

Bovine Mesenchymal Stem Cell의 지방분화를 이용한 지방대사관련 후보 유전자의 발현분석

김성곤¹ · 김남국¹ · 윤두학¹ · 김태현¹ · 양부근² · 이현정^{1*}

¹농촌진흥청 국립축산과학원, ²강원대학교 동물생명과학대학 동물자원학과

Gene Expression of Candidate Genes Involved in Fat Metabolism During *In vitro* Adipogenic Differentiation of Bovine Mesenchymal Stem Cell

Sung-Kon Kim¹, Nam-Kuk Kim¹, Duhak Yoon¹, Tae-Hun Kim¹, Boo-Keun Yang² and Hyun-Jeong Lee^{1*}

¹Animal Genomics & Bioinformatics Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration,

²Dept. of Animal Resources Science, College of Animal Life Science, Kangwon National University

ABSTRACT

Adipogenesis has been one of the most intensely studied models of cellular differentiation. During adipogenesis, differential expression of many adipogenesis related genes lead to profound changes in cellular, morphological, and physiological characteristics of the differentiating cells. The aim of the present study was to examine the expression levels of adipogenic candidate genes, cAMP early repressor (ICER), nephroblastoma over-expressed protein (NOV), heat shock protein beta 1 (HSPB1) and succinate dehydrogenase (SDH), during adipogenesis of bovine mesenchymal stem cells (BMSC). The BMSC were cultured in DMEM/low glucose medium with adipogenic inducers for 6 days and the expression of various candidate genes which seemed related to adipogenesis were measured by real-time PCR. This study showed that the expression of peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ) and fatty acid binding protein 4 (FABP4) genes as adipogenic indicators were increased to 3.11 and 3.11 folds on day 6 than on day 0, respectively ($p < 0.05$). To determine whether candidate genes were related to adipogenesis, the expression levels of ICER, NOV, HSPB1, and SDH genes were measured during adipogenesis in BMSC. Our results showed that the expression level of ICER gene was significantly increased to 4.12 folds (0.01729 vs. 0.07138; $p < 0.05$), whereas NOV, HSPB1, and SDH genes were decreased to 2.89, 3.18 and 2.36 folds, respectively, on day 6 when compared to day 0. These results suggest that these candidate genes have stimulatory or inhibitory effects on adipogenesis in BMSC, indicating that these genes may be directly or indirectly related to the adipogenic event of adipose precursor cells.

(Key words : Bovine mesenchymal stem cell, Adipogenesis, Differential expression)

서 론

쇠고기의 육질은 육색(meat color), 근내지방도(marbling score) 및 연도(tenderness) 등 다양한 요인에 의해 결정되며, 특히 근내지방도는 육질을 개선하는데 매우 중요한 요소로 작용된다(이 등, 2006). 따라서 육질개선을 위한 연구의 일환으로 국내외 많은 연구자에 의해 근내지방도에 영향을 미치는 지방축적 및 대사에 관여하는 유전자를 탐색하기 위한 노력들이 진행되고 있다(Kazala 등, 2003; 이 등, 2006; 김 등, 2008). 지방축적은 지방세포수의 증가 및 크기의 증가에 의해 이루어지는데(임 등, 2008), 이와 관련된 지방세포주 및 지방전구세포를 이용하여 지방분화 및

축적에 관여하는 유전자들의 연구가 활발히 이루어지고 있다(Guo와 Liao, 2000; Yagi 등, 2004). 지방분화는 hormonal induction과 같은 많은 외부 자극과 복잡한 유전자발현 조절과정을 통하여 일어난다. 과거의 연구 결과들에 의하면 이러한 외부 신호는 지방세포 특이적인 유전자 발현경로를 통하여 조절된다고 알려져 있다. 지방세포 분화를 유도하는 외부 신호 중 인슐린은 가장 널리 알려져 있는 호르몬으로 당질의 흡수와 중성지방의 합성을 증가시키고, 지방분화가 유도되는 동안 peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ), CCAAT/enhancer-binding protein family (C/EBP family), fatty acid binding protein 4 (FABP4) 등의 지방합성 및 분화관련 유전자의 발현을 증가시키는 것으로 보고되고

* Corresponding author : Hyun-Jeong Lee, Animal Genomics and Bioinformatics Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, #564 Omockchun-dong, Suwon, 441-706, Korea. Tel: +82-31-290-1594, Fax: +82-31-290-1602, E-mail: hyunj68@korea.kr

있다(서 등, 2004; Bosnakovski 등, 2005).

최근 Lee 등(2007)은 한우에서 지방축적이 적은 비육전기와 지방이 많이 축적되는 비육후기 등심조직을 대상으로 지방관련 후보 유전자의 발현양상을 분석한 결과, inducible cAMP early repressor (ICER) 유전자의 발현이 증가됨을 확인하였고, Bronnikov 등(1992)은 brown adipocyte의 지방분화시 세포의 증식을 억제시키고 지방 분화에 영향을 준다고 보고하여, ICER 유전자가 지방과 관련이 있음을 제시하였다. 한편, Snaith 등(1996)은 nephroblastoma overexpressed protein (NOV) 유전자가 insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)과 유사한 구조를 가지고 있어, IGF와 결합하여 세포의 증식에 영향을 주지만, 지방세포의 분화시 발현양이 감소되는 등, 지방과 관련이 있다고 보고하였다. 또한, heat shock protein beta-1 (HSPB1)은 명확한 작용 기작이 밝혀지지 않고 있지만, 근내지방도가 높은 한우 등심조직이 낮은 등심조직에 비해 발현이 낮게 나타나, 고기 조직의 품질을 측정할 수 있는 지표가 될 수 있다고 추정하고 있다(Kim 등, 2009). Succinate dehydrogenase (SDH)는 근육내의 숙신산염의 산화작용을 통하여 지방을 분해시킨다고 보고하였고(Pethick 등, 2005), 실제로 Kim 등(2009)은 한우 등심조직에서 SDH 유전자의 발현이 12개월령에 비해 27개월령에서 반으로 감소했다고 보고하여, 이 유전자가 지방 축적과 밀접한 관련이 있다고 판단된다.

본 연구에 사용된 bovine mesenchymal stem cell (BMSC)은 자가 재생산 또는 특정 환경에 따라 여러 기능을 지닌 세포로 분화가 가능한 다분화 능력이 있는 세포이다. 따라서 본 연구는 BMSC를 이용하여, 한우의 성장과정 중 지방 및 근육 조직 내 지방합성 및 분화와 관련이 있을 것으로 추측되는 ICER, NOV, HSPB1 및 SDH 유전자의 발현양상을 세포수준에서 측정하고, 이들 유전자의 발현과 지방분화의 관련성을 비교·분석하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양 및 지방분화

본 실험에 이용된 세포는 고려대학교 생명과학부 유승권 교수팀이 임신 60일 된 소의 태아에서 골수를 분리한 후, 골수에서 세포를 분리하여 세포주로 확립한 BMSC를 분양받아 실험에 이용하였다. BMSC의 체외배양은 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin, 2 mM L-glutamin이 첨가된 DMEM/low glucose (GIBCO, USA) 배양액을 기본배양액으로 하여 5% CO₂, 37°C의 조건으로 100 mm petri-dish에 배양하여 세포가 100% confluence에 도달한 후, 지방분화를 실시하였다. 지방분화는 기본배양액에 지방분화 유도제로 10 ug/ml insulin, 10 uM dexamethasone, 0.5 mM 3-Isobutyl- 1-methylxanthin (IBMX), 200 uM ascorbic acid, 33 uM biotin 및 1 mM carpyric acid를 첨가하여 6일 동안 세포의 지방분화를 유도시켰으며, 유도 후 매 2일 간격으로 분화 유도된 세포를 회수하였다. 본 실험에 사용된 시약은 별도의 언급이 없는

경우 Sigma-Aldrich (USA)의 분석용 시약을 사용하였다.

2. Oil red-O 염색

세포의 지방분화 정도를 확인하기 위하여 체외 배양 0일부터 2일 간격으로 oil red-O 염색을 실시하였다. 분화 경과별 세포를 PBS(Gibco)로 세척하고 10% formaldehyde로 45분간 고정시킨 후, 다시 PBS로 2회 세척하였으며, 60% isopropanol로 2분 동안 정지시켰다. 그 후, oil red-O (0.5 g/100 ml isopropanol) stock을 증류수를 이용하여 60%로 희석시킨 염색용액으로 30분 동안 염색하였고, PBS로 세척하여 위상차 현미경(Olympus, Japan)에서 400배의 배율로 붉게 염색된 지방 적을 확인하였다.

3. Total RNA 추출

BMSC의 지방분화에 따른 지방대사 관련 후보유전자의 발현량을 측정하기 위하여 분화 경과에 따라 회수된 세포에 TRIzol Reagent (Life Science, USA)를 첨가하여 total RNA를 추출하였다. 회수한 세포를 TRIzol 1 ml와 혼합하고 chloroform 200 ul를 첨가하여 혼합시켰다. 그 후, 10분간 원심분리(12,000 × rpm)하여 투명한 상등액을 회수하였고, 상등액과 동량의 isopropanol을 첨가하여 10분간 원심분리(12,000 × rpm)하여 pellet을 회수하였다. 회수된 pellet은 70% 에탄올로 세척·건조시킨 후, diethylpyrocarbonate (DEPC)를 처리한 증류수(DEPC water) 50 ul에 녹여 실험에 이용하였다.

4. cDNA 합성 및 real-time PCR 수행

Total RNA로부터의 cDNA 합성은 3 ul의 total RNA에 1 ul의 random hexamer primer, 1.5 ul의 dNTP, 7 ul의 DEPC water를 첨가하여 65°C에서 5분간 처리시킨 후, 4 ul의 5X buffer (Invitrogen, USA), 2 ul의 0.1 M DTT, 1 ul의 superscript enzyme 및 0.5 ul의 RNase inhibitor를 첨가하여 42°C에서 50분 동안 annealing시켜 70°C에서 15분간 cDNA를 합성하였다.

Real-time PCR (Applied Biosystems, USA)은 2 ul의 cDNA (50 ng), 10 ul의 2X Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 ul의 primers (10 pM) 및 7 ul의 DEPC water를 혼합하여 94°C에서 15초, 58°C에서 25초 동안 중합, 72°C에서 20초간 합성하였고, 전체 40 cycle을 수행하였다. PCR 종료 후, 산물의 quality를 측정하기 위하여 95°C에서부터 50°C까지 melting temperature 값을 측정하였고, 유전자 발현의 상대적 정량은 ΔCt 값(유전자의 Ct-GAPDH의 Ct 값)을 계산하여 2^{-ΔCt} 값으로 상대적 정량분석을 실시하였다. Ct 값은 threshold cycle로서 발현 peak가 형성되는 지점의 PCR cycle수로 나타낸다. 따라서 Ct 값이 클수록 발현량이 적음을 의미한다. 유전자 발현양의 내부를 보정을 위하여 house keeping 유전자인 GAPDH(glyceraldehydes-

Table 1. Oligo nucleotide primer sequence of the adipogenic genes

Gene	Type of primer	Primer Sequence
PPAR γ ¹⁾	Forward	5' - CGA TAT CGA CCA ACT GAA CC - 3'
	Reverse	5' - AAC GGT GAT TTG TCT GTC GT - 3'
FABP ²⁾	Forward	5' - CGT GGG CTT TGC TAC CAG - 3'
	Reverse	5' - TGG TTG ATT TTC CAT CCC AG - 3'
ICER ³⁾	Forward	5' - GGC ATT CAA GGA CAG CAA TA - 3'
	Reverse	5' - GGG CAT CCA GCA GTA CAA TAA - 3'
NOV ⁴⁾	Forward	5' - GGT GAA GTC CAA GGT CAT ACT GAG - 3'
	Reverse	5' - AGA GTG CTC CAC AGA GAA CCC TTA - 3'
HSPB1 ⁵⁾	Forward	5' - AGA TCA CTG GCA AGC ACG AGG AAA - 3'
	Reverse	5' - GGG CAG CGT GTA TTT GCG AGT GAA - 3'
SDH ⁶⁾	Forward	5' - TTC TGC GCA GTA TCC AGT TG - 3'
	Reverse	5' - CCA GTT GTC CTC CTC CAT GT - 3'
GAPDH ⁷⁾	Forward	5' - GGG TCA TCA TCT CTG GAC CT - 3'
	Reverse	5' - GGT CAT AAG TCC CTC CAC GA - 3'

¹⁾ PPAR γ , peroxisome proliferator activated receptor γ ; ²⁾ FABP4, Fatty Acid Binding Protein 4; ³⁾ ICER, inducible cAMP early repressor; ⁴⁾ NOV, nephroblastoma overexpressed protein; ⁵⁾ HSPB1, Heat Shock protein beta-1; ⁶⁾ SDH, Succinate dehydrogenase; ⁷⁾ GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

3-phosphate dehydrogenase)를 이용하였다. 위 실험은 3회 반복하였고, 각 primer sequence는 Table 1에 나타내었다.

5. 통계분석

BMSC의 지방분화에 따른 유전자의 발현양($2^{-\Delta Ct}$)은 각 유전자의 ΔCt -GAPDH ΔCt 으로 계산하였고, 분화 단계와 발현양과의 상관관계는 least square means (LSM)의 값으로 조사하였다. 각 유전자의 발현양상은 R-statistical program의 ANOVA 모델을 이용하여 분석하였고 유의적인 차이는 Duncan's multiple range test를 이용하여 검증하였다.

결과 및 고찰

1. BMSC의 지방분화 유도

BMSC 세포의 지방분화 정도를 알아보기 위하여 분화 배양액을 이용하여 6일 동안 분화유도 시켰고, 분화가 진행됨에 따라 2일 간격으로 Oil red-O로 염색하여 (Fig. 1) 붉은색으로 염색된 지방적이 지방분화 경과(0, 2, 4 및 6일)에 따라 증가되는 것을 확인하였다.

한편, 유전자 발현을 통해 지방세포 분화를 확인하기 위해 peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ)와 fatty acid binding protein 4 (FABP4) 유전자의 발현양을 real-time PCR을 이용하여 확인하였다(Fig. 2). BMSC의 지방분화유도 0일로부터 시간이 경과됨에 따라 두 유전자의 발현양이 유의적으로 증가하여 지방분화 6일의 경우 0일과 비교하였을 때, PPAR γ 는 3.11배, FABP4는 3.11배가 증가하였다($p < 0.05$). PPAR γ 는 세포의 지방분화를 조절하는 전사조절인자(Resen, 2005)로써, Bosnakovski

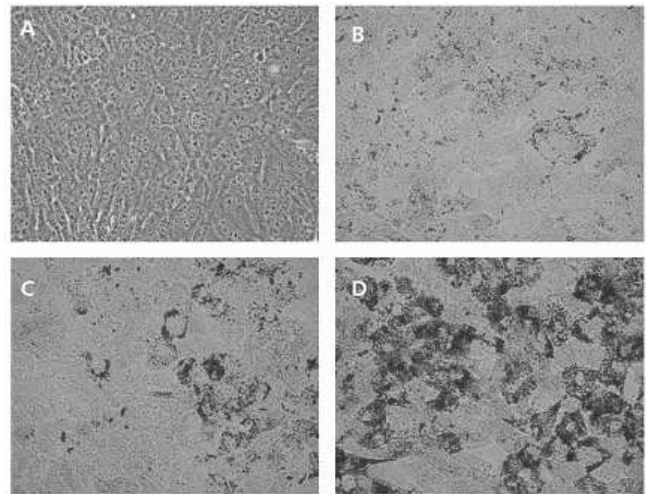


Fig. 1. Morphological changes of BMSCs during *in vitro* adipogenic differentiation. The cells were cultured in DMEM/low glucose medium with adipogenic inducers for 6 days and stained by Oil red-O solution at in every 2 days; A, day 0; B, day 2; C, day 4; D, day 6.

등(2005)은 BMSC을 이용하여 지방분화를 유도시킨 결과, PPAR γ 유전자가 대조구에 비해 8.4배 증가되었음을 보고하였다. FABP4는 지방세포로 분화되는 동안 지방산과 결합하여 세포내의 지방축적과 지방산의 산화에 주로 작용한다고 알려져 있는 지방산 결합 단백질이다(Frohnert 등, 1999; Wolfrum 등, 1999). Lee 등(2007)은 bovine preadipocyte 세포에서 지방분화 과정 동안 FABP4 유전자의 발현양이 지속적으로 증가한다고 보고하였다. 본 실험에서, PPAR γ 와 FABP4 유전자의 발현양상은 분화가 진행되면서 꾸준히 증가하는 것으로 나타나, 위의 연구자들의 연구결과와

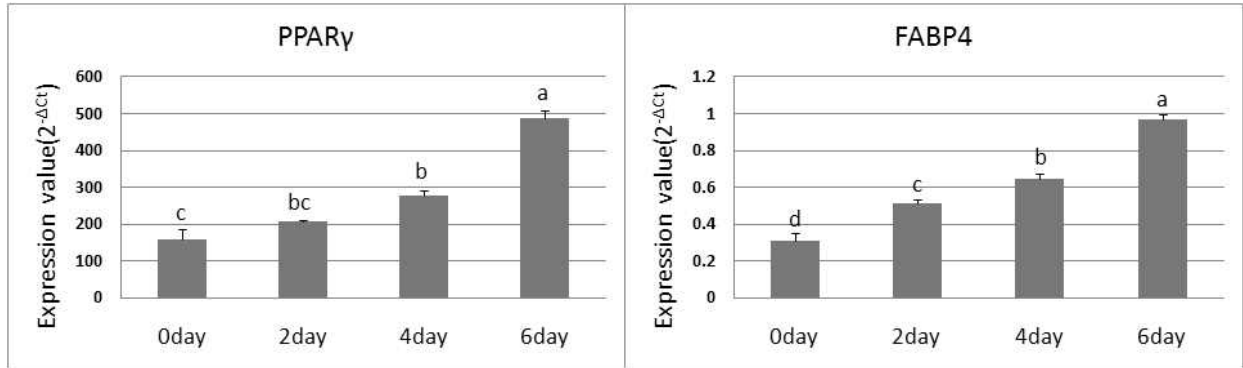


Fig. 2. mRNA expression of PPAR γ and FABP4 genes of BMSC during *in vitro* adipogenic differentiation. The expression values are shown as mean \pm standard error of three replicate runs. ^{a,b,c,d} means significantly differ, $p < 0.05$.

유사한 경향을 나타내었고, 지방분화 동안 세포내 지방축적이 지속적으로 증가됨을 통해 정상적으로 지방분화가 유도되었음을 확인할 수 있었다.

2. BMSC의 지방분화 중 ICER, NOV, HSPB1 및 SDH 유전자의 발현

BMSC의 지방분화 동안 inducible cAMP early repressor (ICER), nephroblastoma overexpressed protein (NOV), heat shock protein beta-1 (HSPB1) 및 Succinate dehydrogenase (SDH) 유전자의 발현양상을 real-time PCR을 통해 조사하여 Fig. 3에 요약하였다. ICER 유전자의 발현양은 0일 이후 유의적으로 증가하여 6일은 0일과 비교해서 4.12배 증가하였다 ($p < 0.05$). 반면, HSPB1 유전자의 발현양은 지방분화가 진행됨에 따라 0일 이후 유의적으로 감소하여 6일은 3.18배 감소하였고 ($p < 0.05$), NOV 및 SDH 유전자의 경우, 발현양이 0일과 비교하여 6일에는 각각 2.89배 및 2.36배의 감소를 보였으나, 4일과 6일에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 또한, 각 유전자의 발현양과 분화단계와의 관련성을 분석하기 위해 일반선형모형의 고정효과로 설정하여 분산분석을 실시하였다. 그 결과 발현양 수준 ($p < 0.001$)과 분화 경과와의

관계에서, ICER, NOV, HSPB1 및 SDH 유전자의 p value가 각각 2.218×10^{-7} , 1.677×10^{-7} , 6.075×10^{-9} 및 2.456×10^{-5} 으로 고도의 유의성이 있는 것으로 나타나, 이들 유전자가 지방분화 유도 동안 분화단계가 발현양에 큰 영향을 미치는 요인으로 나타났다 (Table 2).

ICER 유전자는 포도당과 지방산에 의해 증가하고 insulin 관련 유전자의 발현을 감소시킨다 (Zhou 등, 2003). 그러나 Lee 등 (2007)은 ICER 유전자의 발현이 지방세포를 분화시키는 동안 유의적으로 증가했고, 한우 비육 전·후기의 등심조직에서도 ICER 유전자의 발현양을 비교한 결과, 지방축적이 증가하는 비육후기에 높게 나타나, 이 유전자가 지방축적과 관련이 있다고 보고하였다. 본 실험에서도 ICER 유전자 발현양을 비교한 결과, 지방분화 0일에 비해 6일의 경우 4.12배의 증가를 보여 지방축적에 영향을 주는 것으로 나타났다. 한편, NOV 유전자는 닭에 retrovirus를 감염시키는 과정에서 분리된 유전자로 (Soret 등, 1989), Snaith 등 (1996)은 NOV 유전자가 세포의 분화와 증식에 관여하고, 특히 세포 성장 시 높게 나타났다고 보고하였고, Benini 등 (2005)과 Tanabe 등 (2008)도 세포의 성장인자로 작용한다고 보고한바 있다. 정 등 (2008)은 12, 20, 24, 27 및 30개월령의 한우를 이용하여 NOV 유전자의 발현양을 조사한 결과, 개월령에 따라 지속적으로 증가하여 30개월령에서 가장 많이 발현되었음을 보고하였다. 반면,

Table 2. Statistical analysis of adipogenic gene expressions using ANOVA between day 0 and day 6 during adipogenesis in BMSC

Gene	Source	Df	Sum sq.	Mean sq.	F value	Pr (>F)
ICER	Day	1	0.0045053	0.0045053	152.68	2.218e-07***
	Residuals	10	0.0002951	0.0000295		
NOV	Day	1	0.077193	0.077193	161.97	1.677e-07***
	Residuals	10	0.004766	0.000477		
HSPB1	Day	1	80.416	80.416	323.13	6.075e-09***
	Residuals	10	2.489	0.249		
SDH	Day	1	0.258123	0.258123	54.011	2.456e-05***
	Residuals	10	0.047791	0.004779		

*** Means significantly differ, $p < 0.001$.

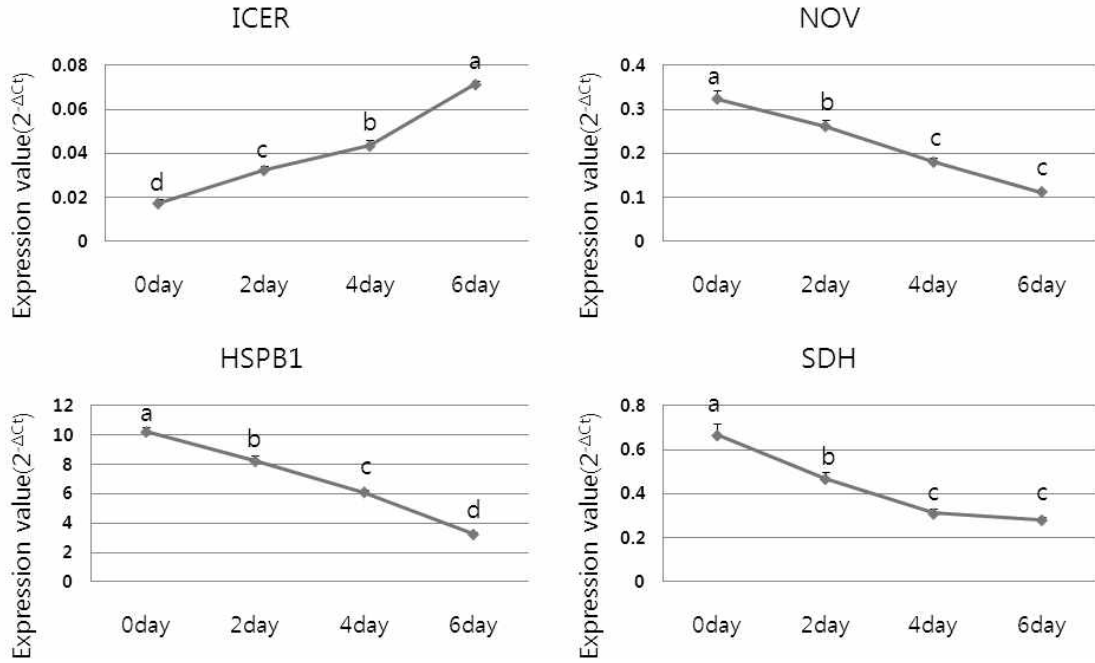


Fig. 3. mRNA expression of ICER, NOV, HSPB1 and SDH gene during *in vitro* adipogenic differentiation in BMSC. The expression values are shown as mean \pm standard error of three replicate runs. ^{a,b,c,d} means significantly differ, $p < 0.05$.

Kim 등(1997)과 Hwa 등(1999)은 NOV 유전자가 IGFBP와 유사하며, IGF의 활성을 억제하여 궁극적으로 지방분화를 억제한다는 결과를 보고하였다. 본 연구에서는, 지방분화가 진행될수록 NOV 유전자의 발현양이 0일에 비해 6일은 2.89배 감소하여 Kim 등(1997)과 Hwa 등(1999)의 결과와 유사한 경향을 나타냈다.

HSPB1 유전자는 stress 관련 단백질로 포유동물의 세포에서 apoptotic pathway를 차단하여 세포괴사를 막고, 세포증식에 도움을 준다고 알려져 있다(Garrido 등, 1999; Pandey 등, 2000). 김 등(2008)은 한우의 비육 전·후기의 HSPB1 유전자 발현양상을 비교한 결과, 지방양이 적은 비육전기에 많이 발현되었다고 보고하였다. 본 연구에서는 지방분화가 진행됨에 따라 HSPB1 유전자의 발현양이 지방 분화 0일의 10.2276에 비해 6일은 3.2147로서 3.18배의 감소를 나타내어, 김 등(2008)의 결과와 유사하게 나타나, 세포의 지방분화에 직접적으로 관여하는 것으로 추정된다.

또한 SDH는 succinate의 산화를 촉진시키고(Scheffler 등, 1998), 지방 합성과 대사에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 지방분화시 발현양이 감소된다고 보고되었다(Pethick 등, 2005). Kim 등(2009)은 한우에서 비육 전·후기의 SDH 발현양을 조사한 결과, 비육전기에서 두 배의 높은 발현양을 나타내었음을 보고하였다. 본 실험에서도 SDH의 발현양은 0일의 0.6666에 비해 6일이 0.2820으로 2.36배 감소하여 지방합성과 밀접한 관계가 있는 것으로 나타났고, 이러한 결과는 Pethick 등(2005)의 결과와도 유사한 경향을 나타냈다.

본 실험의 결과를 요약하면, ICER, NOV, HSPB1 및 SDH 유전자의 발현이 BMSC가 지방분화 하는 동안 유의적으로 증가 또는 감소하는 것으로 나타났고, 이들 유전자가 지방합성, 축적 및 대사와 관련이 있음을 보여주는 것으로, 세포의 지방분화와 관련이 있을 것으로 사료된다. 그러나 세포의 지방분화 mechanism을 정확히 규명하기 위해서는 유전자의 발현에 관여하는 전사조절인자 등과의 상호작용, 조절관계 및 이들 유전자의 기능에 대한 연구가 계속적으로 수행되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

본 실험은 지방대사에 영향을 주는 후보 유전자의 발현양상을 조사하기 위하여 bovine mesenchymal stem cell을 이용하여 체외에서 지방분화를 유도하였고, 지방분화 경과에 따른 지방관련 후보 유전자의 발현양상을 분석 하였다. Oil red-O 염색법을 이용하여 지방 분화양상을 조사한 결과, 지방 분화 단계별(0, 2, 4 및 6일)로 붉게 염색된 지방적이 증가되었음을 확인하였고, 지방대사의 indicator인 PPAR γ 와 FABP4 유전자는 지방분화 0일과 비교하여 6일에는 각각 3.11배와 3.11배가 증가하였다. 또한 지방대사와 관련이 있다고 추측되는 ICER, NOV, HSPB1 및 SDH 유전자의 발현양상을 조사한 결과, 지방분화 동안 ICER 유전자는 계속적으로 증가하여 6일은 0일에 비해 4.12배의 유의적인 증가를 보인 반면, NOV, HSPB1 및 SDH 유전자의 발현양은 0일 이후 계속적

으로 감소하여, 6일에서 각각 2.89배, 3.18배 및 2.36배의 감소를 나타냈다. 본 실험에서, 등심조직에서 근내지방도에서 차이를 나타냈던 ICER, NOV, HSPB1 및 SDH 유전자를 보다 구체적이고 직접적으로 세포에서 지방분화를 통해 연관성을 조사했을 때, 지방분화와 직접적으로 관련되어 있는 것으로 나타났으며, 지방 대사를 조절하는 유전자로 추정된다.

인 용 문 헌

- Benini, S., Perbal, B., Zambelli, D., Colombo, M. P., Manara, M. C., Serra, M., Parenza, M., Martinez, V., Picci, P. and Scotlandi, K. 2005. In Ewing's sarcoma CCN3 (NOV) inhibits proliferation while promoting migration and invasion of the same cell type. *Oncogene* 24:4349-4361.
- Bosnakovski, D., Mizuno, M., Kim, K. H., Taiagi, S., Okumura, M. and Fujinaga, T. 2005. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res.* 319:243-253.
- Bronnikov, G., Houstek, J. and Nedergaard, J. 1992. β -Adrenergic, cAMP-mediated stimulation of proliferation of brown fat cells in primary culture. Mediation via β 1 but not via β 3 receptors. *J. Biol. Chem.* 267:2006-2013.
- Frohnert, B. I., Hui, T. Y. and Bernlohr, D. A. 1999. Identification of a functional peroxisome proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene. *J. Biol. Chem.* 274:3970-3977.
- Garrido, C., Brucy, J. M., Fromentin, A., Hammann, A., Arrigo, A. P. and Solary, E. 1999. HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *FASEB J.* 13:2061-2070.
- Guo, X. and Liao, K. 2000. Analysis of gene expression profile during 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Gene* 251:45-53.
- Hwa, V., Oh, Y. and Rosenfeld, R. G. 1999. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr. Rev.* 20:761-787.
- Kazala, E. C., Petrak, J. L., Lozeman, F. J., Mir, P. S., Laroche, A., Deng, J. and Weselake, R. J. 2003. Hormone-sensitive lipase activity in relation to fat content of muscle in Wagyu hybrid cattle. *Livest. Prod. Sci.* 79:87-96.
- Kim, H. S., Nagalla, S. R., Oh, Y., Wilson, E., Roberts, C. T. and Jr Rosenfeld, R. G. 1997. Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 94:12981-12986.
- Kim, N. K., Lee, S. H., Cho, Y. M., Son, E. S., Kim, K. Y., Lee, C. S., Yoon, D. H., Im, S. K., Oh, S. J. and Park, E. W. 2009. Proteome analysis of the m. Longissimus dorsi between fattening stages in Hanwoo steer. *BMB reports* 42:433-438.
- Lee, S. H., Park, E. W., Cho, Y. M., Kim, S. K., Lee, Jun. H., Jeon, J. T., Lee, C. S., Im, S. K., Oh, S. J., Thompson, J. M. and Yoon, D. H. 2007. Identification of Differentiably Genes Related to Intramuscular Fat Development in the Early and Late Fattening Stages of Hanwoo Steers. *J. of Biochem. and Mol. Biol.* 40:757-764.
- Pandey, P., Farber, R., Nakazawa, A., Kumar, S., Bharti, A., Nalin, C., Weichselbaum, R., Kufe, D. and Kharbanda, S. 2000. Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3 *Oncogene* 19:1975-1981.
- Pethick, D. W., D'Souza, D. N., Dunshea, F. R. and Harper, G. S. 2005. Fat metabolism and regional distribution in ruminants and pig-influences of genetics and nutrition. *Rec. Adv. Anim. Nutr.* 15:39-45.
- Resen, E. D. 2005. The transcriptional basis of adipocyte development. *Prostag. Leukotr. Ess.* 73:31-34.
- Scheffler, I. E. 1998. Molecular genetics of succinate; quinone oxidoreductase in eukaryotes. *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* 60:267-315.
- Snaith, M. R., Natarajan, D., Taylor, L. B., Choi, C. P., Martinerie, C., Perbal, B., Schofield, P. N. and Boulter, C. A. 1996. Genomic structure and chromosomal mapping of the mouse nov gene. *Genomics* 38:425-428.
- Soret, J., Dambrine, G. and Perbla, B. 1989. Induction of nephroblastoma by myeloblastosis-associated virus type 1: state of proviral DNAs in tumor cells. *J. Virol.* 63:1803-1807.
- Tanabe, S., Sato, Y., Suzuki, T., Suzuki, K., Nagao, T. and Yanaguchi, T. 2008. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells for differentiation of novel markers in early- and late-stage cell culture. *J. Biochem.* 144:399-408.
- Wolftrum, C., Ellinghaus, P., Fobker, M., Seedorf, U., Assmann, G., Borchers, T. and Spener, F. 1999. Phytanic acid is ligand and transcriptional activator of murine liver fatty acid binding protein. *J. Lipid Res.* 40:708-714.
- Yagi, K., Kondo, D., Okazaki, Y. and Kano, K. 2004. A novel preadipocyte cell line established from mouse adult mature adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321:967-74.
- Zhou, Y. P., Marlen, K., Palma, J. F., Schweitzer, A., Reilly, L., Gregoire, F. M., Xu, G. G., Blume, J. E. and Honson, J. D. 2003. Overexpression of repressive cAMP response element modulators in high glucose and fatty acid-treated rat islets. A common mechanism for glucose toxicity and lipotoxicity?. *J. Biol. Chem.* 278:51316-51323.
- 김남국, 김성곤, 허강녕, 윤두환, 이창수, 임석기, 박응우. 2008. 한우 비육 기간 중 중성지방 생합성 관련 유전자의 발현양상. *한국동물자원과학회지.* 50:293-300.
- 서종배, 이윤석, 김재범. 2004. 지방조직과 지방세포 분화에 대한 연구. *Bio-Medical Science.* 2:17-46.
- 이승환, 박응우, 조용민, 김경훈, 오영균, 이지혜, 이창수, 오성중, 윤두환. 2006. 한우 비육 전·후기의 등심조직에 있어서 지방합성 유전자 발현. *한국동물자원과학회지.* 48:345-352.
- 임희경, 최강덕, Baatartsogt Oyungerel, 최영숙, 정정수. 2008. Retinoic Acid가 돼지 지방전구세포의 분화와 유전자 발현에 미치는 영향. *한국동물자원과학회지.* 50:475-484.
- 정유성, 김남국, 김건석, 김범수, 문희주, 김남영, 허강녕, 이승환, 박응우, 임석기. 2008. 한우 성장단계에 따른 한우 등심조직 내 경제형질관련 유전자의 발현양상 분석. *한국동물자원학회 춘계학술발표회 초록.* NO. PA28087.

(접수일자 : 2010. 3. 24 / 수정일자 : 2010. 7. 28 / 채택일자 : 2010. 8. 4)