

3T3-L1 세포의 지방세포형성과정에서 Baicalin에 의한 유전자 발현 프로파일 분석

이해용¹ · 강련화¹ · 정상인¹ · 조수현² · 윤유식^{1*}

¹중앙대학교 의과대학 미생물학교실

²중앙대학교 용산병원 가정의학과

Effects of Baicalin on Gene Expression Profiles during Adipogenesis of 3T3-L1 Cells

Haeyong Lee¹, Ryunhwa Kang¹, Sang-In Chung¹, Soo Hyun Cho², and Yoosik Yoon^{1*}

¹Dept. of Microbiology, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul 156-756, Korea

²Dept. of Family Medicine, Yongsan Hospital, Chung-Ang University, Seoul 140-757, Korea

Abstract

Baicalin, a flavonoid, was shown to have diverse effects such as anti-inflammatory, anti-cancer, anti-viral, anti-bacterial and others. Recently, we found that the baicalin inhibits adipogenesis through the modulations of anti-adipogenic and pro-adipogenic factors of the adipogenesis pathway. In the present study, we further characterized the molecular mechanism of the anti-adipogenic effect of baicalin using microarray technology. Microarray analyses were conducted to analyze the gene expression profiles during the differentiation time course (0 day, 2 day, 4 day and 7 day) in 3T3-L1 cells with or without baicalin treatment. We identified a total of 3972 genes of which expressions were changed more than 2 fold. These 3972 genes were further analyzed using hierarchical clustering analysis, resulting in 20 clusters. Four clusters among 20 showed clearly up-regulated expression patterns (cluster 8 and cluster 10) or clearly down-regulated expression patterns (cluster 12 and cluster 14) by baicalin treatment for over-all differentiation period. The cluster 8 and cluster 10 included many genes which enhance cell proliferation or inhibit adipogenesis. On the other hand, the cluster 12 and cluster 14 included many genes which are related with proliferation inhibition, cell cycle arrest, cell growth suppression or adipogenesis induction. In conclusion, these data provide detailed information on the molecular mechanism of baicalin-induced inhibition of adipogenesis.

Key words: baicalin, adipogenesis, microarray, gene expression profile

서 론

Adipogenesis(지방세포 형성)는 세포 형태의 변화, 호르몬 민감성의 변화, 유전자 발현의 변화 및 단백질 발현의 변화가 일어나는 복합적인 과정이다. 비만, 당뇨 등의 여러 질병과 연계되어 있는 adipogenesis는 CCAAT/enhancer-binding proteins(C/EBPs)와 peroxidase proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ)에 의해 조절된다(1,2). 분화가 시작되면 전사인자인 C/EBP β 와 C/EBP δ 가 초기에 발현되어 adipogenesis의 핵심적인 기능을 하는 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현을 증가시킨다(3). 핵심 조절자인 PPAR γ 와 C/EBP α 는 서로 상호작용하여 상승효과를 일으키고 그 결과로 ADIPOQ(adiponectin), LPL(lipoprotein lipase)과 같은 terminal marker(최종 마커)들의 발현이 유도된다(4).

최근, 발현되는 유전자의 양을 cDNA/oligonucleotide microarray 기술을 이용하여 그 차이를 비교하고 분석할 수

있게 되면서 생명과학은 급속도로 발전하였다(5). 특정 세포나 조직에서 전체 유전자 발현의 변화를 확인할 수 있는 microarray 기술은 3T3-L1 세포를 이용한 *in vitro*와 mouse를 이용한 *in vivo*의 adipogenesis 및 비만 연구에도 적용되고 있다(6). Microarray 기술을 이용한 adipogenesis 보고들은 수백 혹은 수천 개의 유전자들의 발현이 증가하거나 감소하면서 지방세포(adipocytes)의 분화에 관여한다고 보고하고 있다. 또한, microarray는 유의 유전자(DEG, Differentially Expressed Gene) 분석, 유전자 정보(GO, Gene Ontology) 분석, 신호전달(pathway) 분석 그리고 군집(clustering) 분석 등 결과 분석법이 다양해지면서 결과 해석과 이후 실험 진행에 크게 영향을 주고 있다.

Flavonoid는 과일이나 채소 등의 다양한 식물에 일반적으로 함유되어 있는 polyphenolic compounds의 한 종류이다(7). 식물성인 flavonoid는 항암, 항염증, 항산화 및 심장 질환 등의 많은 질병과 기작에 매우 유의적으로 연관되어 있다

*Corresponding author. E-mail: thanks@cau.ac.kr
Phone: 82-2-820-5767, Fax: 82-2-820-5767

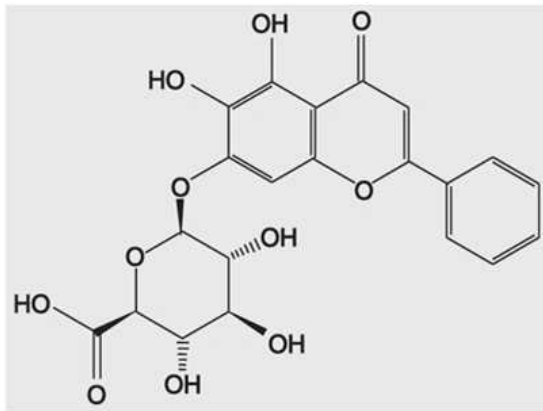


Fig. 1. Chemical structure of baicalin.

(8,9). Flavonoid 계열의 baicalin은 황금(*Scutellaria baicalensis* Georgi)의 주요 성분으로써, 항염증, 항세균, 항바이러스, 항암 등의 다양한 질병에 중요한 기능을 하는 것으로 보고되어 왔다(10-12). 바이칼린의 구조는 Fig. 1과 같다.

최근 본 연구진에 의해 baicalin의 adipogenesis 억제 및 adipogenesis 관련 유전자 발현 조절 효과가 규명되었다(13). 이번 연구에서는 microarray analysis를 이용하여 adipogenesis에서 분화 시간에 따라 baicalin에 의해 변화되는 다양한 유전자들의 발현 변화를 전반적으로 살펴보고 군집 분석을 통해 유전자 발현 변화의 양상을 확인하였다.

재료 및 방법

세포 배양 및 시약

실험에 사용된 3T3-L1 전지방세포(preadipocyte)는 한국 세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하여 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 10% calf serum, 100 µg/mL streptomycin, 100 units/mL penicillin과 함께 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 배양하였다. Baicalin과 다른 시약들은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

Adipogenesis 유도

3T3-L1 세포는 phosphate buffered saline(PBS) 용액으로 씻어준 후, $1 \sim 2 \times 10^5$ cells/mL을 6 well-plate에 세포밀도가 100%가 될 때까지 배양하였다. 2일 후(day 0), 10% fetal bovine serum(FBS)이 첨가된 DMEM에 1 mg/mL insulin, 0.25 mM dexamethasone 그리고 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine이 처리된 분화유도배지(differentiation-induction medium)로 교체하여 48시간 처리하였다. 그 후 2일 간격으로 10% FBS가 첨가된 새 배지에 1 mg/mL insulin이 처리된 분화유지배지(differentiation-maintenance medium)로 교체되었다. Adipogenesis가 진행될 때, baicalin이 주는 영향을 확인하기 위해, 분화유도배지와 분화유지배지를 첨가할 때 baicalin을 함께 처리하였다.

Total RNA 추출

Total RNA는 acid-phenol 추출법을 이용한 RNeasy kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 분리 정제되었다. 추출된 total RNA는 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 optical density(OD)값을 측정하고 -80°C에서 cDNA microarray에 보합결합(hybridization)까지 냉동보관 하였다.

Microarray 분석

300 ng의 total RNA는 cDNA로 역전사하고 GeneChip IVT labeling kit(Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 표기되었다. 표기된 cDNA는 35,557개의 유전자를 인지할 수 있는 probe들이 포함된 Mouse Gene 1.0 ST array와 45°C에서 17시간 동안 보합결합 된 후, GeneChip Fluidics Station 450(Affymetrix)을 사용하여 25°C에서 non-stringent wash buffer로 세척되었다. 세척 후, Streptavidin-phycoerythrin reagents로 염색과정을 거친 microarray는 GeneChip scanner 3000(Affymetrix)을 이용하여 스캐닝 하였다. GeneChip Operating Software(Affymetrix)를 이용하여 측정되고 수치화된 형광 발현 정도는 RMA-sketch 알고리즘을 통해 M-A plot을 측정하여 표준화하였다. 표준화 작업에는 Expression Console 1.0(Affymetrix) 프로그램이 사용되었다. 표준화된 값들은 GenPlex software(Affymetrix)을 이용하여 fold change와 t-test 그리고 군집 분석 등을 진행하였고, 유전자들의 기능 분석은 GO Miner를 이용하여 진행되었다(14).

결 과

Baicalin의 adipogenesis 억제 효과

Baicalin이 adipogenesis에 주는 효과를 살펴보기 위해 3T3-L1 지방세포를 이용하여 중성지방의 축적을 검사하였다. IBMX(isobutylmethylxanthine), dexamethasone, insulin 및 FBS(fetal bovine serum)가 포함된 배지에 200 µM baicalin을 첨가하여 3T3-L1 전지방세포에서 지방세포로 7일간 분화시킨 후 축적된 중성지방을 Oil Red O 염색법으로 확인하였다. 그 결과, baicalin을 첨가한 경우가 첨가하지 않은 경우에 비해 중성지방의 축적이 현저하게 줄어든 것을 확인하였다(Fig. 2). 이러한 Baicalin에 의한 중성지방 축적 감소 결과는 baicalin이 adipogenesis를 억제함을 보여준다. Baicalin에 의한 adipogenesis 억제효과는 본 연구진의 선행 연구에 의해 보다 상세하게 규명된 바 있다(13).

Microarray 결과의 전체 유전자 초기 분석

Baicalin이 유도하는 anti-adipogenesis 효과에 대한 분자적 기작(molecular mechanism)을 좀 더 상세히 살펴보기 위해 microarray 분석을 진행하였다. 세포가 plate의 표면에 100% 확장된 후부터 2일이 지난 시점을 0일(0 day)로 하여, 0 day에 전지방 세포의 total RNA가 정제되었다. 분화 시간

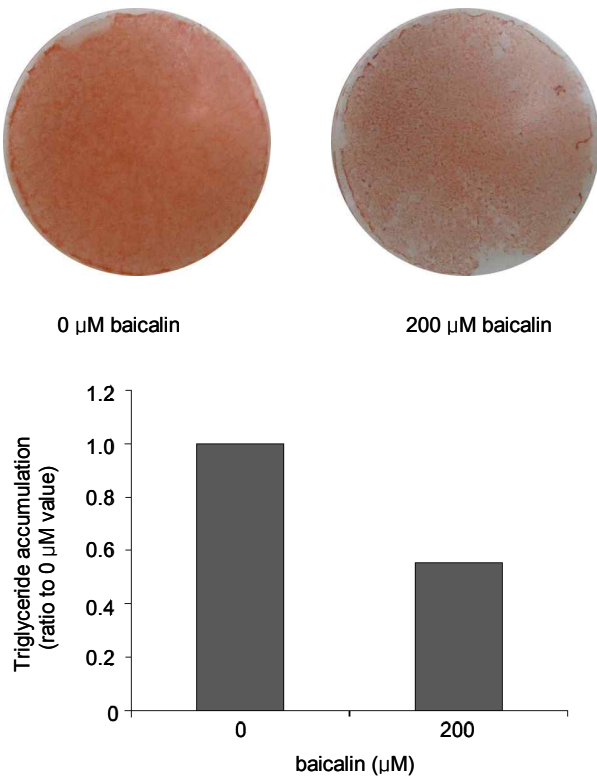


Fig. 2. Inhibitory effects of baicalin on triglyceride accumulation. 3T3-L1 cells were differentiated during 7 days with or without 200 μ M baicalin treatment, and lipid droplet in differentiated cells were stained with Oil Red O.

별 시료들은 분화 유도 물질 및 baicalin을 2일 간격으로 첨가하여 각 시간에 맞게 준비되었다. 이러한 과정으로 정제된 total RNA 시료들은 총 7개의 군으로 구성되었다: 전지방 세포(preadipocyte, 0 day), 2일 분화(2 day), 4일 분화(4 day), 7일 분화(7 day), 2일 분화+baicalin(2 day+baicalin), 4일 분화+baicalin(4 day+baicalin), 7일 분화+baicalin(7 day+baicalin).

7개의 total RNA 시료들은 cDNA로 역전사하여 표식화 작업을 거친 뒤, 35,557개의 probe로 구성된 Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST array에 적용되었다. Microarray 결과는 실험 재료와 첨가된 시약의 특성 및 실험에서의 변이 등을 보정하고 결과의 신뢰성을 보장하기 위해 normalization을 진행하였다(Fig. 3). 유전자 발현의 상호비교는 먼저 전지방 세포와 각 2일, 4일 및 7일 분화세포의 비교 그리고 분화된 2일, 4일 및 7일 동안 baicalin을 첨가한 세포와 첨가하지 않은 세포 간의 비교를 구분하여 수행하였다. 그 결과, 전지방 세포와 비교하여 2배 이상 유의하게 증가 혹은 감소한 유전자의 수는 2일 분화세포에서 1,636개(증가: 690개, 감소: 946개), 4일 분화세포에서 1,792개(증가: 1,113개, 감소: 679개), 7일 분화세포에서 1,006개(증가: 408개, 감소: 598개)였다(Table 1). 또한, baicalin을 처리하지 않은 세포와 처리한 세포의 비교에서, 2배 이상 증가 혹은 감소한 유전자 수는 2일 분화 후 739개(증가: 401개, 감소: 338개), 4일 분화 후 1,296개(증가: 440개, 감소: 856개), 7일 분화 후 977개(증가:

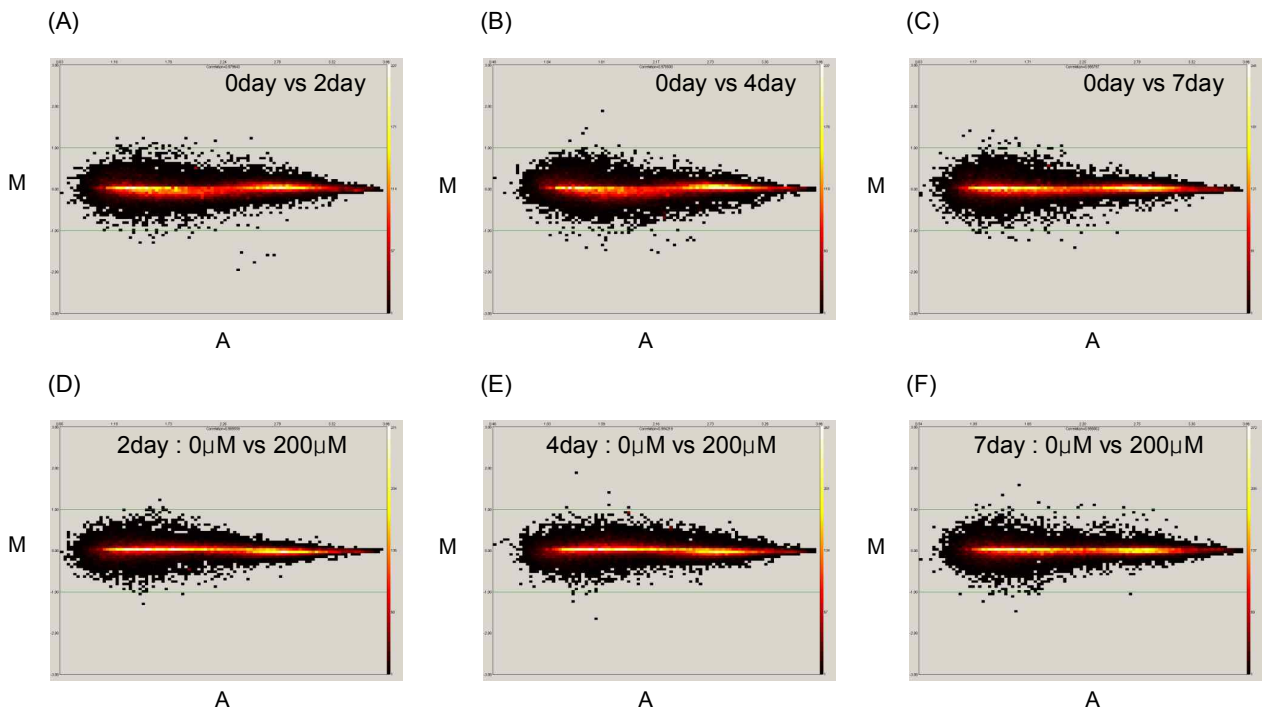


Fig. 3. M-A-plot after normalization. Black dots represent the spot before standardization and red spots after standardization. Upper panels show comparison between preadipocytes (0 day) and differentiated adipocytes (2 day (A), 4 day (B), and 7 day (C)). Lower panels show comparison between 0 μ M baicalin treatment and 200 μ M baicalin treatment in differentiated adipocytes 2 day (D), 4 day (E), and 7 day (F)).

Table 1. Number of genes of which expression levels were changed more than 2 fold at each time points of differentiation

	up	down	total
preadipocytes vs 2 day	690	946	1,636
preadipocytes vs 4 day	1113	679	1,792
preadipocytes vs 7 day	408	598	1,006

The genes are selected if their expression levels in differentiated adipocytes were changes more than 2-fold compared with undifferentiated preadipocyte.

Table 2. Number of genes of which expression levels were changed more than 2 fold by baicalin treatment

	up	down	total
2 day: 0 μ M vs 200 μ M	401	338	739
4 day: 0 μ M vs 200 μ M	440	856	1,296
7 day: 0 μ M vs 200 μ M	472	505	977

The genes are selected if their expression levels in baicalin-treated adipocytes were changes more than 2-fold compared with untreated adipocyte at each time points of differentiation.

472개, 감소: 505개)였다(Table 2). 이러한 결과는 지방세포가 분화되는 과정에 수많은 유전자들이 작용하며 baicalin의 첨가가 수많은 유전자들의 발현에 영향을 미침을 제시한다.

Hierarchical clustering을 통한 유전자 발현 양상의 분석

Baicalin에 의한 유전자 발현 양상의 전반적 분석을 위하여 2배 이상 변화하는 유의 유전자들에 대해 그룹화를 진행한 후, 특정 유전자들을 선별하는 작업을 진행하였다. Table 1과 Table 2에 정리된 2배 이상 증가 혹은 감소된 유전자들을 합집합 하여 3,972개의 유전자를 얻었다. 이 유전자들을 hierarchical clustering으로 유전자 발현 양상을 살펴본 결과, 분화 시간의 흐름과 baicalin의 처리에 따라 총 20개의 cluster를 얻을 수 있었다(Fig. 4). Fig. 5는 각 cluster들의 발현 양상을 0일, 2일, 4일 그리고 7일간의 분화 기간에 따라 baicalin을 첨가한 샘플과 첨가하지 않은 샘플을 구분하여 비교해서 보여준다. 각 cluster에 포함된 특정 유전자의 명칭, 기능 및 수는 Table 3에 정리하였다. Baicalin의 효과에 가장 크게 작용하는 유전자 양상을 살펴보기 위해, 20개의 cluster 중 adipogenesis가 유도될 때 전반적인 분화 기간에서 억제되었다가 baicalin의 첨가에 의해 크게 상승되는 양상을 보이는 cluster들(cluster 8, cluster 10)과 반대로 전반적으로 증가되었다가 baicalin의 첨가에 의해 크게 억제되는 양상을 보이는 cluster들(cluster 12, cluster 14)을 선별하였다. Baicalin의 첨가에 의해 상승되어 분화를 억제하는 양상을 보이는 cluster 8과 cluster 10에는 각각 163개(CHOP, INSIG1, WISP 등)와 429개(ADM, CCND2 등)의 유전자가 포함되었다. 또한 지방세포의 분화 시 증가되었다가 baicalin의 첨가에 의해 감소되는 양상을 보이는 cluster 12에는 LTA 등의 201개 유전자가 포함되었다. Cluster 12와 같은 발현 양상을 보이는 cluster 14(89개)에는 ACADSB,

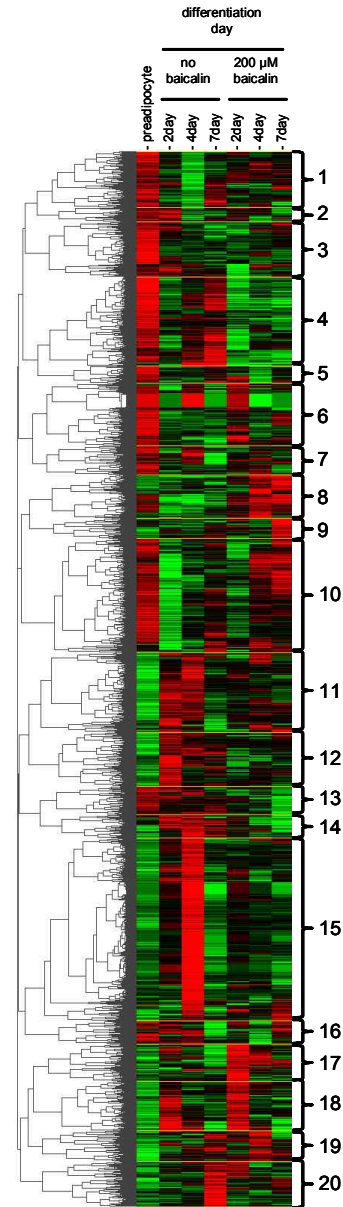


Fig. 4. Hierarchical clustering analyses of 3972 selected genes. The red color refers to the up-regulation of the gene expression and the green color indicates the down-regulation of the gene expression compared to the preadipocyte. Cluster numbers were marked in the right side of the figure.

HMGCS2 등이 포함되었다.

고 찰

Adipocytes의 기능 장애는 비만의 발생과 인슐린 저항성을 포함한 다양한 질병과 밀접한 관련성을 가진다(15). Adipocytes의 주요 작용인 adipogenesis는 C/EBPs와 PPAR γ 를 중심으로 수백 개의 유전자의 발현이 조절되어 일어나는 복잡한 과정이다. 최근 여러 보고에서 genistein, sakuranetin, isorhamnetin 등의 flavonoid 물질들이 adipo-

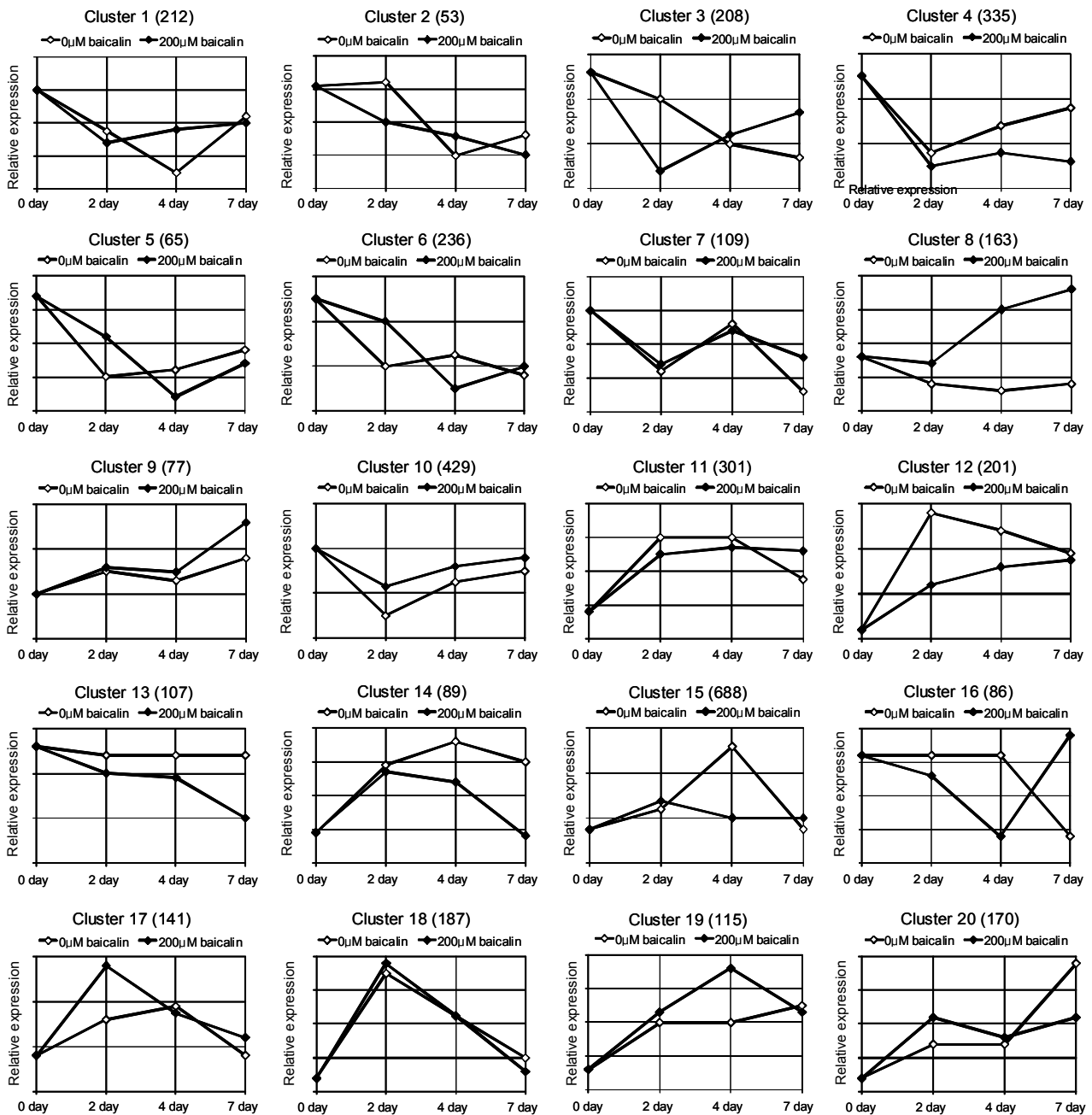


Fig. 5. Average expression profiles of each cluster (cluster 1~20) of the hierarchical clustering analysis of differentiated adipocytes treated with or without baicalin. The y-axis represents relative expression levels and the x-axis represents the time course.

Table 3. List of genes in each cluster. The number of the genes, GenBank accession number, gene symbol, gene title and gene function are included for each cluster

Cluster	No. of genes	Accession no.	Gene symbol	Gene title	Biological function
1	212	NM_009744	Bcl6	B-cell leukemia 6	cell proliferation regulation
		M13967	Hspa8	heat shock protein 8	cell cycle regulation
		NM_144907	Sesn2	sestrin 2	cell cycle regulation
		NM_009352	Terf1	telomeric repeat binding factor 1	cell cycle regulation
		NM_175540	Eda2r	ectodysplasin A2 isoform receptor	cell differentiation process
		NM_031159	Apobec1	apolipoprotein B editing complex 1	lipoprotein metabolic process
2	53	NM_172870	Bnc2	basonuclin 2	transcription regulation
		NM_018804	Syt11	synaptotagmin XI	transport

Table 3. Continued

Cluster	No. of genes	Accession no.	Gene symbol	Gene title	Biological function		
3	206	NM_178087	Pml	promyelocytic leukemia	cell proliferation regulation		
		NM_025611	Cul7	cullin 7	cell cycle regulation		
		NM_021274	Cxcl10	chemokine(C-X-C motif) ligand 10	inflammatory response		
		NM_021604	Agrn	agrins	transcription regulation		
		NM_007829	Daxx	Fasdeath domain-associated protein	transcription regulation		
4	335	NM_008138	Gnai2	guaninenucleotide binding protein alpha inhibiting 2	cell proliferation regulation		
		NM_010514	Igf2	insulin-like growth factor 2	cell proliferation regulation		
		NM_008714	Notch1	Notch gene homolog 1 (Drosophila)	cell proliferation regulation		
		NM_008973	Ptn	pleiotrophin	cell proliferation regulation		
		NM_001083587	Tns3	tensin 3	cell proliferation regulation		
		NM_011977	Slc27a1	solute carrier family 27 member 1	fatty acid metabolic process		
		NM_001081072	Slc27a6	solute carrier family 27 member 6	fatty acid metabolic process		
		NM_015744	Enpp2	ectonucleotide phosphodiesterase 2	lipid metabolic process		
		NM_010422	Hexb	hexosaminidase B	lipid metabolic process		
		NM_011125	Pltp	phospholipid transfer protein	lipid metabolic process		
		NM_018865	Wisp1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	cell growth regulation		
		NM_007671	Cdkn2c	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C	cell cycle regulation		
		NM_008087	Gas2	growth arrest specific 2	cell cycle regulation		
		NM_020510	Fzd2	frizzled homolog 2	cell differentiation process		
		NM_010512	Igf1	insulin-like growth factor 1	cell differentiation process		
5	65	NM_030261	Sesn3	sestrin 3	cell cycle regulation		
		NM_146945	Olfir345	olfactory receptor 345	G-protein coupled receptor protein signaling pathway		
		NM_008883	Plxna3	plexin A3	inflammatory response		
6	236	NM_009472	Unc5c	unc-5 homolog C (C. elegans)	apoptosis regulation		
		NM_007669	Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	cell proliferation regulation		
7	109	NM_025378	Ifitm3	interferon induced transmembrane protein 3	cell proliferation regulation		
		NM_033218	plin	sterol regulatory element binding factor 2	lipid metabolic process		
		NM_021897	Trp53inp1	transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1	cell cycle regulation		
		NM_138741	Sdpr	serum deprivation response			
8	163	NM_001013609	Tex24	testis expressed gene 24			
		NM_007837	Chop	CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein	cell cycle regulation		
9	77	NM_153526	Insig1	insulin induced gene 1	lipid metabolic process		
		NM_016873	Wisp2	WNT1 inducible signaling pathway protein 2	lipid metabolic process		
		NM_010700	Ldlr	low density lipoprotein receptor	lipid metabolic process		
		NM_007836	Gadd45a	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	cell cycle regulation		
		NM_008871	Serpine1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor member 1	regulation of angiogenesis		
10	429	NM_011498	Bhlhb2	basic helix-loop-helix domain containing B2	transcription regulation		
		NM_023422	Hist1h2bc	histone cluster 1	nucleosome assembly		
		NM_018885	Irx4	Iroquois related homeobox 4 (Drosophila)	transcription regulation		
11	301	NM_009627	Adm	adrenomedullin	cell proliferation regulation		
		NM_009829	Ccnd2	cyclin D2	cell cycle regulation		
		NM_008175	Grn	granulin	cell proliferation regulation		
		NM_009368	Tgfb3	transforming growth factor, beta 3	cell proliferation regulation		
		NM_030693	Atf5	activating transcription factor 5	cell proliferation regulation		
		NM_007739	Col8a1	procollagen, type VIII, alpha 1	cell proliferation regulation		
		NM_019827	Gsk3b	glycogen synthase kinase 3 beta	cell proliferation regulation		
		NM_009263	Spp1	secreted phosphoprotein 1	cell proliferation regulation		
		BC001999	Emp3	epithelial membrane protein 3	cell growth regulation		
		NM_017464	Neddb9	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene	cell growth regulation		
		12	201	NM_010544	lhh	Indian hedgehog	cell proliferation regulation
				AK134512	Tm7sf2	transmembrane 7 superfamily member 2	cholesterol biosynthetic process
NM_008597	Mgp			matrix Gla protein	cell differentiation process		
NM_009501	Vax1			ventral anterior homeobox containing gene 1	cell differentiation process		
NM_010735	Lta			lymphotoxin A	cell proliferation regulation		
13	201	NM_008738	Nrtn	neurturin	nerve development		
		NM_007878	Drd4	dopamine receptor 4	G-protein coupled receptor protein signaling pathway		
		NM_028133	Egln3	EGL nine homolog 3	apoptosis		
NM_172932	Nlgn3	neuroligin 3	cell adhesion				

Table 3. Continued

Cluster	No. of genes	Accession no.	Gene symbol	Gene title	Biological function
13	107	NM_010216	Figf	c-fos induced growth factor	cell proliferation regulation
		NM_013584	Lifr	leukemia inhibitory factor receptor	cell proliferation regulation
		NM_010788	Mecp2	methyl CpG binding protein 2	cell proliferation regulation
		NM_026058	Lass4	longevity assurance homolog 4	lipid metabolic process
		NM_007922	Elk1	member of ETS oncogene family	cell cycle regulation
		NM_021457	Fzd1	frizzledhomolog 1	cell differentiation process
		NM_007470	Apod	apolipoprotein D	transport
14	89	NM_025826	Acadsb	acyl-CoenzymeA dehydrogenase, short, branched chain	fatty acid metabolic process
		NM_008256	Hmgcs2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoenzymeA synthase 2	lipid metabolic process
		NM_008048	Igfbp7	insulin-like growth factor binding protein 7	cell growth regulation
		NM_008587	Mertk	c-merproto-oncogene tyrosine kinase	cell cycle regulation
		NM_175445	Rassf2	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 2	cell cycle regulation
		NM_133955	Rhou	ras homolog gene family, member U	cell cycle regulation
15	688	NM_001013370	Sesn1	sestrin1	cell cycle regulation
		NM_133670	Sult1a1	sulfotransferase family 1A, phenol-preferring, member 1	lipid metabolic process
		NM_011335	Ccl21a	chemokine (C-C motif) ligand 21a	cell differentiation process
		NM_023052	Ccl21c	chemokine (C-C motif) ligand 21c	cell differentiation process
		NM_011124	Ccl21b	chemokine (C-C motif) ligand 21b	inflammatory response
		NM_207273	Tdpoz5	TD and POZ domain containing 5	biological process
		NM_019917	V2r1b	vomer nasal 2 receptor 1b	G-protein coupled receptor protein signaling pathway
16	86	NM_020260	Cdgap	Cdc42 GTPase-activating protein	small GTPase mediated signal transduction
17	141	NM_007428	Agt	angiotensinogen	cell proliferation regulation
		NM_007950	Ereg	epiregulin	cell proliferation regulation
		NM_013598	Kitl	kitligand	cell proliferation regulation
		NM_172671	Lgr4	leucine-richrepeat-containing G protein-coupled receptor4	cell proliferation regulation
		NM_010849	Myc	myelocytomatosisoncogene	cell proliferation regulation
		NM_011198	Ptgs2	prostaglandin-endoperoxidesynthase 2	fatty acid metabolic process
		NM_031167	Il1rn	interleukin1 receptor antagonist	lipid metabolic process
		NM_013642	Dusp1	dualspecificity phosphatase 1	cell cycle regulation
		NM_009061	Rgs2	regulatorof G-protein signaling 2	cell cycle regulation
		NM_009883	Cebpb	CCAAT/enhancerbinding protein beta	cell differentiation process
		NM_013562	Ifrd1	interferon-relateddevelopmental regulator 1	cell differentiation process
18	187	NM_008489	Lbp	lipopolysaccharidebinding protein	lipid metabolic process
		NM_019521	Gas6	growtharrest specific 6	cell growth regulation
		NM_008343	Igfbp3	insulin-likegrowth factor binding protein 3	cell growth regulation
		NM_010591	Jun	Junoncogene	cell cycle regulation
		NM_007483	Rhob	rashomolog gene family member B	cell cycle regulation
		NM_001039554	Angptl7	angiopoietin-like7	signal transduction
		NM_007679	Cebpd	CCAAT/enhancerbinding protein delta	transcription regulation
		NM_018866	Cxcl13	chemokine (C-X-C motif) ligand 13	inflammatory response
		NM_009769	Klf5	Kruppel-likefactor 5	transcription regulation
		NM_010638	Klf9	Kruppel-likefactor 9	transcription regulation
19	115	NM_020581	Angptl4	angiopoietin-like4	lipid metabolic process
		NM_024406	Fabp4	fattyacid binding protein 4	cholesterol biosynthetic process
		NM_011146	Pparg	peroxisomeproliferator activated receptor gamma	cell differentiation process
		NM_009760	Bnip3	BCL2/adenovirusE1B interacting protein 1; NIP3	apoptosis regulation regulation
		NM_178373	Cidec	celldeath-inducing DFFA-like effector c	apoptosis regulation regulation
		NM_010930	Nov	nephroblastomaoverexpressed gene	cell growth regulation
20	170	NM_007981	Acs11	acyl-CoAsynthetase long-chain family member 1	fatty acid metabolic process
		NM_009605	Adipoq	adiponectin	fatty acid metabolic process
		NM_026384	Dgat2	diacylglycerol O-acyltransferase 2	lipid metabolic process
		NM_008509	Lpl	lipoprotein lipase	lipid metabolic process
		NM_175640	Plin	perilipin	lipid metabolic process
		NM_022984	Retn	resistin	lipid metabolic process
		AK087727	Prlr	prolactin receptor	cell differentiation process
		NM_027852	Rarres2	retinoicacid receptor responder 2	defense response

genesis 및 관련 유전자들을 조절한다고 보고하고 있다(16-18). 황금(*Scutellaria baicalensis* Georgi)의 주요 성분인 baicalin은 flavonoid 계열의 한 물질로서 항염증, 항암, 항바이러스 등 다양한 분야에서 그 기능을 보이고 있고 최근 본 연구진에 의해 adipogenesis 억제효능이 발견되었다(13). 본 연구에서는 microarray 분석을 이용하여 baicalin에 의한 adipogenesis 억제 시, 세포내의 다양한 pathway에 위치한 전반적인 유전자들의 발현 양상을 살펴보았다. 전지방 세포에서 지방세포로 분화되는 동안 cell cycle regulator(세포주기 조절자)와 cell growth regulator(세포성장 조절자) 및 adipogenic factor(지방세포 형성 인자)들의 상호작용이 이루어진다. 이 과정에서 전지방 세포의 cell proliferation(세포 분열)이 중지되고 cell cycle에서 G1기의 세포들이 증가되면서 지방세포의 분화가 시작된다(19). Hierarchical clustering에서 분화기간 전반에 걸쳐 baicalin에 의해 크게 증가 혹은 감소된 cluster(cluster 8, cluster 10, cluster 12, cluster 14)들에 포함된 유전자들의 기능을 살펴보면 adipogenesis와 연관된 metabolism을 비롯하여 cell proliferation, cell growth 및 cell cycle regulation과 관련된 유전자가 많았다. Cluster 8과 Cluster 10의 경우 adipogenesis를 억제하는 유전자이거나 cell proliferation과 cell growth를 유도하는 기능을 가진 유전자들이 다수 포함되었다. 그 중 C/EBP family의 한 멤버인 CHOP(CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein)은 C/EBP β 와 heterodimer를 형성하여 C/EBP β 의 활성을 억제함으로써 anti-adipogenic factor(지방세포 형성 억제 인자)로 작용하며, 지방세포 유도물질인 FBS(fetal bovine serum)가 첨가되어 분화가 유도되면 억제된다고 알려져 있다(20). 또한 INSIG1(insulin induced gene 1)은 adipogenesis에서 PPAR γ 를 조절하는 pro-adipogenic factor(지방세포 형성 유도 인자)로 알려진 SREBP(sterol-regulatory element binding protein)를 억제하였다. Adams의 보고에 따르면, INSIG의 두 유전자인 INSIG1과 INSIG2를 설치류에서 비활성화 시키면 SREBP가 크게 상승한다(21). 따라서 INSIG1은 adipogenesis에서 anti-adipogenic factor로 작용할 가능성이 높다. WISP2(WNT1 inducible signaling pathway protein 2)는 adipogenesis을 저해하는 canonical WNT pathway에 포함되어 anti-adipogenesis로 작용될 것으로 추정되고 있다. 또한 WISP2는 cell growth에도 관여한다고 알려져 있는데, WISP2의 과다 발현은 종양 세포의 proliferation을 증가시킨다(22). ADM(adrenomedullin) 역시 피부, 구강, 혈관 등의 다양한 세포에서 proliferogenic effect(세포증식 유도 효과)를 가진다고 알려져 있다. 최근, Ouafik의 보고에서 ADM은 cyclin D1을 증가시키고 cell cycle을 변화시킨다고 보고되었다(23). Cell cycle의 positive regulation의 기능을 가지며, 다양한 기관과 세포에서 cell proliferation을 증가시킨다고 널리 알려져 있는 CCND2(cyclin D2) 역시 baicalin에 의해 그 발현이 크게

상승되었다(24,25). 이 밖에도 GRN(granulin)이나 TGFB3(transforming growth factor, beta 3)을 포함한 cell proliferation이나 cell growth에 관련된 유전자들의 발현이 지방세포 형성에서 baicalin에 의해 상승되었다(26,27). 이와 같이 adipogenesis를 억제하는 기능과 cell proliferation을 유도하는 기능을 가지는 CHOP, INSIG1, WISP2, ADM, CCND2, GRN, TGFB3 등의 많은 유전자들은 지방세포가 분화될 때, 감소하였다가 baicalin의 첨가에 의해 크게 상승되는 cluster 8과 cluster 10의 발현 양상을 가졌다. 따라서 baicalin은 anti-adipogenesis와 cell proliferation의 기능을 가지는 유전자들의 발현을 조절하여 adipogenesis를 억제하는 것으로 사료된다.

이와는 반대로, cluster 12와 cluster 14에 포함된 유전자들은 adipogenesis의 전반적인 기간에서 증가하였다가 baicalin에 의해 크게 감소하는 양상을 보였다. 이러한 발현 양상을 보이는 LTA(lympotoxin A), ACADSB(acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain), HMGCS2(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoenzymeA synthase 2), IGFBP7(insulin-like growth factor b faing protein 7), MERTK(c-merproto-oncogene tyrosine kinase), RASSF2(ras assoatoation(RalGDS/AF-6) domain family, 2), RHO(ras homolog gene family, member U), SESN1(sestrin1) 등의 유전자들은 cell proliferation이나 cell growth를 억제하고 adipogenesis를 유도하는 기능을 가질 것으로 예상된다. 그 중 ACADSB는 acyl-CoA esters의 α, β -dehydrogenation를 촉매 하는 효소 중 하나로써 energy metabolic process(에너지 대사과정)에 포함되어진다(28). 이러한 ACADSB는 지방세포의 분화에서 그 유전자의 발현이 증가되었다가 baicalin에 의해 감소되는 양상을 보였다. HMGCS2는 에너지 대사와 지방생성 등에 관련된다고 보고되고 있는데 역시 baicalin에 의해 발현이 크게 감소되었다(29,30). IGFBP-rP1, mrc25, TAF, angiomodulin으로 불리는 IGFBP7는 분비형 단백질로써 설치류의 간암에서 유전자의 발현이 낮다고 보고되고 있으며 TGF-beta family의 조절을 통해 cell growth를 억제한다고 알려져 있다(31,32). 따라서 baicalin에 의한 IGFBP7의 감소는 baicalin이 유도하는 지방세포 형성 억제의 결과와 부합된다. Axl/Mer/Tyro3 receptor tyrosine kinase family에 속하는 MERTK 역시 IL3(interleukin 3)과 함께 처리하면 cell growth를 억제한다고 보고하고 있다(33). 이 밖에도 LTA, RASSF2, RHO, SESN1 등과 같이 아직 정확한 기작을 밝히는 보고는 거의 없지만 cell proliferation이나 cell growth에 관련된 유전자들의 발현이 지방세포 형성에서 증가하였다가 baicalin에 의해 크게 감소되었다. 이와 같이 baicalin은 에너지 대사와 세포 증식을 유도하는 유전자들의 발현을 조절함으로써 adipogenesis를 저해하는 것으로 사료된다. Differentiation 과정의 일종인 adipogenesis는 cell growth 및 proliferation

과 상대되는 개념으로 실제로 adipogenesis 시에는 cell cycle arrest가 일어난다(19). 또한 cell proliferation에 관여하는 많은 유전자들이 differentiation 과정에서 억제되며, 반대로 differentiation 관련 유전자들은 cell proliferation 과정에서 억제되는 양상을 보인다. 본 연구에서 baicalin은 cell proliferation을 촉진시키는 유전자의 발현을 증가시키고, 이를 억제하는 유전자의 발현을 억제와 관련 differentiation (adipogenesis)과 proliferation의 균형을 proliferation 쪽으로 이동시킨다고 사료된다.

우리는 이번 연구를 통해 microarray를 이용하여 baicalin이 유도하는 adipogenesis 억제의 유전자 발현 양상을 확인하고자 하였다. 여러 cluster 중 baicalin의 첨가에 의해 크게 증가되거나 감소되는 양상의 cluster들을 선별하였고 그 cluster들에서 adipogenesis와 cell proliferation 및 cell growth에 관련된 유전자들을 발견하였다. 이러한 유전자들은 baicalin의 사용에 대한 중요한 생물학적 원리를 밝히고, 향후 adipogenesis와 관련이 깊은 비만 및 각종 성인병과 관련된 연구들에 적용될 중요하고 잠재성 있는 유전자 재료가 될 것으로 예상된다. 또한 일상에서 쉽게 접할 수 있는 식물성 식품들의 주요 성분인 baicalin의 이러한 adipogenesis 및 이에 따른 지방축적 기능은 점점 더 증가하는 비만과 비만에 의한 각종 성인병에 대한 중요한 단서가 될 수 있으리라 사료된다.

요 약

Flavonoid 계열의 한 종류인 baicalin은 항염증, 항암, 항바이러스, 항세균 등의 효능을 가진다. 본 연구진은 선행 연구를 통한 이전의 보고에서 baicalin이 adipogenesis pathway(지방세포 형성 경로)의 anti-adipogenic(지방세포 형성 억제)과 pro-adipogenic(지방세포 형성 유도) factor들을 조절함으로써 비만 및 adipogenesis를 억제함을 밝혔다. 본 연구에서는, microarray 기술을 이용하여 3T3-L1 세포에서 baicalin이 유도하는 지방세포 형성 억제 효과에 대한 분자적 기작을 보다 상세하게 연구하고자 하였다. 지방세포의 분화 시간(0일, 2일, 4일 및 7일)과 분화 시 baicalin의 처리 유무에 따라 유전자 발현 양상을 분석하기 위해 해당 시료들을 microarray에 적용하였다. Microarray 결과로부터 2배 이상의 변화가 있는 3972개의 유전자를 확보하였다. 그 유전자들의 발현 양상을 좀 더 자세히 살펴보기 위해 hierarchical clustering 분석을 진행하였고 그 결과로 20개의 cluster를 분류할 수 있었다. 그들 중 4개의 cluster는 분화의 전반적인 기간에서 baicalin의 첨가에 의해 뚜렷하게 상승(cluster 8과 cluster 10)하거나 반대로 뚜렷하게 감소(cluster 12와 cluster 14)하는 양상을 보였다. Cluster 8과 cluster 10에는 CHOP(CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein), INSIG1(insulin induced gene 1),

WISP2(WNT1 inducible signaling pathway protein 2), ADM(adrenomedullin), CCND2(cyclin D2), GRN(granulin) 및 TGFB3(transforming growth factor, beta 3)과 같은 세포 증식과 지방세포 형성 억제를 상승시키는 유전자들이 다수 포함되었다. 반대로 cluster 12와 cluster 14에는 세포 증식 억제, 세포 주기 억제 및 세포 성장 억제와 연관되거나 지방세포를 유도하는 유전자인 LTA(lymptoxin A), ACADSB(acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain), HMGCS2(3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2), IGFBP7(insulin-like growth factor binding protein 7), MERTK(c-merproto-oncogene tyrosine kinase), RASSF2(ras association(RalGDS/AF-6) domain family 2), RHOU(ras homolog gene family, member U) 및 SESN1(sestrin1) 등이 포함되었다. 결론적으로 baicalin은 세포 증식 및 지방세포 형성과 연관된 유전자들을 조절함으로써 지방세포의 분화를 억제하는 것으로 사료된다. 이러한 결과는 baicalin이 유도하는 지방세포 형성 억제 및 비만 억제 효과의 분자적 기작에 대한 중요한 정보를 제시한다.

감사의 글

본 연구는 보건복지가족부 한의약선도기술개발사업(B080020) 및 농촌진흥청의 바이오그린 21사업(20070301-034-031)의 지원으로 이루어진 결과이며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA. 1998. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 273: 30057-30060.
2. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J. 1996. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *Embo J* 15: 5336-5348.
3. Cornelius P, MacDougald OA, Lane MD. 1994. Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr* 14: 99-129.
4. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78: 783-809.
5. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Folletie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, Brown EL. 1996. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 14: 1675-1680.
6. Guo X, Liao K. 2000. Analysis of gene expression profile during 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Gene* 251: 45-53.
7. Havsteen B. 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol* 32: 1141-1148.
8. Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*

- 52: 673-751.
9. Seelinger G, Merfort I, Schempp CM. 2008. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. *Planta Med* 74: 1667-1677.
 10. Chan FL, Choi HL, Chen ZY, Chan PS, Huang Y. 2000. Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by a flavonoid, baicalin. *Cancer Lett* 160: 219-228.
 11. Li BQ, Fu T, Dongyan Y, Mikovits JA, Ruscetti FW, Wang JM. 2000. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. *Biochem Biophys Res Commun* 276: 534-538.
 12. Liu IX, Durham DG, Richards RM. 2000. Baicalin synergy with beta-lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other beta-lactam-resistant strains of *S. aureus*. *J Pharm Pharmacol* 52: 361-366.
 13. Lee H, Kang R, Hahn Y, Yang Y, Kim SS, Cho SH, Chung SI, Yoon Y. 2009. Antiobesity effect of baicalin involves the modulation of proadipogenic and antiadipogenic regulators of the adipogenesis pathway. *Phytother Res* DOI: 10.1002/ptr.2937.
 14. Zeeberg BR, Feng W, Wang G, Wang MD, Fojo AT, Sunshine M, Narasimhan S, Kane DW, Reinhold WC, Lababidi S, Bussey KJ, Riss J, Barrett JC, Weinstein JN. 2003. GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome Biol* 4: R28.
 15. Shimomura I, Hammer RE, Richardson JA, Ikemoto S, Bashmakov Y, Goldstein JL, Brown MS. 1998. Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev* 12: 3182-3194.
 16. Zhang M, Ikeda K, Xu JW, Yamori Y, Gao XM, Zhang BL. 2009. Genistein suppresses adipogenesis of 3T3-L1 cells via multiple signal pathways. *Phytother Res* 23: 713-718.
 17. Saito T, Abe D, Sekiya K. 2008. Sakuranetin induces adipogenesis of 3T3-L1 cells through enhanced expression of PPARgamma2. *Biochem Biophys Res Commun* 372: 835-839.
 18. Lee J, Jung E, Lee J, Kim S, Huh S, Kim Y, Kim Y, Byun SY, Kim YS, Park D. 2009. Isorhamnetin represses adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Obesity (Silver Spring)* 17: 226-232.
 19. Fajas L. 2003. Adipogenesis: a cross-talk between cell proliferation and cell differentiation. *Ann Med* 35: 79-85.
 20. Rosen ED, MacDougald OA. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 885-896.
 21. Adams CM, Reitz J, De Brabander JK, Feramisco JD, Li L, Brown MS, Goldstein JL. 2004. Cholesterol and 25-hydroxycholesterol inhibit activation of SREBPs by different mechanisms, both involving SCAP and Insigs. *J Biol Chem* 279: 52772-52780.
 22. Saxena N, Banerjee S, Sengupta K, Zoubine MN, Banerjee SK. 2001. Differential expression of WISP-1 and WISP-2 genes in normal and transformed human breast cell lines. *Mol Cell Biochem* 228: 99-104.
 23. Ouafik L, Berenguer-Daize C, Berthois Y. 2009. Adrenomedullin promotes cell cycle transit and up-regulates cyclin D1 protein level in human glioblastoma cells through the activation of c-Jun/JNK/AP-1 signal transduction pathway. *Cell Signal* 21: 597-608.
 24. Glickstein SB, Monaghan JA, Koeller HB, Jones TK, Ross ME. 2009. Cyclin D2 is critical for intermediate progenitor cell proliferation in the embryonic cortex. *J Neurosci* 29: 9614-9624.
 25. Tamamori-Adachi M, Goto I, Yamada K, Kitajima S. 2008. Differential regulation of cyclin D1 and D2 in protecting against cardiomyocyte proliferation. *Cell Cycle* 7: 3768-3774.
 26. Hao J, Varshney RR, Wang DA. 2008. TGF-beta3: A promising growth factor in engineered organogenesis. *Expert Opin Biol Ther* 8: 1485-1493.
 27. Hanington PC, Barreda DR, Belosevic M. 2006. A novel hematopoietic granulins induces proliferation of goldfish (*Carassius auratus* L.) macrophages. *J Biol Chem* 281: 9963-9970.
 28. Willard J, Vicanek C, Battaile KP, Van Veldhoven PP, Fauq AH, Rozen R, Vockley J. 1996. Cloning of a cDNA for short/branched chain acyl-coenzyme A dehydrogenase from rat and characterization of its tissue expression and substrate specificity. *Arch Biochem Biophys* 331: 127-133.
 29. Nadal A, Marrero PF, Haro D. 2002. Down-regulation of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by insulin: the role of the forkhead transcription factor FKHL1. *Biochem J* 366: 289-297.
 30. de Boer VC, van Schothorst EM, Dihal AA, van der Woude H, Arts IC, Rietjens IM, Hollman PC, Keijer J. 2006. Chronic quercetin exposure affects fatty acid catabolism in rat lung. *Cell Mol Life Sci* 63: 2847-2858.
 31. Kato MV, Sato H, Tsukada T, Ikawa Y, Aizawa S, Nagayoshi M. 1996. A follistatin-like gene, mac25, may act as a growth suppressor of osteosarcoma cells. *Oncogene* 12: 1361-1364.
 32. Kanemitsu N, Kato MV, Miki T, Komatsu S, Okazaki Y, Hayashizaki Y, Sakai T. 2000. Characterization of the promoter of the murine mac25 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 279: 251-257.
 33. Guttridge KL, Luft JC, Dawson TL, Kozłowska E, Mahajan NP, Varnum B, Earp HS. 2002. Mer receptor tyrosine kinase signaling: prevention of apoptosis and alteration of cytoskeletal architecture without stimulation or proliferation. *J Biol Chem* 277: 24057-24066.

(2009년 9월 22일 접수; 2009년 11월 18일 채택)