서 2시간 반응시켰다. 5 M NaOH 2 μ l와 100 mM EDTA 0.3 μ l를 첨가하고 65°C에서 10분간 반응시킨 후, 500 μ l의 Tris-HCl에 희석하고 Microcon-30 (Amicon)을 사용하여 30 μ l로 농축하였다.

3) Microarray hybridization

형광물질로 표지된 probe에 11 μ l의 3.5 \times SSC (10 μ g Yeast tRNA와 0.3% SDS포함)를 첨가하여 95°C에서 2분간 반응시킨 후, 실온에서 5분간 방치하고 hybridization chamber에 넣어 62°C에서 10시간 hybridization을 실행하였다. 2 \times SSC/0.2% SDS와 0.1 \times SSC로 세척하였다.

4) Scanning과 자료분석

ImaGene Scan Analyzer를 이용하여 얻어진 영상을

GenePix Pro 3.0 software로 분석하였다. Fluorescent images는 격자 모양으로 되어 있어 각각의 유전자에 일치하는 점들이 위치하고 있는데, Cy3, Cy5 파장의 형광 정도를 표준화하였다. Raw data 중 small diameter (< 120 μm), low signal intensity (< 300 fluorescence intensity units), low signal to noise ratio (< 1.5)는 분석 시 제외시켰다. 형광물질 Cy3는 초록색으로 지방세포 분화군에 표지되었고, Cy5는 빨간색으로 caffeine 처리군에 표지되었다. 이들 두 군의 유전자 발현의 상대적 척도를 결정하기 위해 형광비율 (Cy5/Cy3)을 구한 후, 2회의 반복 실험에서 모두 3배 이상 발현이 증가되었거나 (Cy5/Cy3 ratios > 3), 3배 이상 발현이 감소된 (Cy5/Cy3 ratios < 3) 유전자만을 선택하였다.

4. Protein array

1) 단백질의 분리

세포 용해 완충용액으로 세포를 용해시키고 $1,500 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취하여 단백질을 분

리하였다.

2) Blocking and incubation

Protein array는 mouse cytokine antibody array I & 1.1 kit (Raybiotech, Inc., Seoul, Korea)을 사용하였다. 22개의 mouse cytokine antibody가 있는 membrane에 $1 \times$ blocking 용액을 2 ml 가하여 30분 동안 상온에서 반응시킨 후, blocking 용액을 제거하고 각 처리군의 단백질 50 μg 을 1 ml의 $1 \times$ blocking 용액에 혼합하여 membrane 과 상온에서 하룻밤 반응시켜 단백질을 제거하고 세척 용액 I과 II로 세척하였다.

3) Detection

Biotin 결합항체를 2시간 상온에서 반응시키고, 세척 완충용액 I, II를 이용하여 세척, horse radish peroxidase가 결합된 streptavidin 으로 상온에서 2시간 반응시켰다. 여러 번 세척 후에, 감지용액으로 단백질의 발현을 X선-film을 이용하여 감지하였다.

결과 및 고찰

1. MTT 방법을 이용한 caffeine의 3T3-L1 세포주의 독성검사

3T3-L1 세포주에 대한 caffeine의 독성농도를 알기 위해 10 μM , 100 μM , 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM의 caffeine을 처리하여, 세포주가 70% 생존하는 농도를 정하여 본 실험에 사용하였다. 각각의 caffeine농도에서 95.6, 92.1, 88.5, 82.5, 74.0, 65.5%의 생존율을 나타내어 가장 유의적 효과를 나타내는 농도인 5 mM 농도를 본 실험에 사용하였다 (Fig. 1).

2. Caffeine이 지방 세포 분화에 미치는 영향

3T3-L1 지방세포 분화군과 caffeine 처리군의 세포 형태의 변화는 Fig. 2와 같다. 전지방세포인 3T3-L1에 분화 배지를 처리하게 되면 지방세포로 분화되면서 중성지방이 고르게 축적되어 많은 원형모양의 중성지방입자가 관찰되었다 (Fig. 2A). Caffeine 5 mM 처리된 세포에서는 중성지

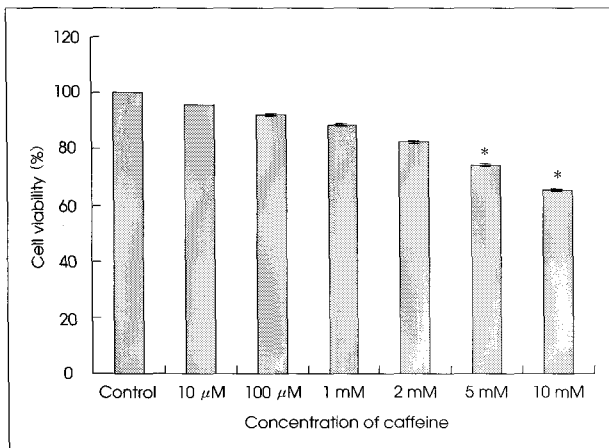


Fig. 1. The effect on cell viability at various caffeine concentrations. 3T3-L1 cells were incubated with different concentrations of caffeine for 24 h, and percent viabilities of the treatment groups were calculated by MTT colorimetric assay relative to that of the control group. *: Represents statistical difference from the control group ($p < 0.05$).

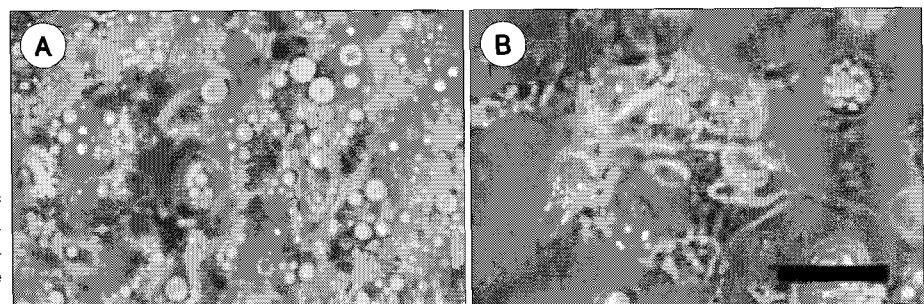


Fig. 2. Morphological change of caffeine-treated 3T3-L1 cells A: 3T3-L1 adipocyte cells B: caffeine treated 3T3-L1 adipocyte cells. Scale bar represents 100 μm .

방 축적이 억제된 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2B). Caffeine 은 theophylline 등의 약물들과 같이 지방분해능을 측정하는 실험에서 양성대조군으로 사용할 때 처치하는 식품소재¹⁷⁾로 본 실험에서도 3T3-L1 지방세포의 지방세포로의 분화를 억제하는 것으로 관찰되었다.

3. Caffeine이 3T3-L1 지방 세포 분화시 유전자 발현에 미치는 영향 : Microarray 적 접근

Microarray를 이용하여 3T3-L1 지방세포 분화군과 caffeine 처리군의 유전자 발현을 관찰한 결과 Table 1에 제시된 바와 같이 유전자 발현정도가 3배정도 증가된 유전자가, Endothelial differentiation lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor 2 (EDG2), Procollagen type III alpha 1 (COL3 α 1), Claudin 8 (CLDN8), Adipocyte C1Q and collagen domain containing (ACDC), Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP2), Procollagen type I alpha 2 (COL1 α 2), Procollagen type I

Table 1. Up-regulated genes with caffeine treatment in 3T3-L1 cells*

Gene name	Abbreviation	Increase ^o
Endothelial differentiation lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor, 2	EDG2	5.9
Procollagen, type III alpha 1	COL3 α 1	5.8
Claudin 8	CLDN8	4.9
Adipocyte, C1Q and collagen domain containing	ACDC	4.4
Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	TIMP2	4.0
Procollagen, type I alpha 2	COL1 α 2	4.0
Procollagen, type I alpha 1	COL1 α 1	4.0
Adipsin	ADN	3.8
Resistin like alpha	RETNL α	3.8
Resistin	RETN	3.8
Replication protein A1	RPA1	3.8
S100 calcium binding protein A4	S100A4	3.6
Filamin alpha	FLN α	3.4
Oxidase assembly 1-like	OXA1L	3.4
Stromal interaction molecule 1	STIM1	3.3
Wolf-Hirschorn syndrome candidate 2 (human)	WHSC2	3.3
WD and tetratricopeptide repeats 1	WDTC1	3.2
Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7	17 β HSD7	3.2
T-cell lymphoma invasion and metastasis 1	TIAM1	3.1
Uncoupling protein 3	UCP3	3.1

*Gene expression was profiled with TwinChipTM (Digital Genomics) microarray. A cut-off level of 3-fold change was used. Increase^o represents the times of control level

alpha 1 (COL1 α 1), Adipsin (ADN), Resistin like alpha (RETNL α), Resistin (RETN), Replication protein A1 (RPA1), S100 calcium binding protein A4 (S100a4), Filamin alpha (FLN α), Oxidase assembly 1-like (OXA1L), Stromal interaction molecule 1 (STIM1), Wolf-Hirschorn syndrome candidate 2 (human) (WHSC2), WD and tetratricopeptide repeats 1 (WDTC1), Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7 (17 β HSD7), T-cell lymphoma invasion and metastasis 1 (TIAM1) Uncoupling protein 3 (UCP3) 등으로 나타났다. 이들 유전자중에서 직접적으로 지방세포에 작용할 수 있는 유전자들인 ACDC, ADN, RETNL α , RETN, 17 β HSD7, UCP 계열들이 3배 이상 증가되어 있었다. Nakatani 등¹⁸⁾에 의하면, ACDC 유전자의 변이가 일본인의 당뇨병이 아닌 사람에게서 나타나면 제 2형의 당뇨병을 일으킬 위험이 있다고 보고되었다. Adipsin은 지방세포에서 분비되며, 유전적 비만동물 모델인 ob/ob, db/db 생쥐에서 교감신경계와 열발생 기전의 감소로 인하여 그 발현이 감소되어 있으며,¹⁹⁾ 비만인 사람에서는 변화가 없거나 증가되어 있다는 연구 보고들이 있다.²⁰⁾ Resistin은 resistin like molecular family에 속하며 지방세포에서 분비되는 adipocytokine으로 알려져 있다.²¹⁾ Resistin을 실험동물에 주입하면 인슐린 작용을 억제하고²²⁾ resistin 결핍은 간의 당신생합성과 혈당수준을 감소하며,²³⁾ 절식시에는 감소되고 음식섭취를 하게 되면 증가되어 에너지의 항상성 유지에 관여한다.²⁴⁾ 본 연구에서 caffeine 처리에 의해 resistin 유전자가 3.8배 증가되어 지방세포 분화과정에 영향을 미쳐 지방세포에서 만들어지는 adipocytokine 류 변화를 유도한 것으로 사료된다. 17 β hydroxysteroid dehydrogenase family는 척추동물에서 에스트로젠이나 안드로젠 등의 성호르몬을 산화시키거나 감소시켜 성호르몬의 생리활성을 조절하는 효소이다.²⁵⁾ 이 중에서 17 β hydroxysteroid dehydrogenase type 7은 실험동물에서 임신시 난소에서 분비되어,²⁶⁾ 임신유지에 중요하다고 알려져 있다. 이러한 스테로이드 변환 효소가 지방세포에서도 발견되면서²⁷⁾ caffeine 또한 지방세포 분화에 관여하는 호르몬 조절효소에 영향을 미치는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 caffeine은 근육조직에 많이 존재하는 단백질로 열발생기전에 관여하는 uncoupling protein 3 유전자를 증가시켜²⁸⁾ 대사를 증가에 의한 지방 축적을 억제하는 역할을 할 것으로 사료된다. Table 2에서는 caffeine 처리후에 3T3-L1 지방 세포 분화군에서 3배 이상 감소되는 유전자들을 나타내고 있는데, 대표적으로 Plexin B1 (PLXNB1), BCL2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 1,

NIP3 (BNIP3), Creatine kinase, mitochondrial 2 (CK-MT2), Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Troponin C, cardiac/slow skeletal (TNNC1) 등으로 나타났다. 이들 감소된 유전자중에서 CKMT2는 creatine kinase의 일종이고, GAPDH는 지방저장에 관여하는 효소로 알려져 있어²⁹⁾ caffeine 처리가 지방세포에 영향을 미치는 것으로 사료된다 (Fig. 3C).

4. Caffeine이 3T3-L1 지방세포 분화시 cytokine류에 미치는 영향 : Protein array적 접근

Protein array를 이용하여 3T3-L1 지방세포 분화군과 caffeine 처리군의 단백질의 변화 중 cytokine 류들의 변화를 관찰한 결과는 Fig. 3과 같다.

전반적으로 3T3-L1 지방세포 분화군 (Fig. 3A)이 caffeine 처리군 (Fig. 3B)보다 cytokine류의 발현정도가 많았으며, 대표적으로 caffeine 처리 시 많이 감소되는 cytokine 류는 interleukin-3 (IL-3), interleukin-12 (IL-12),

interleukin-13 (IL-13), granulocyte colony stimulating factor (GCSF), granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), vascular endothelial growth factor (VEGF) 등 이었고, 다소 증가한 것은 interferon γ (INF- γ)이었다. 위에서 제시된 cytokine과 지방 세포 분화와의 관계는 명확한 기전 연구가 미비하나, IL-3 경우 Kyzer 등³⁰⁾은 고도비만으로 인해 지방제거 수술을 하여 체중이 감소한 경우에 cytokine 류중에서도 IL-3와 TNF- α 가 유의적으로 감소한 것을 보고하였다. IL-12는 자가면역성 당뇨에 관여하는 것으로 알려져 있고,³¹⁾ GCSF는 면역계에서 보체 34 (CD34) 생성을 자극하는 물질로, 보체 34의 세포수는 질병의 발생여부를 제시할 수 있다. 따라서 질병에 따라 GCSF를 투여하여 보체 34를 만들어내는 경우가 있는데, Cetlin 등³²⁾은 GCSF가 BMI 25 이상의 비만인인 경우에 일반인과는 달리 다른 약물유전학적인 과정 즉 양과 횟수에 의존적으로 작용하는 것을 관찰할 수 있어, 비만이 GCSF의 보체생성에 영향을 미치는 것을 보고한 바 있다. 또한 혈관 성장 요인들 (vascular growth factors)의 일종인 VEGF는 지방세포에서도 생성되는 물질로, Silha 등³³⁾은 과체중이나 비만인인 경우에 VEGF가 많이 증가되어 있음을 보고하였다. INF- γ 는 일반적으로 실험동물이나, 인체 연구에서 식욕을 억제하는 cytokine으로 알려져 있고,³⁴⁾ Raymond 등³⁵⁾은 식욕부진증을 가진 사람에서 INF- γ 의 세포생성이 상승되어 있음을 관찰하였다. 이외에도 비만이나 지방세포의 분화와 관련된 cytokine 류들의 연구에 의하면, IL-6의 경우, 비만하면 혈중 수준이 증가하고 체중이 감소되면 낮아지며,³⁶⁾ IL-6을 주입한 실험동물에서 고지혈증, 고혈당, 인슐린저항성이 관찰되었다.³⁷⁾ 또한 IL-1, IL-8 및 IL-18 등도 비만이 진전되면 증가한다고 보고되고 있어, 비만과 cytokine 류와는 밀접

Table 2. Down-regulation genes with caffeine treatment in 3T3-L1 cells*

Gene name	Abbreviation	Decrease ^o
Plexin B1	PIXNB1	7.7
BCL2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 1 NIP3	BNIP3	5.2
Creatine kinase mitochondrial 2	CKMT2	4.8
Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	4.5
RIKEN cDNA 1810010M01 gene	1810010M01RIK	4.1
Troponin C cardiac/slow skeletal	TNNC1	3.5
Max interacting protein 1	MXI1	3.2
FXVD domain-containing ion transport regulator 5	FXVD5	3.0

*Gene expression was profiled with TwinChip™ (Digital Genomics) microarray. A cut-off level of 3-fold change was used. Decrease^o represents the times of control level

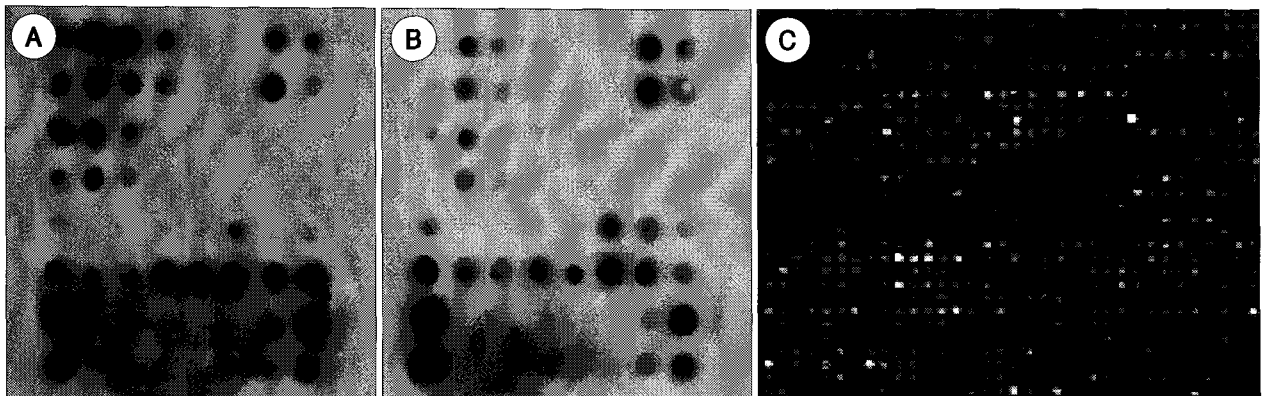


Fig. 3. Images of cytokine and gene expression in 3T3-L1 cells treated with caffeine for 24 h A: 3T3-L1 adipocyte cells B: caffeine treated cells C: image of gene expression using microarray-yellow: down-regulation genes, red: up-regulation genes.

한 관계가 있으나, 다양한 cytokine 류에 대한 연구가 미흡한 실정이다.

요약 및 결론

3T3-L1 지방세포에 caffeine을 처리한 후 세포내의 유전자 및 cytokine 류들의 변화를 microarray와 protein array로 관찰한 결과는 다음과 같다.

Microarray 결과 caffeine처리에 의해 3배 이상 증가되는 유전자는 EDG2, COL3 α 1, CLDN8, ACDC, TIMP2, COL1 α 2, COL1 α 1, ADN, RETNL α , RETN, RPA1, S100A4, FLN α , OXA1L, STIM1, WHSC2, WDTC1, 17 β HSD7, TIAM1, UCP3 등으로 나타났고, 이들 유전자 중에서 직접적으로 지방세포에 작용할 수 있는 유전자들은 ACDC, ADN, RETNL α , RETTN, 17 β HSD7, UCP 계열로 나타났다. 또한 3배 이상 감소되는 유전자들은 PLXNB1, BNIP3, CKMT2, TNNC1, GAPDH 등으로 나타났으며 이 중 GAPDH는 지방저장에 관여하는 효소로 알려져 있다. 지방세포내의 cytokine의 변화를 알아보기 위해 3T3-L1 지방세포 분화군과 caffeine 처리군에 protein array를 실시한 결과, caffeine 처리군에서 IL-3, IL-12, IL-13, GCSF, GM-CSF, VEGF 등이 감소되어 caffeine이 지방 세포내에서 전반적으로 cytokine 류들을 감소시키는 것으로 나타났다.

본 연구결과, 지방세포에 caffeine을 처리한 후, 지방세포 분화에 직접적으로 작용할 수 있는 중요한 유전자들의 변화가 관찰되어 caffeine의 항비만 효과를 다시 한번 증명할 수 있었고, 지방세포내 cytokine 류들의 변화로 인하여 지방세포 분화 억제에 영향을 미칠 것으로 사료된다.

Literature cited

- 1) Statistical Office. 2001 Yearbook of death cause statistics. Korea, 2001
- 2) Ordovas JM, Mooser V. Nutrigenomics and nutrigenetics. *Curr Opin Lipidol* 15: 101-108, 2004
- 3) Roche HM. Dietary lipids and gene expression. *Biochem Soc Trans* 32: 999-1002, 2004
- 4) Carpenter KJ. A short history of nutritional science: part 1 (1785-1885). *J Nutr* 133: 638-645, 2003
- 5) Chadwick R. Nutrigenomics, individualism and public health. *Proc Nutr Soc* 63: 161-166, 2004
- 6) Yang JY, Lee KS, Kim MK, Moon SK, Kang MK, Park BH, Kim JS, Park JW. Effect of *Acanthopanax senticosus* on lipoprotein lipase in 3T3-L1 adipocytes. *Phytother Res* 18: 160-163, 2004
- 7) Sanders SR, Teachey MK, Ptock A, Kraemer K, Hasselwander O, Henriksen EJ, Baumgard LH. Effects of specific conjugated linoleic acid isomers on growth characteristics in obese Zucker rats. *Lipids* 39: 537-543, 2004
- 8) Haugen F, Zahid N, Dalen KT, Hollung K, Nebb HI, Drevon CA. Resistin expression in 3T3-L1 adipocytes is reduced by arachidonic acid. *Lipid Res* 46: 143-153, 2005
- 9) Tenney R, Stansfield K, Pekala PH. Interleukin 11 signaling in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Physiol* 202: 160-166, 2005
- 10) Guo X, Liao Kan. Analysis gene expression profile during 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Gene* 251: 45-53, 2000
- 11) Burton GR, Nagarajan R, Peterson CA, McGehee Jr RE. Microarray analysis of differentiation-specific gene expression during 3T3-L1 adipogenesis. *Gene* 329: 167-185, 2004
- 12) He Z, Ma WY, Hashimo T, Bode AM, Yang CS, Dong Z. Induction of apoptosis by caffeine is mediated by the p53, Bax, and caspase 3 pathways. *Cancer Res* 63: 4396-4401, 2003
- 13) Dai Y, Yu C, Singh V, Tang L, Wang Z, McInistry R, Dent P, Grant S. Pharmacological inhibitors of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase/MAPK cascade interact synergistically with UCN-01 to induce mitochondrial dysfunction and apoptosis in human leukemia cells. *Cancer Res* 61: 5106-5115, 2001
- 14) Lou YR, Lu YP, Xie JG, Huang MT, Conney AH. Effects of oral administration of tea, decaffeinated tea, and caffeine on the formation and growth of tumors in high-risk SKH-1 mice previously treated with ultraviolet B light. *Nutr Cancer* 33: 146-153, 1999
- 15) Greenway FL, De Jonge L, Blanchard D, Frisard M, Smith SR. Effect of a dietary herbal supplement containing caffeine and ephedra on weight, metabolic rate, and body composition. *Obes Res* 12: 1152-1157, 2004
- 16) Yin CS, Lee HJ, Hong SJ, Chung JH, Koh HG. Microarray analysis of gene expression in chondrosarcoma cells treated with bee venom. *Toxicol* 45: 81-91, 2005
- 17) Dell'Agli M, Bosisio E. Biflavones of *Ginkgo biloba* stimulate lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Planta Med* 68: 76-79, 2002
- 18) Nakatani K, Noma K, Nishioka J, Kasai Y, Morioka K, Katsuki A, Hori Y, Yano Y, Sumida Y, Wada H, Nobori T. Adiponectin gene variation associates with the increasing risk of type 2 diabetes in non-diabetic Japanese subjects. *Int J Mol Med* 15: 173-177, 2005
- 19) Flier JS, Cook KS, Usher P, Spiegelman BM. Severely impaired adiponectin expression in genetic and acquired obesity. *Science* 237: 405-408, 1987
- 20) Cianflone K, Xia Z, Chen, LY. Critical review of acylation-stimulating protein physiology in humans and rodents. *Biochem Biophys Acta* 1609: 127-143, 2003
- 21) Silswal N, Singhhh A, Aruna B, Mukhopadhyay S, Ghosh S, Ehtesham NZ. Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-12 in macrophages by NF- κ B-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 334: 1092-1101, 2005
- 22) Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409: 307-312, 2001
- 23) Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B,

- Qi Y, Wang J, Rajala MW, Pocai A, Scherer PE, Steppan CM, Ahima RS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA. Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 303: 1195-1198, 2004
- 24) Rajala MW, Qi Y, Patel HR, Takahashi N, Banerjee R, Pajvani UB, Sinha MK, Gingerich RL, Scherer PE, Ahima RS. Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes and fasting. *Diabetes* 53: 1671-1679, 2004
- 25) Krazeisen A, Breitling R, Imai K, Fritz S, Møller G, Adamski J. Determination of cDNA, gene structure and chromosomal localization of the novel human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 7. *FFBS Letters* 460: 373-379, 1999
- 26) Nokelainen P, Peltoketo H, Vihko R, Vihko P. Expression cloning of a novel estrogenic mouse 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase (m17HSD7), previously described as a prolactin receptor associated protein (PRAP) in rat. *Mol Endocrinol* 12: 1048-1059, 1998
- 27) Blouin K, Richard C, B?anger C, Dupont P, Daris M, Laberge P, Luu-The V, Tchernof A. Local androgen inactivation in abdominal visceral adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 5944-5950, 2003
- 28) Kogure A, Yoshida T, Takakura Y, Umekawa T, Hioki C, Yoshioka K, Yoshimoto K, Yoshikawa T. Effect of ultrasonic stimulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32: 91-93, 2005
- 29) Rolland V, Le Liepvre X, Houbiguan ML, Lavau M, Dugil I. C/EBP alpha expression in adipose tissue of genetically obese Zucker rats. *Biochem Biophys Res Commun* 207: 761-767, 1995
- 30) Kyzer S, Binyamini J, Chaimoff C, Fishman P. The effect of surgically induced weight reduction on the serum levels of the cytokines: interleukin-3 and tumor necrosis factor. *Obes Surg* 9: 229-234, 1999
- 31) Yang Z, Chen M, Ellett JD, Fialkow LB, Carter JD, McDuffie M, Nadler JL. Autoimmune diabetes is blocked in Stat4-deficient mice. *J Autoimmun* 22: 191-200, 2004
- 32) Çetin T, Arpacı F, Özet A, Öztürk B, Komurcu S, Ihsan Uzar A, Yılmaz I, Beyzadeoglu M, Oysul K, Ataergin S, Kuzhan O, Pekel A. Stem cell mobilization by G-CSF in solid and hematological malignancies: single daily dose is better than split dose in obese patients. *J Clin Apher* 18: 120-124, 2003
- 33) Silha JV, Krsek M, Sucharda P, Murphy LJ. Angiogenic factors are elevated in overweight and obese individuals. *Int J Obes Relat Metab Disord* 7 [Epub ahead of print], 2005
- 34) Langstein HN, Norton JA. Mechanisms of cancer cachexia. *Nutr Cancer* 5: 103-123, 1991
- 35) Raymond NC, Dysken M, Bettin K, Eckert ED, Crow SJ, Markus K, Pomeroy C. Cytokine production in patients with anorexia nervosa, bulimia nervosa, and obesity. *Int J Eat Disord* 28: 293-302, 2000
- 36) Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of IL-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 101: 1767-1772, 2000
- 37) van Hall G, Steensberg A, Sacchetti M, Fischer C, Keller C, Schjerling P, Hiscock N, Møller K, Saltin B, Febbraio MA, Pedersen BK. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 3005-3010, 2003