

지방세포 분화중인 3T3-L1 세포에서 아로마테이즈 siRNA 처리에 의한 지방관련 유전자와 전사인자의 발현 조절

정 동 기*

제주대학교 생명자원과학대학 생명공학부 동물생명공학 전공, 아열대생명과학 연구소

Received October 28, 2008 / Accepted November 14, 2008

Adipocyte-Related Genes and Transcription Factors were Affected by siRNA for Aromatase Gene during 3T3-L1 Differentiation. Dong Kee Jeong*. *Department of Animal Biotechnology, College of Applied Biosciences, Cheju National University, The Institute of Subtropical Biological Sciences* - This study was performed to verify the gene expression of 3T3-L1 using the siRNA of the aromatase gene, which is the estrogen synthesis enzymes. First of all three pairs of siRNA were designed from the CYP19A1 (aromatase) and analyzed the formation of fat cell mechanism by transferring gene to 3T3-L1 and differentiating it. As a result, the expression of leptin gene, which is the main gene causing the obesity, was controlled and the cause of the obesity is related with the insulin specifically. The overexpression of adiponectin and adipisin was observed. This result showed that the formation of the fat was controlled a little without any side effect by obstructing a specific material out of all the signal systems in the fat formation. This study will be an important clue to make it clear that the lack or over-expression of estrogen might be the cause of fat formation mechanism.

Key words : 3T3-L1, siRNA, aromatase, adiponectin, obesity

서 론

지방세포는 생식기관 외의 에스트로겐 생성기관이며 폐경기 이후 여성에게는 에스트로겐의 주요 공급처로 알려져 있다[1]. 반대로, 에스트로겐 호르몬은 지질의 생성에 매우 중요한 역할을 담당하고 지방조직의 재구성과 분배를 조절하는 기능을 가지고 있다. 여성에 대한 주요한 에스트로겐은 estradiol, estriol, estrone이다. 일반적으로 여성의 경우 폐경기 이후 에스트로겐의 부족으로 인하여 지방생성을 크게 유도하는 것으로 생각되어 왔다. 이러한 에스트로겐의 생성은 아로마테이즈의 가수화에 의한 안드로겐을 아로마화 시키므로써 에스트로겐의 생성을 유도하는 것으로 알려져 있으며 [2,18,6], 아로마테이즈는 CYP19A1 유전자에 의하여 생성되며 테스토스테론을 통하여 에스트라디올(estradiol) 생성에 관여한다. 또한 안드로스테네디온(androstenedione)을 통하여 에스트론(estrone) 생성에 관여하면서, 일종의 전구물질의 역할을 담당한다. 그리고 cytochrome P-450의 유일한 형태를 유지하고 있다[8,15]. 이 효소의 기능은 에스트로겐의 생성과 소모의 기작을 연구하는데 중요한 물질이다. Yamada와 Harada [10]의 연구 보고에서는 3T3-L1 세포의 분화 유도 시 지방세포의 분화 증가에 따라 아로마테이즈 유전자 발현이 최고 17배나 증가함을 확인하였다. 이 실험에서 사용한 3T3-L1 세포의 경우 지방세포 분화 모델 연구를 위한 좋은

재료로 사용되었음을 증명하였으며 최근에 Medsen [16] 등은 lipoxigenase의 발현에 따라 3T3-L1 세포의 adipocyte 분화를 효과적으로 억제하는 것을 밝혀냈다. 이 실험에서 저자들은 이 효소가 직접적으로 세포에 특정 신호전달을 저해함으로써 지방분화를 억제한다는 사실을 밝히면서 이 효소는 PPAR γ 의 agonist인 rosiglitazone의 첨가에 의하여 지방분해 억제제의 기능이 제거되는 것을 증명하였다. 이러한 신호전달의 기능적 분류에 따라 많은 유전자들이 전사단계의 mRNA의 저해 작용에 의하여 실제 모든 유전자의 기능적 이상이 전사 단계 또는 이전의 복제 단계의 결함에 의한 경우 그 아래 단계의 관련된 여러 신호전달 체계에 복합적 문제를 야기 할 수 있다고 생각한다[19]. 그러나 최근 siRNA 기술은 이러한 단점을 어느 정도 보완하면서 단백질 합성을 제어하는 방법으로 우리가 원하는 특정 유전자의 하부 단계의 기능을 추정할 수 있는 장점이 있다[3,4,14]. siRNA 기술은 전사 단계에서 만들어진 mRNA가 특정 단백질을 합성하는 과정에서 작용함으로써 제어된 유전자에 의하여 나타나는 단백질의 기능을 분석하는 중요한 기술의 하나이다. 그래서 본 연구에서는 여성의 폐경기 또는 수유기 이후 급격하게 체중과 지방 생성이 증가하는 원인을 분석하고 이 원인 중의 하나인 에스트로겐을 통제하면서 비만 조절을 할 수 없을까 하고 방법을 찾던 중 인위적으로 호르몬을 조절할 경우의 부작용이 매우 높음을 알게 되었다[16,20,11]. 그래서 본 연구에서는 직접적인 호르몬의 조절은 어렵지만 에스트로겐 생성에 관여하는 아로마테이즈의 기작을 siRNA 기술을 통하여 제어하면서 그 하부 신호전달 단계에서의 지방생성 관련 유전

*Corresponding author

Tel : +82-64-754-3331, Fax : +82-64-725-2403

E-mail : dkjeong@cheju.ac.kr

자 발현 양상을 분석하게 되었다.

재료 및 방법

세포 배양 및 지방세포 분화

실험에 사용된 세포는 ATCC에서 구입한 3T3-L1과 본 연구실에서 확립한 사람의 중간엽줄기세포를 각각 10%의 소일반 혈청과 혈청이 공급된 DMEM 배양액을 이용하여 배양을 하였다. 세포가 배양용기에서 70% 이상 배양되었을 때 10% 소태아 혈청과 1 μ M dexamethasone, 0.5 mM methylisobutylxanthine, 1 μ g/ml insulin를 첨가하였다. 처리 후 48시간 후 10% 소태아 혈청과 1 μ g/ml insulin 배양액으로 추가 배양을 실시하였다. 그리고 매 48시간마다 10% 소태아 혈청이 포함된 DMEM 배양액으로 배양을 실시하였다.

지방세포 염색

분화된 세포의 지방 분화 정도를 측정하기 위하여 세포가 배양된 세포는 PBS로 세척하였으며 세척한 세포는 3.7% formaldehyde를 이용하여 30분 고정처리한 후에 Oil-Red O 지방세포 염색시약을 이용하여 1시간 정도 염색을 실시하였으며 PBS로 2-3번 수세한 후 현미경하에서 관찰하여 지방세포 분화 정도를 관찰하였다.

RNA 분리 및 RT-PCR

Total RNA를 분리하기 위하여 세포가 배양되고 있는 세포 배양기에서 배양액을 제거한 후 PBS로 2번 수세하고 trypsin-EDTA로 5분간 처리하여 세포를 수거하였다. 수거한 세포는 세포수를 측정 후 Trizol reagent를 이용하여 total

RNA를 분리한 후 DEPC water를 이용하여 정량 후 실험 사용 전까지 -70°C에서 보관하였다. cDNA를 합성하기 위하여 total RNA 2 μ g과 random primer를 총 12 μ l가 되도록 한 후 65°C에서 5분간 처리하고 4 μ l의 5X First strand buffer와 2 μ l 0.1 M DTT를 첨가 한 다음 42°C에서 2분간 처리하였다. 2분 처리 후 Superscript II RNaseH-Reverse transcriptase 1 μ l (200 unit)를 첨가하여 42°C에서 50분간 그리고 70°C에서 15분간 처리하였다. RT-PCR 산물은 사용 전 까지 -20°C에서 보관하였다. PCR의 반응은 eppendorf사의 gradient PCR을 이용하여 수행하였으며 조건은 100 pM의 각 primer (Table 1)와 5 mM의 각 dNTP, 0.5 unit의 Taq polymerase를 사용하여 95°C 5분간 변성시킨 후 본 사이클에서 95°C 1분, 55°C 1분, 72°C 40초간 35사이클 후 72°C에 5분간 진행 한 후 1% agarose gel에 전기 영동하여 결과를 분석하였다.

siRNA를 이용한 유전자 전이

아로마테이즈 유전자의 발현부위의 유전정보를 이용하여 Invitrogen의 합성물을 이용하여 총 3종의 siRNA를 제작하였으며, 이중 발현율이 가장 우수한 siRNA 한종을 선택하여 계속 실험을 진행하였다(Table 2). 유전자의 안정된 발현을 위하여 2 mg의 벡터를 약 50% 정도의 세포가 자란 6 well plate에서 유전자 전이를 실시하였다. 유전자 전이를 위해서 먼저 Fugene 6와 벡터의 비율을 6:1 비율로 혼합하여 전이시켰으며 전이 후 10% FBS가 포함된 배양액을 첨가하여 유전자 발현율을 증가시켰으며 각 실험조건에 따라 수행된 세포는 6-7일간 배양 한 후 지방관련 유전자의 발현양상을 검증하기 위하여 RNA를 추출하였으며 이를 통하여 cDNA를 합성한 후 각 유전자의 발현율을 검증하였다.

Table 1. The sequences of oligonucleotide primer pairs used in this study

Gene	Sequence forward	Sequence reverse
aP2	CAA AAT GTG TGA TGC CTT TGT G	CTC TTC CTT TGG CTC ATG CC
PPAR γ	GGG TCA GCT CTT GTG AAT GG	CTG ATG CAC TGC CTA TGA GC
PPAR1	GCT CTA GAA TGA CCA TGG TTG AC	ATA AGG TGG AGA TGC AGG GC
mInsulin	GGA CCC ACA AGT GGA ACA AC	GGT GGG CCT TAG TTG CAG TA
Leptin	GGC TTT GGC CCT ATC TTT TC	GCT CTT AGA GAA GGC CAG CA
GLUT4	AGC AGC TCT CTG GCA TCA AT	CAA TGG AGA CGT AGC ACA TG
Adiponectin	GAC GTT ACT ACA ACT GAA GAG C	CAT TCT TTT CCT GAT ACT GGT C
Adipsin	CCT GAA CCC TAC AAG CGA TG	GGT TCC ACT TCT TTG TCC TCG
C/EBP	AAG CCA AGA AGT CGG TGG	CAG TCC ACG GCT CAG CTG TTC
β -actin	GAT ATC GCT GCG CTG GTC GTC	ACG CAG CTC ATT GTA GAA GGT GTG G

Table 2. The sequences of siRNA for CYP19A1 gene (aromatase)

siRNA Name	Sequence forward	Sequence reverse
siRNA #1	UUAUGUCUCUGUCACCCACAACAGU	ACUGUUGUGGGUGACAGAGACAUAA
siRNA #2	AUAUGAUGCCGUUCUCAUGCAUGCC	GGCAUGCAUGAGAACGGCAUCAUAA
siRNA #3	UUGCCAGGCGUAAAGUAACCCUGG	CCAGGGUUAUUUAACGCCUGGCAA

세포 분화

3T3-L1 cell을 분화시키기 위하여 DMEM 배양액에 10% FBS와 dexamethason 500 nM, 3-isobutyl-1-methylxanthine 0.5 mM 그리고 Insulin 20 µg/ml 첨가하여 배양을 실시한다. 세포가 배양됨에 따라 대략 2-7일간 배양을 하며, 이후 세포 분화 검증을 위하여 Oil-red O 염색을 통하여 지방세포 분화정도를 측정하였으며, 일부 세포는 RT-PCR을 위하여 세포를 추출한 후 추후 발현을 검증을 위하여 -72°C 에 보관하여 실험에 이용하였다.

결과 및 고찰

지방세포 생성에 관한 연구결과들은 주로 지방생성 메커니즘 이해를 통한 효율적 제어 방법을 찾아내거나 이를 비만 조절 방법에 응용되고 다이어트를 위한 약물 개발 또는 유전자 발굴에 이용된다. 지방세포의 생성은 인슐린 저항성 당뇨, 심장질환, 또는 유방암과 매우 밀접한 연관을 가지고 있으며 이는 비만에 의하여 나타나는 합병증의 일환이라고도 말한다[1]. 지방을 제거하고자 하는 이 방법과 달리 고부가가치 식육을 생산하고자 하는 분야에서는 지방생성 시기와 형태를 조절함으로써 근내 지방과 근간 지방의 적절한 생성에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 에스트로젠은 중추신경, 뼈, 그리고 그 외 생식기관 외 기관에서 매우 중요한 역할을 담당하고 있다[20]. 본 연구에서는 지방생성 기작 중의 하나인 성세포를 조절하는 호르몬을 이용하여 지방생성의 변화를 추적하고 이와 관련되어 있는 유전자의 발현 양상을 살펴 보으로써 효과적으로 지방생성 억제 또는 지방생성 촉진을 위한 메커니즘을 파악하고자 본 연구를 실시하였다. 재료 및 방법에서 상술한 것처럼 사용된 세포로는 지방세포의 전구 세포로 알려져 있는 3T3-L1 세포를 이용하였으며 이 세포의 특징은 미분화 상태를 유지하다가 특정 유도물질을 첨가 할 경우 지방세포로 분화하는 것으로 알려져 있다. 실제로 아로마테이즈 유전자 적중 마우스연구에서 에스트로젠의 분비가 억제됨으로써 2차 성징에 의한 수컷과 암컷 성을 모두 지니고 있는 아로마테이즈의 지방생성 관련성을 검증한 결과가 발표되면서 이 유전자가 지방생성에 상당한 영향을 끼치고 있음을 확인하였다. 이 결과에서 연구자들은 아로마테이즈 유전자에 의하여 지방의 크기가 증가함을 확인하였으며 다른 원인에 의한 비만쥐와 달리 에스트로젠 결핍에 의한 체지방의 증가는 과식증이나 여분 에너지 축적이 아닌 지방 외 부분의 크기가 감소하거나 일시적인 운동역가가 감소하기 때문인 것으로 보고하였다[11,22]. 본 연구에서는 siRNA 기술을 이용하여 전사단계이후에 생성된 mRNA를 효과적으로 제어하고 이후 과정을 통하여 지방전구세포가 지방유도 물질에 의하여 지방세포로 유동될 때의 변화를 보고자 하였다. 먼저 에스트로젠 생성 효소로 알려진 아로마테이즈 유전자

를 이용하여 siRNA를 제작하였다(Table 2). 이 유전자의 특징은 안드로젠을 가수화시켜서 방향성 물질로 변화시킴으로써 에스트로젠을 생성하는 것으로 알려져 있다. 그래서 먼저 제작한 siRNA를 이용하여 3T3-L1 세포가 세포배양용기에 약 40%의 점유한 상태에서 Fugene 6 유전자 전이방법(재료 및 방법)을 이용하여 전이시켰으며 전이 후 일부 세포를 통하여 에스트로젠 유전자 발현이 억제됨을 mRNA 발현을 통하여 확인할 수 있었다(Fig. 2). 그리고 본 연구에서 전이시킨 유전자도 효과적으로 3T3-L1 세포에 전이되어 발현 되고 있음을 PCR을 통하여 확인하였다(미발표 결과). 앞서 결과를 토대로 다음 단계인 분화 실험을 진행하였으며 사용된 siRNA는 총 3종류를 사용하였고 결과는 Fig. 1과 같다. siRNA 처리한 세포군에서는 3종류 모두 대조군인 무처리 분화 유도 실험군(분화 유도 물질 첨가)보다 높은 분화 억제 효율을 보여 주고 있으며 최고 50% 이상의 분화 억제를 유도하는 것을 알 수 있었다. 이를 통하여 아로마테이즈 유전자가 생성하는 에스트로젠이 지방생성에 많은 영향을 끼치고 있음을 알 수 있었다. 세포의 분화 정도를 그림을 통하여 볼 때 지방생성은 한 가지 원인에 의하여 생성되는 것은 아닌 것 같다. 그 이유는 결과가 말해 주듯이 한 가지 원인에 대한 문제 해결만으로는 지방생성을 제어 할 수 없음을 나타내고

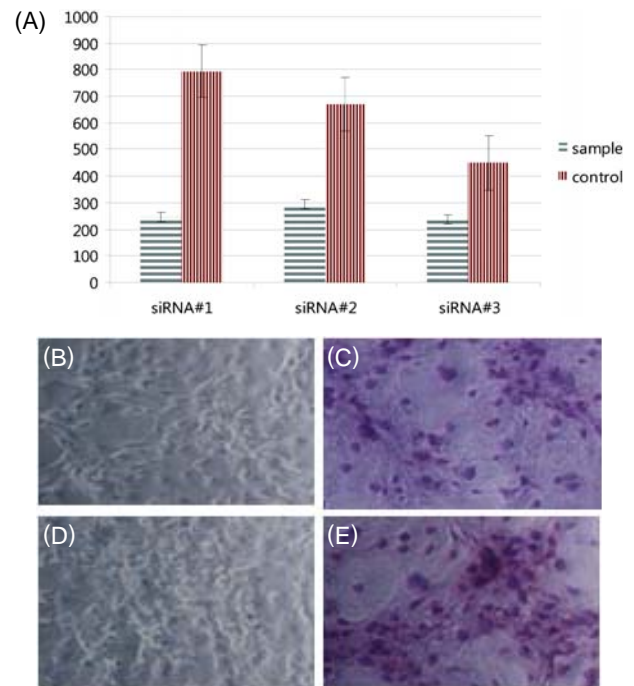


Fig. 1. Effect of aromatase siRNA transfection on 3T3-L1 differentiation. 3T3-L1 preadipocyte were transfected by siRNA of aromatase and the differentiated. (A) Adipocyte cells were quantitated by image program. (B, D) Differentiated cells were fixed before staining with Oil-red O. (C, E) Differentiated cells were stained with Oil-red O.

있었기 때문이다(Fig. 1B-E). 지방생성 기작에 대한 기능적 실험을 통하여 약 50% 정도의 지방생성 억제제를 확인한 다음 이 세포군을 이용하여 에스트로겐 유전자들 비롯한 관련 유전자가 어느 정도 영향을 끼쳤는지를 검토하기 위하여 두 실험 세포군로부터 mRNA를 분리하였으며 cDNA를 통하여 RT-PCR를 수행한 결과, 정상적인 세포군에 비하여 에스트로겐의 발현이 억제됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 그러나 실험 가설과는 달리 그리 큰 차이를 보이지 않았다. 인슐린 유전자의 경우 발현양이 siRNA 유전자 전이시킨 실험군이 대조구에 비하여 더 높게 발현됨이 관찰 되었으며, PPAR1의 경우에는 예상했던 결과가 나타났다. 주로 인슐린의 경우 당을 통하여 지방생성과 연관되어 있는 물질로 알려져 있으며 인슐린 저항성 당뇨병 또한 성인이 나이가 먹어가면서 식이조절 및 과당 과다 섭취 등의 원인으로 이 당성분이 지방생성에 영향을 끼치면서 복부의 지방생성에 직접적인 영향이 되고 있는 것으로 나타났다[5,21]. 그러므로 본 실험에서 밝혀진 결과를 토대로 세포 내 아로마테이즈의 발현 억제와 인슐린 과발현과의 상관관계는 앞으로 충분히 검토해 볼만한 결과라 사료된다[5,21]. 이 실험 결과에 따라서 실제 비만 시 당뇨병 조절과 관련성을 검증하기 위하여 분화 조건을 달리 한 다음, 분화 효율 및 관련 유전자의 발현 형태를 살펴보았다(Fig. 3). 실제 비만과 관련성을 검증하기 위하여 분화 유도 조건을 달리하여 분화 유도 효율에 따른 관련 유전자의

발현 양상을 살펴보았다(Fig. 3). Figure 3의 연구 결과는 4가지 다른 조건의 분화 유도물질(조건1: Insulin+Dexamethasone+IBMX; 조건2: Insulin; 조건3: Dexamethasone; 조건4: IBMX)을 배양액에 각각 첨가하여 분화를 유도하고 이 유도물질의 차이에 의한 결과를 분석하였다. 그림에서 보는바와 같이 5번의 경우는 대조구이며 본 실험에서 RT-PCR 분석을 위하여 사용된 유전자는 GLUT4, Leptin, Insulin, PPAR1이며, 이 유전자들을 이용하여 발현율을 비교 분석하였다. 특징적으로 대조구에서 각 유도물질에 의하여 나타난 변화는 조건3의 dexamethasone만 처리하였을 때 다른 조건과 달리 Leptin의 발현율이 매우 높게 나타나고 있음을 볼 수 있었다. Leptin의 발현비율에 따라서 상대적으로 PPAR1의 발현비율이 증가함을 관찰할 수 있었다. 이와 반면에 실험군에서는 siRNA 실험에서 모든 조건에서 Leptin의 발현은 억제된 것으로 나타났다. 이 실험결과를 검증하기 위하여 분화된 지방세포를 Oil-red O를 통하여 염색한 후 살펴 본 결과 PCR 결과와 유사한 패턴을 보이고 있음을 확인하였다. 그러나 실험구와 대조구에서 본 것처럼 두 실험에서의 주요한 차이점은 siRNA를 통하여 Leptin의 유전자가 완벽하게 제어되고 있다는 사실이다. 이는 아마도 에스트로겐의 기능과 관련된 비만관련 유전자들이 여러 가지 신호전달 체계에서 서로 영향을 끼침으로써 표현된 것으로 판단된다. 에스트로겐의 생성은 단지 아로마테이즈에 의해서만 생성되지는 않는다. 아로마테이즈에 의하여 생성되는 에스트로겐이 어느정도 지방관련 유전자와 관련성을 맺으면서 지방세포 생성에 관여하는지가 주요한 연구 목적이었으며 본 연구는 siRNA를 통하여 다른 유전자의 신호전달경로를 저해하지 않고 CYP19A1을 제어함으로써 나타나는 현상을 알고 싶었다. 아로마테이즈 유전자 적중을 통하여 에스트로겐 생성을 조절하는 논문은 여러 편 발표되었으나 대부분 관여하는 유전자가 다양하고 이러한 연구들의 대부분은 호르몬 제어를 통하여 예상하지 못한 부작용에 대한 고려등이 배제되었다[9,12]. 본 연구에서

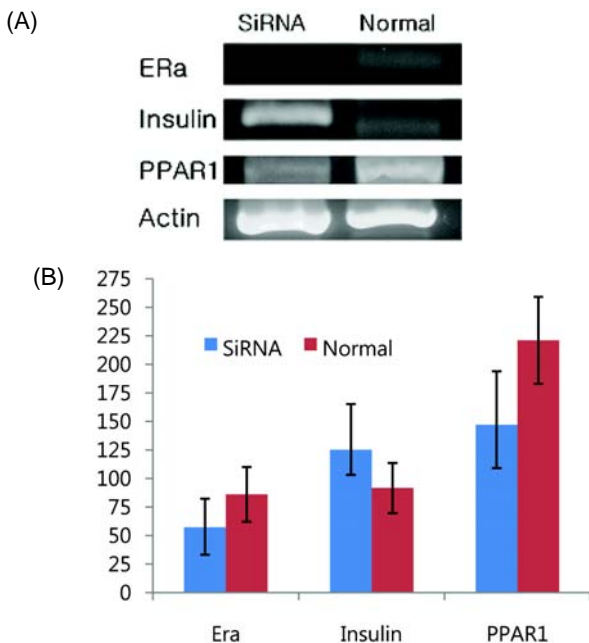


Fig. 2. Expression of adipocyte related genes in the differentiated 3T3-L1 after aromatase siRNA transfected into 3T3-L1. (A) RT-PCR results showed different density between siRNA treated group and normal control group. (B) Quantitation of expression in the treated group and normal control group.

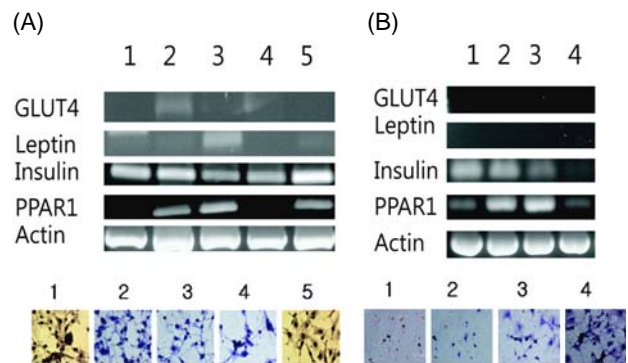


Fig. 3. Effect of 3T3-L1 cell differentiation after aromatase siRNA transfection. (A) Differentiation of 3T3-L1 cell without aromatase siRNA. (B) Differentiation of 3T3-L1 cell with aromatase siRNA.

는 주로 여성이 분만 후에 수유 기간과 호르몬 불균형 기간에 나타나는 비만에 주목하였으며 또한 폐경기 이후에 호르몬의 불균형에 의한 비만 현상을 설명하는 방법으로 에스트로겐의 인위적 조절이 비만 뿐만 아니라 다른 생리적 문제에 봉착할 수 있는 가능성에 입각하여 호르몬의 균형은 유지되면서 비만관련 유전자를 조절할 수 있는 기작이 아로마테이즈 유전자로부터 에스트로겐 생성의 신호전달체계 내에 존재할 것이라는 가설을 설정하였다. 그리고 이를 위하여 siRNA를 디자인하고 본 실험을 수행하게 되었다[7]. 이러한 가설을 토대로 본 실험을 통하여 알고자 했던 것은 아로마테이즈 유전자를 통하여 생성되는 에스트로겐 유전자가 인간의 호르몬 균형을 깨지 않은 상태에서 다른 지방 관련 유전자를 제어하고 이를 통하여 지방세포 분화를 억제할 수 있는지를 알고자 했으며, 그러므로써 Adiponectin과 Adipsin 유전자의 발현 양상에 의한 지방생성 메커니즘을 알 수 있었다 (Fig. 4). 사용된 siRNA는 총 3종류를 사용하였으나 siRNA #1의 경우 실험군에서는 어느 유전자도 발현되지 않는 현상이 나타났으며 대조구는 다른 실험군과 유사한 패턴을 보이고 있어서 본 연구 결과에는 배제하였다. 그리고 앞으로 추가 연구를 통하여 siRNA #1의 미발현 원인을 분석하고자 한다. 결과에서 살펴보면 Positive control (P) 과 일반 control (C)에서 동일한 패턴이 나타났으며 이는 실험의 전제조건에는 문제가 없음을 뜻한다. 그러나 #2와 #3의 siRNA 처리구와 미처리구의 실험에서는 Adiponectin의 발현이 미처리 대조구에 비하여 매우 높게 나타나고 있다. 이 결과는 Adiponectin의 세포내 기능과 비교해 볼때, 본 연구를 통하여 지방생성이 효과적으로 억제되고 있음을 확인 할 수 있는 결과이다. 그 이유는 Adiponectin의 경우는 많은 조직 생성에 내분비 조절자로서 지방의 지질제거와 분화에 관여하는 것으로 알려져 있다. 그러나 또한 지방생성에 관여하면서도 비만일 경우에는 발현이 억제되는 대표적인 유전자로 Fig. 4

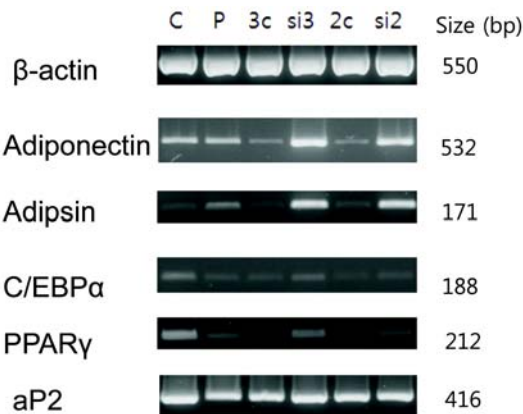


Fig. 4. RT-PCR analysis of aromatase siRNA treated 3T3-L1 cells after differentiation. All genes were selected adipocyte related genes from the Genebank

에서 보는 바와 같이 두 siRNA 실험구에서 동일하게 더 높게 나타나고 있음을 확인할 수 있었다. 일반적으로 지방의 경우 갈색지방의 경우 유익한 지방원으로 고려되고 있으며 백색지방의 비만원인과는 대별되는 지방의 산화를 통하여 에너지원으로 사용되므로 비만이 생성되지 않는 것으로 알려져 있다. 이를 통하여 아로마테이즈의 제어를 통하여 갈색지방 생성을 유도하는 효과를 가져올 수 있는 결과를 얻을 수 있었다. Adiponectin 유전자는 3개의 수용체를 가지고 있으며, 이중 R1, R2의 경우에는 7개의 domain을 가지고 다양한 조직에서 여러 유전자에 의하여 단백질을 생성한다[13]. 본 연구를 통하여 제어된 에스트로겐 호르몬의 양이 생리적 균형에 어떠한 영향을 미치는지를 통하여 부작용이 최소화된 비만치료 기작이 밝혀 질 수 있을 것으로 생각된다. 또한 본 실험에서 사용된 Adipsin 유전자의 경우에도 비만관련 유전자의 발현 억제시 또는 비만의 쥐나 인간에게서는 발현이 되지 않는 유전자로 알려져 있다. 그러나 본 연구에서는 아로마테이즈 억제 실험 결과 높은 발현율을 관찰 할 수 있었다. 이를 통하여 에스트로겐의 지방생성에 많은 비율로 관여함을 예상 할 수 있었으며 이는 호르몬의 전구물질을 조절함으로써 비만을 일정 정도 해결 할 수 있는 가능성을 보여 주는 결과라 생각된다.

요 약

본 연구는 에스트로겐 생성효소 유전자인 아로마테이즈 유전자의 siRNA를 이용하여 지방전구세포인 3T3-L1 세포의 지방세포 분화 시 나타나는 유전자의 발현을 검증하기 위하여 수행하였다. 먼저, CYP19A1 (aromatase)의 유전자로부터 siRNA를 3쌍을 디자인하고 이를 지방세포의 전구세포인 3T3-L1세포에 유전자 전이 한 후 분화 유도를 통하여 지방세포 생성의 메커니즘을 분석하였다. 결과적으로 비만의 원인 유전자인 렙틴 유전자의 발현 억제를 유도할 수 있었으며 특히적으로 인슐린과의 연관성이 매우 높음을 밝혀 낼 수 있었다. 그리고 비만 또는 백색지방 생성 시 발현이 억제되는 adiponectin과 adipsin의 과발현을 관찰할 수 있었다. 이 결과를 통하여 지방생성의 모든 신호전달체계 중 특정한 물질을 저해 하므로써 큰 부작용 없이 비만의 문제가 되는 지방생성을 일정 정도 제어 할 수 있음을 확인 할 수 있었다. 그러므로 이 결과는 앞으로 에스트로겐 결핍 또는 과발현에 의하여 문제가 되는 지방생성 메커니즘을 밝히는 연구에 중요한 단서가 될 것으로 기대된다.

References

1. Bouchard, C., J. P. Despres and P. Mauriege. 1992. Genetic and nongenetic determinants of regional fat distribution. *Endocr. Rev.* **14**, 72-93.
2. Carani, C., K. Qin, M. Simoni, M. Faustini-Fustini, S.

- Serpente, J. Boyd, K. Korach and E. R. Simpson. 1997. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *N. Engl. J. Med.* **337**, 91-95.
3. De Rodder, C. M., P. F. Brunung, M. L. Zonderland, J. H. Thijssen, J. M. Bonfrer, M. A. Blankenstein, I. A. Huisveld and W. B. Erich. 1990. Body fat mass, body fat distribution, and plasma hormones in early puberty in females. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **70**, 888-893.
 4. Elbers, J. M. H., H. Asscheman, J. C. Seidell and L. J. G. Gooren. 1999. Effects of sex steroid hormones on regional fat depots as assessed by magnetic resonance imaging in transsexuals. *Am. J. Physiol.* **276**, E317-E325.
 5. Fasshauer, M. and R. Paschke. 2003. Regulation of adipocytokines and insulin resistance. *Diabetologia.* **46**, 1594-1603.
 6. Gambacciani, M., M. Ciaponi, B. Cappagli, L. Piaggese, L. De Simone, R. Orlandi and A. R. Genazzani. 1997. Body weight, body fat distribution, and hormonal replacement therapy in early postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 414-417.
 7. Haarbo, J., U. Marslew, A. Gotfredsen and C. Christiansen. 1991. Postmenopausal hormone replacement therapy prevents central distribution of body fat after menopause. *Metab.* **40**, 1323-1326.
 8. Harada, N. 1988. Novel properties of human placental aromatase as cytochrome P-450: Purification and characterization of a unique form of aromatase. *J. Biochem.* **103**, 106-113.
 9. Heine, P. A., J. A. Taylor, G. A. Iwamoto, D. B. Lubahn and P. S. Cooke. 2000. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- α knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 12729-12734.
 10. Jiang, Z. Y., Q. L. Zhou, K. A. Coleman, M. Chouinard, Q. Boese and M. P. Czech. 2003. Insulin signaling through Akt/protein kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated gene silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 7569-7574.
 11. Jones, M. E., A. W. Thorburn, K. L. Britt, K. N. Hewitt, N. G. Wreford, J. Proietto, O. K. Oz, B. J. Leury, K. M. Robertson, S. Yao and E. R. Simpson. 2000. Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 12735-12740.
 12. Jones, M. E., A. W. Thorburn, K. L. Britt, K. N. Hewitt, M. L. Misso, N. G. Wreford, J. Proietto, O. K. Oz, B. J. Leury, K. M. Robertson, S. Yao and E. R. Simpson. 2001. Aromatase-deficient (ArKO) mice accumulate excess adipose tissue. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **79**, 3-9.
 13. Kadowaki, T. and T. Yamauchi. 2005. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrine Rev.* **26**, 439-451.
 14. Lemieux, S., D. Prud'homme, C. Bouchard, A. Tremblay and J. P. Despres. 1993. Sex differences in the relation of visceral adipose tissue accumulation to total body fatness. *Am. J. Clin. Nutr.* **58**, 463-467.
 15. Liao, W., M. T. Audrey Nguyen, T. Imamura, O. Singer, I. M. Verma and J. M. Olefsky. 2006. Lentiviral short hairpin ribonucleic acid-mediated knockdown of GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinol.* **147**, 2245-2252.
 16. Madsen, L., K. Rasmus, M. Petersen, B. Sorensen, C. Jorgensen, P. Hallenborg, L. Pridal, J. Fleckner, E. Amri II, P. Krieg, G. Furstenberger, R. K. Berge and K. Kristiansen. 2003. Adipocyte differentiation of 3T3-L1 preadipocytes is dependent on lipoxygenase activity during the initial stages of the differentiation process. *Biochem. J.* **375**, 539-549.
 17. Mitra, P., X. Zheng and M. P. Czech. 2004. RNAi-based analysis of CAP, Cbl, and CrkII function in the regulation of GLUT4 by Insulin. *J. Biol. Chem.* **279**, 37431-37435.
 18. Morishima, A., M. M. Grumbach, E. R. Simpson, C. Fisher and K. Qin. 1995. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**, 3689-3698.
 19. Nguyen, M. T., H. Satoh, S. Favelyukis, J. L. Babendure, T. Imamura, J. I. Sbodio, J. Zalevsky, B. I. Dahiyat, N. W. Chi and J. M. Olefsky. 2005. JNK and tumor necrosis factor-mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **280**, 35361-35371.
 20. Simpson, E. R., G. Rubin, C. Clyne, K. Robertson, L. O'Donnell, M. Jones and S. Davis. 2000. The role of local estrogen biosynthesis in males and females. *Trends in Endocrinol. and Metab.* **11**, 184-188.
 21. Trigatti, B., H. Rayburn, M. Vinals, A. Braun, H. Miettinen, M. Penman, M. Hertz, M. Schrenzel, L. Amigo, A. Rigotti and M. Krieger. 1999. Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 9322-9327.
 22. Wade, G. N. 1972. Gonadal hormones and behavioral regulation of body weight. *Physiol Behav.* **8**, 523-534.