

Characteristics of Purinergic Receptor Expressed in 3T3-L1 Preadipocytes

Hyung-Joo Lee¹†, Joon-Heum Baik¹†, Min-Jeong Kim¹†, Na-Hyun Kim² and In Deok Kong¹†

¹Department of Physiology, Yonsei University, Wonju College of Medicine, Gangwon-Do 220-701, Korea

[†]Graduate Student, Yonsei University, Wonju College of Medicine

²Department of Basic Nursing Science, College of Nursing, Keimyung University, Daegu 700-712, Korea

Extracellular ATP elicits diverse physiological effects by binding to the G-protein-coupled P2Y receptors on the plasma membrane. In addition to the short-term effects of extracellular nucleotides on cell functions, there is evidence that such purinergic signalling can have long-term effects on cell proliferation, differentiation and death. The 3T3-L1 cell line derived from mouse embryo is a well-established and commonly utilized *in vitro* model for adipocytes differentiation and function. However, the distributions and roles of P2Y subtypes are still unknown in the preadipocyte. In this study, we identified the distributions and roles of P2Y subtypes in preadipocyte using Ca²⁺ imaging and realtime PCR. ATP increased the [Ca²⁺]_i in a concentration-dependent manner. ATP increased Ca²⁺ in absence and/or presence of extracellular Ca²⁺. Suramin, non-selective P2Y blocker, largely blocked the ATP-induced Ca²⁺ response. U73122, a PLC inhibitor, completely inhibited Ca²⁺ mobilization in 3T3-L1 cells. The mRNA expression by realtime PCR of P2Y subtypes was P2Y₂:P2Y₅:P2Y₆=1.0:12.5:0.3. In conclusion, we showed that P2Y₅ receptor is a dominant purinergic receptor in preadipocytes, and multiple P2Y receptors could involve in differentiation and migration via regulating of intracellular calcium concentration.

Key Words: Preadipocyte, P2Y₅ receptor, Intracellular calcium

서 론

비만은 우리나라뿐만 아니라 전 세계적으로 주요 건강문제가 되고 있으며, 심혈관질환, 당뇨병, 암, 관절염 등과 같은 심각한 질환의 주요 원인으로 지목되고 있다. 이러한 인식에도 불구하고 비만은 점차로 증가하고 있는 추세이어서 비만과 관련된 세포, 조직, 기관, 계통 등 다양한 수준에서의 병태생리 기전탐색과 관련 인자의 규명이 시급한 실정이다.

최근 들어 비만에 대한 세포 및 세포 내 분자 수준에서 신호전달 경로를 규명하는 연구가 활발하게 이루어지고 있는데, 특히 지방조직의 주요 세포 성분인 지방간구세포 (preadipocyte) 및 지방세포 (adipocyte)의 증식, 분화, 이주 (migration) 등에 관련되는 조절기전들이 일부 보고되고 있다 (Gregoire et al., 1998; Tang et al., 1999;

Omatsu-Kanbe et al., 2006). 지방조직의 생성은 전구지방세포의 이주와 지방세포로의 분화를 거쳐 생성되므로 (Wasserman, 1965) 전구지방세포 이주의 증가는 지방세포의 증식을 유도하는 중요한 요소가 된다. 이 과정에서 일부 사이토카인 (Crandall et al., 2000; Kim et al., 2003), 인슐린 (Lee et al., 2005; Otto et al., 2005; Ho et al., 2006), ATP (Omatsu-Kanbe et al., 2006) 등은 전구지방세포에서 지방세포로의 분화를 촉진시키는 인자로 잘 알려져 있다.

ATP (adenosine 5'-triphosphate)는 세포 내에서 에너지 원으로 이용될 뿐 아니라 세포 외에서는 전령물질 (messenger)로 작용하면서 다양한 생리적 기능에 관여한다 (Burnstock, 1997). 세포 외액의 ATP와 같은 아데닌 뉴클레오티드는 세포 외막에 존재하는 퓨린성 수용체 (purinergic receptor)를 매개로 작용을 나타내며, 크게 P1 과 P2 (P2X와 P2Y) 수용체로 분류되는 퓨린성 수용체에는 다양한 아형 (subtype)이 포함되고, 퓨린성 신호전달 특성은 각 아형 특이적으로 나타난다 (Burnstock, 2007). 현재까지 포유류에서 클로닝된 P2Y 수용체에는 P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₅, P2Y₆, P2Y₁₀, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄ 등의 아형들이 보고되어 있다 (Janssens et al., 1997;

*접수일: 2009년 11월 26일 / 수정일: 2009년 12월 14일

채택일: 2009년 12월 15일

†교신저자: 공인덕, (우) 220-701 강원도 원주시 일산동 162, 연세대학교 원주과대학 생리학교실

Tel: 033-741-0292, e-mail: kong@yonsei.ac.kr

Ralevic and Burnstock, 1998; Fries et al., 2004). 이 중 P2Y₁, 2, 4, 6 수용체는 사람에게서 클로닝 되어 왔고 기능적으로 활성화된 형태라고 알려져 있는 반면 (Ralevic and Burnstock, 1998; Sak and Webb, 2002; Abbracchio et al., 2003) 그 외 아형들, 특히 P2Y₅와 P2Y₁₀, 그리고 최근에 보고된 P2Y₁₂, 13, 14 아형들에 대해서는 아직 알려진 바가 적다 (Murakami et al., 2008; Pasternack et al., 2008).

퓨린성 수용체는 포유동물의 다양한 장기와 뼈, 지방 등과 같은 조직에 광범위하게 분포하고 있으면서 (Fries et al., 2004) 세포의 증식과, 분화, 세포사멸 등과 같은 생리적 기전을 유도하거나 촉진한다 (Abbracchio and Burnstock, 1998). 특히, ATP는 흰색지방세포 및 갈색지방세포 모두에서 공통적으로 세포질 내 칼슘농도를 조절하여 다양한 생리적 기능에 관여한다 (Kelly et al., 1989; Omatsu-Kanbe et al., 2004). 구체적으로 흰색지방세포에서는 포도당이동 (Halperin et al., 1978) 및 글리코겐 합성 (Tamura et al., 1983), 지방분해 (Schmidt and Loffler, 1998), 인슐린작용 (Hashimoto et al., 1987)을 매개하고, 갈색지방세포에서는 세포증식 (Wilson et al., 1999), 세포막을 통한 물질이동 (Pappone and Lee, 1996), 세포골격 조직 (Omatsu-Kanbe et al., 2004) 등을 유도한다.

이상과 같이 ATP를 매개로 한 퓨린성 신호전달은 지방세포에서 광범위한 생리적 조절기전에 관여하고 있음이 잘 알려져 있으나 퓨린성 수용체 아형의 발현 특성에 대해서는 알려진 바가 적다. 특히, 최근 들어 ATP가 P2Y 수용체를 활성화시켜 전구지방세포의 이주와 지방세포로의 분화를 촉진하는 것으로 보고되었지만 (Omatsu-Kanbe et al., 2006) 지방전구세포막에 발현되어 있을 퓨린성 수용체 아형의 발현 특성 및 기전에 대해서는 아직 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 전구지방세포를 대상으로 여기에 발현되어 있는 퓨린성 수용체의 발현 특성을 규명하고 전구지방세포에서의 퓨린성 신호전달기전의 일부를 탐색해 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 모델 세포주 및 배양

본 연구에서 사용한 전구지방세포인 3T3-L1 세포는 마우스 태아에서 분리한 것으로 미국 세포주 은행 (ATCC)에서 분양받아 사용하였다. 3T3-L1 세포는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)에 10% 우 혈청 (Bovine Serum, BS) 및 100,000 unit/L penicillin이 첨가된 배지에서

배양하였다. 세포주는 ATCC의 프로토콜에 따라 3~4일 간격으로 배지를 갈아주었고 7일을 주기로 계대배양 하였다.

2. 실험용액 및 약물

1) 실험용액

칼슘 이미징 실험을 위한 세포 외 관류액 (external solution; PSS)의 조성 (mM)은 135 NaCl, 5 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 10 glucose (pH 7.4)이었다.

2) 약물

우 혈청 및 antimycotic-antibiotics는 Gibco BRL로부터, fura-2/AM은 Molecular probes로부터 각각 구입하였고, DMEM, ATP, U-73122, U-73343, suramin은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Fura-2/AM과 U-73122, U-73343은 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 사용하였고, 그 외의 모든 시약은 3차 증류수에 녹여 사용하였다.

3. 세포 내 칼슘이온농도 ([Ca²⁺]) 측정

세포 내 칼슘이온농도 ([Ca²⁺])의 측정은 선행연구에서 보고된 방법을 따랐으며 (Kim et al., 2007), 구체적인 방법은 다음과 같다. 세포 내 칼슘이온농도는 형광 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)과 이에 연결된 형광측정장치 (Ratio Fluorescence system; Photon Technology International Inc., Lawrenceville, NJ, USA)를 이용하였다. 이 시스템에는 형광염료가 부하된 세포를 여기 (excitation) 시키기 위한 arc lamp housing과 작은 크기의 형광 신호를 증폭시킬 수 있는 photomultiplier 튜브 (PMT tube), 그리고 특정 파장의 빛을 통과시킬 수 있는 필터로 구성되어 있다. 형광의 신호들의 측정 및 분석은 FeliX 소프트웨어 (Photon Technology International Inc., Lawrenceville, NJ, USA)를 통해서 실시하였다.

이온 농도를 측정하기 위해서는 이온들과 결합하여 형광 특성을 보이는 형광염료 (fluorescence dye)를 세포 내에 부하시킨 뒤 형광 현미경을 통해 방출되는 형광의 세기를 분석하게 되는데, 본 연구에서는 칼슘의 농도를 반영하는 형광염료인 fura-2/AM을 사용하였다. 실험 방법은 3T3-L1 세포가 있는 배양접시에 fura-2/AM를 5 μM 농도로 처리하여 실온에서 빛이 차단된 상태로 30~60 분간 두어 세포 내로 부하시켰다. 부하가 끝나면 세포 외 관류액으로 2회 세척한 다음 현미경위에 올려놓고, 약물이 포함된 관류액을 중력에 의해 1~2 ml/min 속도로

Table 1. Primer sequences for realtime PCR of P2Y receptors

Primer		Sequence	Accession code	Size (bp)
GAPDH	Sense	5'-CTGGAGAAACCTGCCAAGTA-3'	M32599	130
	Antisense	5'-AGTGGGAGTTGCTGTTGAAG-3'		
P2Y ₁	Sense	5'-CTGATCTTGGGCTGTTATGG-3'	NM_008772	109
	Antisense	5'-CCGTCAGGACAATTATCACC-3'		
P2Y ₂	Sense	5'-CTGCACAGGCCTAACAGAAC-3'	NM_008773	106
	Antisense	5'-GCCGAATGTCCTTAGTCTCA-3'		
P2Y ₄	Sense	5'-TTTTCTCACCTGCATCAGT-3'	NM_020621	110
	Antisense	5'-CCAAACACCTAGGCAGAGAA-3'		
P2Y ₅	Sense	5'-ACTCTGTACGGGTGCATGTT-3'	NM_175116	95
	Antisense	5'-CTCACTTTGAGGGCACAGAT-3'		
P2Y ₆	Sense	5'-TCCTCACCTGCATTAGCTTC-3'	AF298899	110
	Antisense	5'-CCACACGACTCCACACACTA-3'		
P2Y ₁₀	Sense	5'-GCCTTGCAAGTCTCTGTTGT-3'	NM_172435	93
	Antisense	5'-CAGAGCTTCCATGACGAGAT-3'		
P2Y ₁₂	Sense	5'-CACCTATGGCTTACGTCAC-3'	NM_027571	108
	Antisense	5'-GAGTTTGAGCACCTCAGCAT-3'		
P2Y ₁₃	Sense	5'-CGGTGATTACCAAAAAGGTG-3'	NM_028808	107
	Antisense	5'-AAAGAAGACAGCCATGACGA-3'		
P2Y ₁₄	Sense	5'-GGAACACCCTGATCACAAAG-3'	NM_133200	112
	Antisense	5'-GAGCTGGGCACATAAAAGAA-3'		

로 관류시켰다. 이때 나타나는 형광세기의 변화를 기록 및 분석하였는데, fura-2의 형광 특성상 340 nm와 380 nm의 빛으로 번갈아 가며 여기시켰을 때 510 nm로 방출 (emission)되는 형광강도의 비율 (F_{340}/F_{380})이 세포 내 이온농도를 반영하게 된다.

4. 실시간 역전사 연쇄 중합반응 (Realtime RT-PCR)

선행연구에서 보고된 Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 추출 방법을 이용하여 3T3-L1 세포로부터 전체 RNA를 분리하였다 (Chomczynski and Sacchi, 1987). 먼저 세포를 guanidinium thiocyanate buffer로 용해시킨 다음 페놀 및 클로로포름을 가하여 얼음 위에서 15분 이상 세워두었다. 이를 4°C에서 10,000 xg로 15분간 원심 분리한 후 상층액을 조심스럽게 취하여 동량의 isopropanol과 잘 섞은 뒤 -70°C에서 1시간 이상 세워두어 RNA를 침전시켰다. 다시 4°C에서 10,000 xg로 15분간 원심 분리하여 RNA 침전물을 얻었으며, 이를 75% ethanol로 씻어낸 후 원심 분리하여 RNA 시료를 얻었다.

정량한 1 µg의 RNA를 1 mM dNTP, 50 µM oligod (T), 20 U RNase inhibitor와 50 U murine leukemia virus reverse transcriptase (Perkin-Elmer, Shelton, CT, USA)와 함께 37°C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 이어 실시간 역전사 연쇄 중합반응은 관련 유전자에 대한 primer를 이용하여 적당한 조건에서 이루어졌으며 이들의 염기 서열은 Table 1에 제시하였다. 내부대조군은 GAPDH의 cDNA를 PCR로 증폭시켰다. 합성된 총 cDNA 50 mg과 1X QUANTITECT SYBR Green PCR Master Mix, 0.5 µM primer pairs를 섞어 혼합물을 제작하였다. 준비된 혼합물을 95°C 15분 동안 예열한 후 95°C 15초, 58°C 30초, 72°C 30초의 주기로 45회 반복 실시간 역전사 연쇄 중합반응을 수행하였고 (Rotor-Gen 3000 thermal cycler, Corbett Research, USA) 55°C에서 99°C까지의 온도로 용해곡선을 그려 primer의 특이성을 확인하였다. 결과는 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 공식을 적용하여 상대적 비의 변화를 표현하였다 (Livak and Schmittgen, 2001).

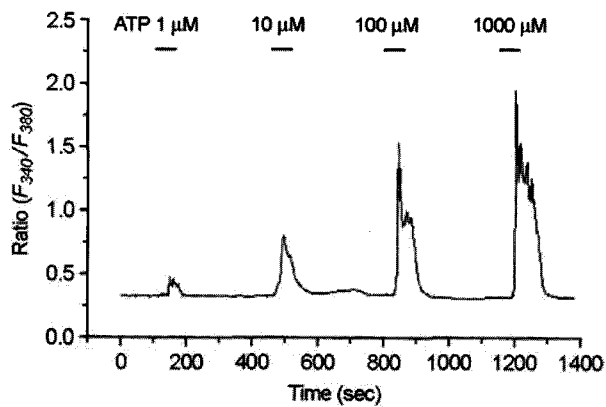


Fig. 1. A representative tracing of ATP-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in 3T3-L1 cells. ATP increased intracellular free calcium ion concentration in dose-dependent manner. $[Ca^{2+}]_i$ changes were expressed as intensity ratio of emission light excited at 340 and 380 nm (F_{340}/F_{380}). Data are presented as means \pm SEM, solid bar=the duration for applying ATP.

5. 결과 및 자료분석

결과는 평균 (Mean)과 표준오차 (SEM)로 나타내었으며, 통계적인 의미는 unpaired t-test로 검증하여, P 값이 0.05 이하일 때를 유의한 차이가 있다고 간주하였다. 결과에서 제시한 그림에서 실험횟수는 N 으로, 세포 수는 n 으로 표기하였다.

결 과

1. ATP에 의한 세포 내 칼슘이온농도 변화

Fura-2/AM으로 부하된 3T3-L1 세포들에 ATP 투여 시 대부분의 세포들 (80% 이상)에서 일시적인 세포 내 칼슘이온농도의 증가가 뚜렷이 관찰되었으며, ATP에 의한 세포 내 칼슘이온은 농도 의존적으로 증가하였다 (Fig. 1).

ATP 투여 후 일시적 세포 내 칼슘이온농도 증가가 세포 외 칼슘유입 때문인지, 세포 내 칼슘저장소 (endoplasmic reticulum, ER)로부터 동원되는 것인지를 알아보기 위하여 세포 외 칼슘을 제거한 Ca^{2+} -free ($0 Ca^{2+}$) 관류액을 5분간 전처리한 후 ATP에 의한 세포 내 칼슘이온농도의 변화를 관찰하였다 (Fig. 2A). 실험결과 세포 외 칼슘이 제거된 조건에서도 ATP에 의한 세포 내 칼슘이온농도 증가는 대조군과 비슷하게 유지되어 통계적 유의성은 없었다 (Fig. 2B). 이 결과로 세포 외 칼슘은 ATP에 의한 세포 내 칼슘이온농도에는 영향을 미치지 않은 것으로 확인하였다. 이와 같은 결과는 ATP에 의한 칼슘 증가가 세포 외부의 칼슘과는 무관하게 세포 내 칼슘저

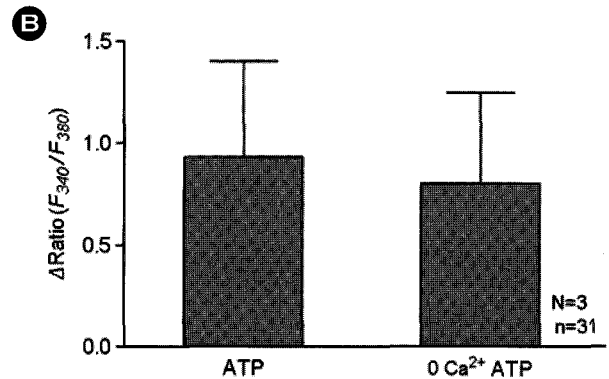
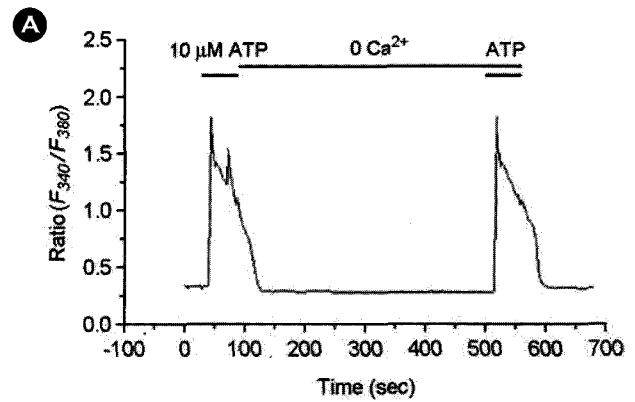


Fig. 2. Effects of extracellular Ca^{2+} on ATP-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in 3T3-L1 cells. $100 \mu M$ ATP increased intracellular free calcium ion concentration, which response did not change even under the condition of no existence of external Ca^{2+} . n =total cell number, N =experimental number, solid bar=the duration for applying ATP.

장소로부터의 동원에 의함을 시사한다.

다음으로는 ATP에 의한 세포 내 칼슘동원 기전을 확인하고자 PLC 경로 차단제인 U-73122 $2 \mu M$ 을 사용하여 대조군과 비교하였다. U-73122를 5분 동안 전처리 후 ATP에 의한 세포 내 칼슘반응이 완전히 차단되었다 (Fig. 3A, B). 반면에, U-73122의 구조적 유사체 (isoform)인 U-73343 $2 \mu M$ 를 동일시간 전처리한 경우 ATP에 의한 칼슘이온의 증가는 영향을 받지 않았다 (Fig. 3C, D). 따라서 이와 같은 결과들을 종합해 볼 때 ATP에 의한 퓨린성 수용체 활성화의 주요 기전은 PLC 경로를 통한 세포 내 칼슘저장소로부터의 칼슘 동원임을 확인할 수 있었다.

2. 퓨린성 수용체 길항제에 의한 세포 내 칼슘이온농도 변화

ATP에 의한 세포 내 칼슘이온의 증가가 P2Y 수용체를 매개하는지 확인하기 위해, P2Y 수용체 비선택적인

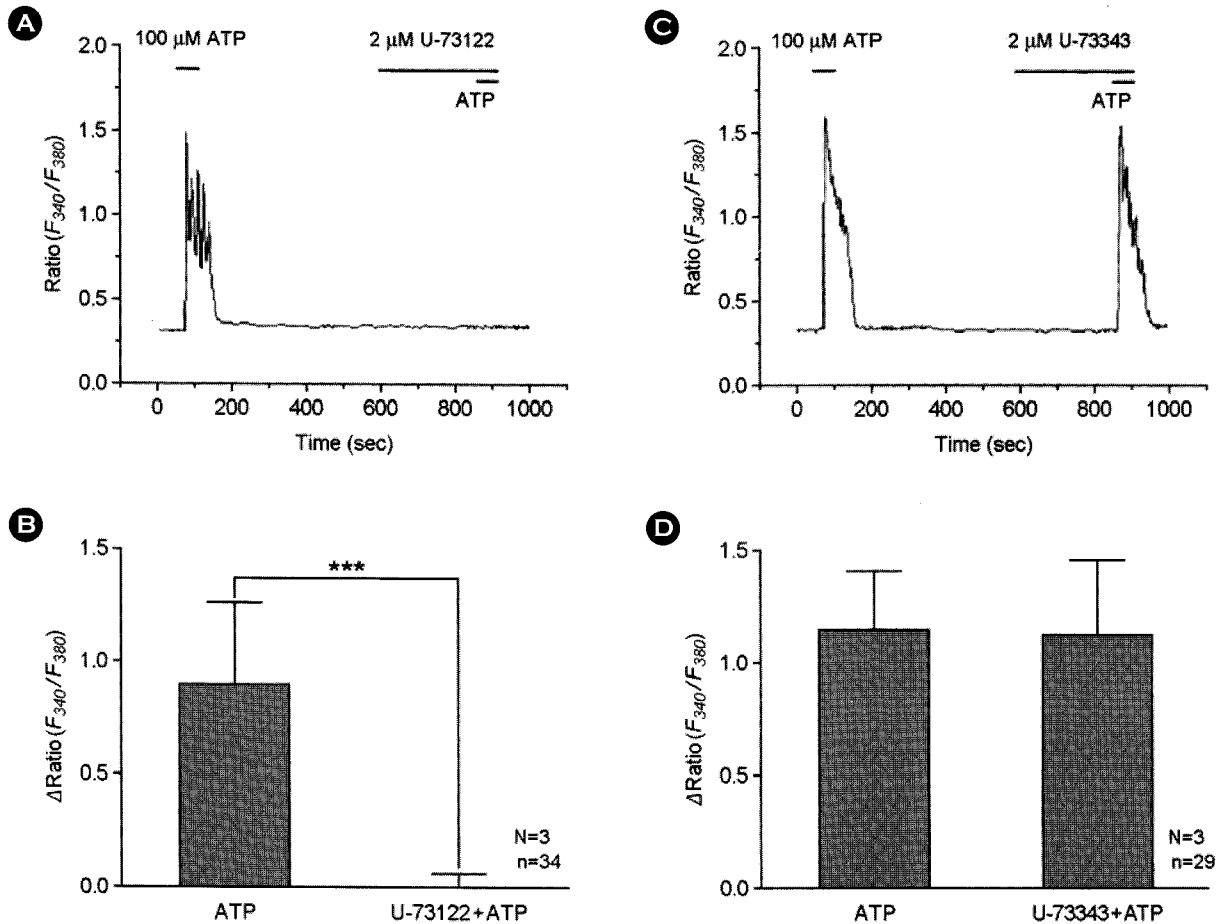


Fig. 3. Selective involvement of PLC-dependent pathways in ATP-induced calcium transient. Original traces (A and C) and histograms (B and D) showing a significant suppression of 100 μ M ATP-induced calcium transient after pretreatment with 2 μ M U-73122, a PLC inhibitor, but not after pretreatment with 2 μ M U-73343, the succinimide analog of U-73122. Drugs were applied for 60 s or for 5 min as indicated by thick bars. n=total cell number, N=experimental number, *** indicates $P<0.001$.

길항제인 suramin (1 mM)을 사용하여 $[Ca^{2+}]_i$ 을 관찰하였다. ATP에 의한 세포 내 칼슘반응은 suramin 전처리 후에는 대부분 ($92.23 \pm 4.9\%$) 억제되었다 (Fig. 4).

3. P2Y 수용체 아형의 발현 특성

약물학적 방법을 통해 전구지방세포에서 세포 내 신호 전달기전이 주로 P2Y 퓨린성 수용체에 의해 이루어지고 있음을 확인한 후, 3T3-L1 세포막에 발현되어 있는 P2Y 수용체 아형을 규명하고자 하였다. 전구지방세포로부터 RNA를 분리한 다음, 특정 아형에 선택적인 primer를 이용하여 실시간 역전사 연쇄 증합반응을 실시하였다. Fig. 5에서 나타난 바와 같이 3T3-L1 전구지방세포에는 P2Y₂, P2Y₅, P2Y₆가 발현되어 있었으며, 이 중에서 P2Y₅의 발현 양이 상대적으로 현저하게 높았다. 각 퓨린성 수용체 아형별 발현비율은 P2Y₂:P2Y₅:P2Y₆=1.0:12.5:0.3의 크기로 측정되었다 (Fig. 5).

고 찰

본 연구에서는 세포 내 칼슘이온의 측정기법과 분자생물학적 기법을 활용하여 전구지방세포인 3T3-L1 세포에 발현된 P2Y 수용체의 아형을 확인하고 이를 통한 퓨린성 신호전달기전을 탐색해 보고자 하였다.

세포 내 칼슘신호전달과 관련하여 일반적으로 P2Y 수용체의 특징은 세포 외부의 칼슘이온과는 무관하게, 주로 G-단백 (G_{q11})을 매개로 세포 내 칼슘이온 저장소로부터 칼슘이온을 동원하는 것으로 알려져 있다 (Janssens et al., 1997; Ralevic and Burnstock, 1998; Fries et al., 2004). 3T3-L1 세포를 대상으로 한 본 연구 결과에서도 세포 외액으로 ATP를 투여하였을 때 일시적인 세포 내 칼슘이온의 증가를 나타내었는데, 이와 같은 반응은 세포 외액의 칼슘이온에 무관하게 나타났으며, ATP에 의한 세포

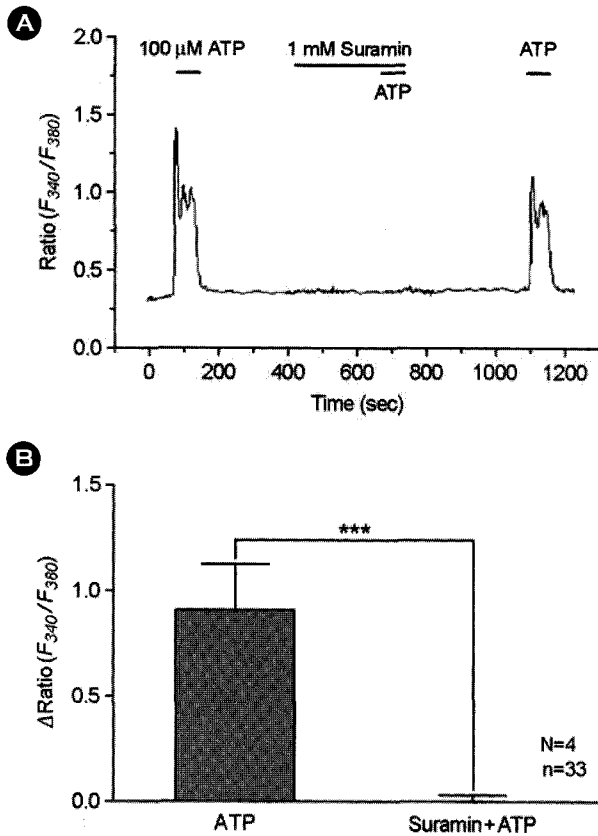


Fig. 4. Effect of suramin on ATP-induced calcium transient in 3T3-L1 cells. Original trace (A) and histogram (B) showing a complete suppression of maximal amplitude of 100 μ M ATP-induced calcium transient after pretreatment with 1 mM suramin for 5 min. n=total cell number, N=experimental number, *** indicates $P<0.001$.

내 칼슘이온농도의 증가는 비선택적인 퓨린 수용체 길항제인 suramin에 의해 대부분 억제되었다. P2Y 퓨린성 수용체 중 대표적으로 P2Y_{1, 2, 4, 6}는 주로 PLC 경로를 통한 IP₃의 생성에 의해 칼슘조절에 관여하는데 (von Kügelgen, 2006), 본 실험의 결과에서 ATP에 의한 세포 내 칼슘이온 증가는 농도 의존적이었으며, PLC 억제제인 U-73122에 의해 선택적으로 그 효과가 봉쇄는 것으로 보아 세포 내 칼슘이온의 증가는 전적으로 PLC 의존적인 경로를 통해 이루어짐을 알 수 있었다. 따라서 전구지방세포막에 발현되어 있는 P2Y 퓨린성 수용체는 PLC 신호전달 경로를 통해 세포 내 칼슘저장소로부터 칼슘을 동원하여 세포질 내 칼슘농도를 증가시킴으로써 전구지방세포의 이주를 촉진하고 지방세포로의 분화를 유도하는 것으로 (Omatsu-Kanbe et al., 2006) 보인다.

한편, 분자생물학적 방법을 통해 전구지방세포막에 발현되어 있는 퓨린성 수용체 아형 발현 특성을 분석해 본 결과 3T3-L1 세포막에는 P2Y₂, P2Y₅ 및 P2Y₆ mRNA가

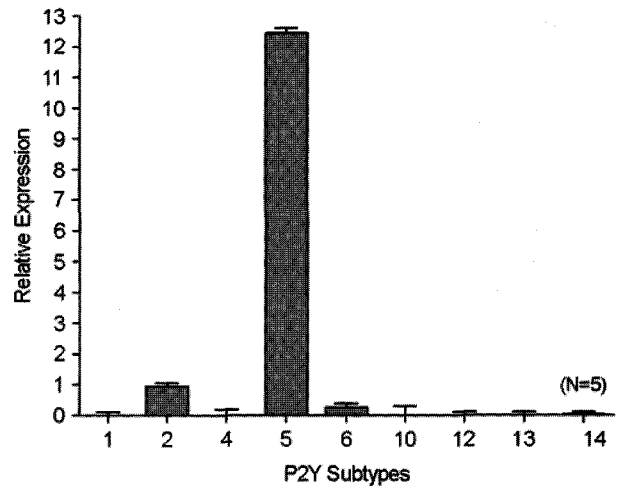


Fig. 5. Relative quantitation of P2Y receptors by quantitative realtime PCR. Reverse-transcribed products were screened by PCR in the presence of cDNA for β -actin, P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₅, P2Y₆, P2Y₁₀, P2Y₁₂, P2Y₁₃, and P2Y₁₄. Each sample was analyzed in triplicate, and data points were used to calculate the average of the three. Data are each expressed as the mean \pm SEM. The relative gene expression P2Y₂, P2Y₅, and P2Y₆ was 1.0:12.5:0.3.

발현되어 있는 것으로 나타났다. 이 중 P2Y_{2, 6} 아형의 퓨린성 수용체들은 대부분 인간을 비롯하여 포유동물 조직에서 널리 분포하며 기능적으로 활성화되어 있는 아형들이다 (Ralevic and Burnstock, 1998; Sak and Webb, 2002; Abbracchio et al., 2003; Fries et al., 2004; Pasternack et al., 2008). 특이한 점은 전구지방세포에 P2Y₅ 수용체 아형이 발현되어 있다는 사실과, 발현비율이 P2Y₂:P2Y₅:P2Y₆=1.0:12.5:0.3 크기로 P2Y₅의 발현량이 상대적으로 가장 높았다는 점이다. 현재까지 보고된 바에 의하면 P2Y₅ 수용체는 머리카락 (Pasternack et al., 2008; Yanagida et al., 2009), 골모세포 (Ihara et al., 2005), 백혈구 (Berchtold et al., 1999; Yoon et al., 2006) 등에 발현되어 있으며, G-단백 연관 수용체라는 사실 이외에는 다른 P2Y 수용체 아형에 비해 생리적 및 병태생리적 작용기전에 대해 잘 알려져 있지 않다 (Pasternack et al., 2008). 따라서 전구지방세포에서 P2Y₅ 수용체 mRNA가 발현되어 있는 점은 그동안 알려지지 않은 사실로, 추후 체내 지방의 축적이나 비만을 유발하는 과정에 P2Y₅ 퓨린성 수용체가 어떤 역할을 하는지를 규명해 볼 필요가 있겠다.

최근 P2Y₅ 수용체와 관련된 신호전달 과정과 역할에 대한 흥미로운 보고로, 인간 머리카락의 성장과 소실 및 탈모와 관련된 유전자로 알려지고 있으며, 생체 내에서의 작용기전은 cAMP 증가를 통한 세포의 증식, 분화 및 생존에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다

(Pasternack et al., 2008; Yanagida et al., 2009). 본 실험을 통하여 전구지방세포막에 발현된 P2Y 수용체 아형의 발현 특성을 처음 확인하였으며, 특히 세포 내 칼슘이온 측정법을 활용하여 기능적 평가를 함께 할 수 있었다. 따라서 전구지방세포에서 P2Y₅ 수용체를 확인한 것은 최초의 일로 매우 의미 있는 결과라 하겠다. 다만, 아직 P2Y₅ 수용체에 대한 선택적인 효현제나 봉쇄제가 알려져 있지 않고 (Janssens et al., 1997; von Kügelgen, 2006), P2Y₅ 수용체가 어떠한 기전을 통해 생리적 기능에 관여하는지는 확인할 수 없었다. 기존 연구결과에 따르면 지방전구세포의 P2Y 수용체가 분화 및 세포 이주에 중요한 공동인자 (cofactor)로 알려져 있고, 여기에 PLC-의존적인 기전이 필요함이 확인되었기에 P2Y₅가 전구지방세포의 직접적인 증식과 분화에 관여할 가능성에 대해서는 추후 연구가 필요하겠다. 향후 siRNA 혹은 과발현 기법 등을 활용하여 P2Y₅ 수용체의 발현을 억제시키거나, 혹은 크게 발현량을 높였을 때 세포 내 칼슘이온농도 혹은 cAMP 등에 미치는 효과를 측정한다면 보다 직접적인 결과를 설명할 수 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과를 바탕으로 유추하여 볼 때 P2Y 수용체의 활성화는 전구지방세포에서는 세포 내 칼슘이온농도를 증가시켜, 세포의 증식, 이주 및 분화를 촉진시킴으로써 지방대사 조절에 관여하며, 지방세포의 발달과 성숙에 기여할 것으로 추측하였다. 본 실험을 통해 얻어진 새로운 연구 결과는 향후 지방세포의 생리적 및 병태생리적 기능을 이해하고 비만의 기전을 설명할 수 있는 중요한 기초자료로서 의의가 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

- Abbracchio MP, Burnstock G. Purinergic signaling: Pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol*. 1998. 78: 113-145.
- Abbracchio MP, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Miras-Portugal MT, et al. Characterization of the UDP-glucose receptor(re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci*. 2003. 24: 52-55.
- Berchtold S, Ogilvie AL, Bogdan C, Mühl-Zürbes P, Ogilvie A, Schuler G, Steinkasserer A. Human monocyte derived dendritic cells express functional P2X and P2Y receptors as well as ecto-nucleotidases. *FEBS Lett*. 1999. 458: 424-428.
- Burnstock G. The past, present, and future of purine nucleotides as signaling molecules. *Neuropharmacology*. 1997. 36: 1127-1139.
- Burnstock G. Purine and Pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci*. 2007. 64: 1471-1483.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Annal Biochem*. 1987. 162: 156-159.
- Crandall DL, Busler DE, McHendry-Rinde B, Groeling TM, Kral JG. Autocrine regulation of human preadipocyte migration by plasminogen activator inhibitor-1. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000. 85: 2609-2614.
- Fries JE, Wheeler-Schilling TH, Guenther E, Kohler K. Expression of P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, and P2Y₆ receptor subtypes in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004. 45: 3410-3414.
- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*. 1998. 78: 783-809.
- Halperin ML, Mak ML, Taylor WM. Control of glucose transport in adipose tissue of the rat: role of insulin, ATP and intracellular metabolites. *Can J Biochem*. 1978. 56: 708-712.
- Hashimoto N, Robinson FW, Shibata Y, Flanagan JE, Kono T. Diversity in the effects of extracellular ATP and adenosine on the cellular processing and physiologic actions of insulin in rat adipocytes. *J Biol Chem*. 1987. 262: 15026-15032.
- Ho M, Foxall S, Higginbottom M, Donofrio DM, Liao J, Richardson PJ, Maneuf YP. Leptin-mediated inhibition of the insulin-stimulated increase in fatty acid uptake in differentiated 3T3-L1 adipocytes. *Metabol Clin Exp*. 2006. 55: 8-12.
- Ihara H, Hirukawa K, Goto S, Togari A. ATP-stimulated interleukin-6 synthesis through P2Y receptors on human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005. 326: 329-334.
- Janssens R, Boeynaems JM, Godart M, Communi D. Cloning of a human heptahelical receptor closely related to the P2Y₅ receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997. 236: 106-112.
- Kim CS, Kawada T, Yoo H, Kwon BS, Yu R. Macrophage inflammatory protein-related protein-2, a novel CC chemokine, can regulate preadipocyte migration and adipocyte differentiation. *FEBS Lett*. 2003. 548: 125-130.
- Kim DR, Ahn SW, Park QS, Kong ID. Regulation of nicotinic acetylcholine receptor by tyrosine kinase in autonomic major pelvic ganglion neurons. *J Exp Biomed Sci*. 2007. 13: 119-125.
- Kim DR, Kong ID. Characteristics of purinergic receptors expressed in human retinoblastoma cells. *J Exp Biomed Sci*. 2007. 13: 333-339.
- Kelly KL, Deeney JT, Corkey BE. Cytosolic free calcium in

- adipocytes. *J Biol Chem.* 1989. 264: 12754-12757.
- von Kügelgen I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y receptor subtypes. *Pharmacol Ther.* 2006. 110: 415-432.
- Lee H, Jun DJ, Suh BC, Choi BH, Lee JH, Do MS, Suh BS, Ha HJ, Kim KT. Dual Roles of P2 Purinergic Receptors in Insulin-stimulated Production and Lipolysis in Differentiated Rat White Adipocytes Leptin. *J Bio Chem.* 2005. 280: 28556-28563.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods.* 2001. 25: 402-408.
- Murakami M, Shiraishi A, Tabata K, Fujita N Identification of the orphan GPCR, P2Y(10) receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res.* 2008. 371: 707-712.
- Omatsu-Kanbe M, Shibata M, Yamamoto T, Isono T, Matsuura H. Actin filaments play a permissive role in the inhibition of store-operated Ca²⁺ entry by extracellular ATP in rat brown adipocytes. *Biochem J.* 2004. 381(Pt 2): 389-396.
- Omatsu-Kanbe M, Inoue K, Fujii Y, Yamamoto T, Isono T, Fujita N, Matsuura H. Effect of ATP on preadipocyte migration and adipocyte differentiation by activating P2Y receptors in 3T3-L1 cells. *Biochem J.* 2006. 393: 171-180.
- Otto TC, Lane MD. Adipose Development: From Stem Cell to Adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2005. 40: 229-242.
- Pappone PA, Lee SC. Purinergic receptor stimulation increases membrane trafficking in brown adipocytes. *J Gen Physiol.* 1996. 108: 393-404.
- Pasternack SM, von Kügelgen I, Aboud KA, Lee YA, Rüschemdorf F, Voss K, Hillmer AM, Molderings GJ, Franz T, Ramirez A, Nürnberg P, Nöthen MM, Betz RC. G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. *Nat Genet.* 2008. 40: 329-334.
- Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 1998. 50: 413-492.
- Sak K, Webb TE. A retrospective of recombinant P2Y receptor subtypes and their pharmacology. *Arch Biochem Biophys.* 2002. 397: 131-136.
- Schmidt M, Löffler G. Induction of aromatase activity in human adipose tissue stromal cells by extracellular nucleotides. Evidence for P2-purinoreceptors in adipose tissue. *Eur J Biochem.* 1998. 252: 147-154.
- Tamura S, Dubler RE, Larner J. Stimulation of maximal intracellular insulin action on glycogen synthase by preincubation of adipocytes with adenosine 5-triphosphate. *J Biol Chem.* 1983. 258: 719-724.
- Tang QQ, Lane MD. Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancer-binding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocyte differentiation. *Genes.* 1999. 13: 2231-2241.
- Wilson SM, Barsoum MJ, Wilson BW, Pappone PA. Purine nucleotides modulate proliferation of brown fat preadipocytes. *Cell Prolif.* 1999. 32: 131-140.
- Yanagida K, Masago K, Nakanishi H, Kihara Y, Hamano F, Tajima Y, Taguchi R, Shimizu T, Ishii S. Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA6. *J Biol Chem.* 2009. 284: 17731-17741.
- Yoon MJ, Lee HJ, Kim JH, Kim DK. Extracellular ATP induces apoptotic signaling in human monocyte leukemic cells, HL-60 and F-36P. *Arch Pharm Res.* 2006. 29: 1032-1041.