

Effects of Selenate on Adipocyte Differentiation and the Expression of Selenoproteins in 3T3-L1 Cells

Seol Hui Park¹ and Yang Soo Moon^{2*}

¹School of Medicine, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

²Department of Animal Science & Biotechnology, Gyeongsang National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea

Received September 11, 2014 / Revised October 8, 2014 / Accepted October 14, 2014

The purpose of this study was to determine the effect of selenate on adipocyte differentiation and to identify genes involved in the modulation of adipogenesis in 3T3-L1 cells. To test the effect of selenate on adipocyte differentiation, adipogenesis was induced in cells using various concentrations (0 - 00 μ M) of selenate. Various phases of adipogenesis were induced: postconfluent (PC), early phase (EP, d0-d2), postmitotic growth arrest (PM, d2-d4), and all period (AP). The PC cells exposed to selenate for 24 h displayed dose-dependent inhibition of intracellular lipid droplet accumulation on day 6 of adipogenesis. Two days of selenate treatment at EP or AP inhibited adipogenesis, with an approximately 20 - 80% reduction in lipid accumulation compared to that of a control ($p < 0.05$). When pre-adipocytes were exposed to selenate during the PM period, the antiadipogenic effect of selenate was attenuated. Two types of selenoprotein genes (*Seps1* and *Sepp1*) were up-regulated by the selenate treatment during mitotic clonal expansion, whereas these genes were down-regulated during PM growth arrest ($p < 0.05$). The findings demonstrate the antiadipogenic function of selenate and the possible involvement of *Sepp1* and *Seps1* genes in selenate-inhibited adipogenesis in 3T3-L1 cells.

Key words : 3T3-L1 cells, adipocyte differentiation, gene expression, selenate, selenoprotein

서 론

Selenium은 필수 미량광물질로서 오래 전부터 여러 효소의 구성요소로 알려져 왔다[18]. 최근에는 저농도에서 항산화제로서[3], 고농도에서는 항암제로서[17] 그 기능이 알려짐에 따라 영양첨가제로서 이용되고 있다. 1990년대에는 selenate가 인슐린과 유사한 기능을 하여 당뇨질환동물에서 지방합성에 주요역할을 하는 효소인 지방합성효소(FAS)와 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)의 발현에 관여하는 것으로 보고 되었다[1]. 또한 지방세포배양실험과 동물실험에서도 selenate은 강력한 인슐린 유사 기능이 확인되었다[5, 13]. 이와 같이 selenium이 지방대사와 연관되는 효소와 호르몬의 기능이 알려짐에 따라 selenium이 지방세포의 분화에 어떤 영향을 미치는지에 대한 연구에 관심을 가지게 되었다. 최근에 selenium이 지방세포의 분화억제효과가 있으며 이는 TGF- β 의 유도에 의한 결과임을 보고하였다[7]. 이 연구에 의하면 selenium에 의한 지방분화억제 효과는 selenium의 형태 중 selen-

ite은 세포에 독성을 나타내거나 세포분화억제 능력을 나타내지 않았으며, selenate는 지방전구세포에서 TGF- β 발현을 촉진하고 효과적으로 지방세포분화 억제를 유도하였다고 한다. 비만유도모델 쥐를 이용한 selenium 급여 효과 실험에서, selenium은 지방산의 β -산화(β -oxidation)를 통하여 지방세포의 증대(hypertrophy)와 복부 지방의 축적을 억제한다고 하였다[7]. 이 연구에서 selenium은 쥐의 혈중 포도당의 농도를 낮춤으로써 인슐린과 유사한 기능을 보였으며, 복부지방 함량과 지방세포의 크기도 감소하였다고 한다. Selenium은 생체 내 selenoprotein으로 전환되어 이용된다[15]. 지금까지 약 25종의 selenoprotein이 알려졌으며, 이들 중 7가지가 소포체(ER, endoplasmic reticulum)에 내재되어 있는 것으로 알려져 있다[12]. 이들 중 selenoprotein S로 알려진 *Seps1*은 plasma membrane과 ER membrane에 위치에 있다[6, 10]. *Seps1*의 기능 중 하나는 ER stress를 조절하는 것으로 ER의 항상성유지에 중요한 기능을 한다고 한다[20]. 포도당결핍유도 혹은 ER stress을 세포에 가할 경우 *Seps1*의 발현이 유도되고, 대식세포에서 ER stress 유도제에 의한 세포의 apoptosis가 유도된 경우 *Seps1*은 이를 억제하는 기능을 나타낸다[6, 9]. Selenium을 급여한 동물실험에서 체중감소효과가 보고된바[2] 있으나 selenium이 지방세포분화와 연관된 구조적 기작에 대해서는 아직 잘 알려진 바가 없다. *Sepp1*은 selenoprotein P의 대표적 isoform중의 하나로 비만과 인슐린 내성과 관련 있는 것으로 알려져 있으며 지방세포에서의 *Sepp1*의 발현은 비만과 인슐린

*Corresponding author

Tel : +82-55-751-3262, Fax : +82-55-751-3267

E-mail : ysmoon@gntech.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

내성과 역의 상관관계이다[21]. 3T3-L1세포에서 *Sepp1*의 발현을 억제(knocking down)하였을 때 지방세포로의 분화가 감소하였다고 한다. 즉 selenoprotein P의 발현을 억제는 지방세포의 분화를 감소시킨다. 이와 같이 selenium은 세포배양실험뿐만 아니라 동물실험에서도 지방세포의 분화 혹은 지방조직의 양적 감소를 유도함을 보여 주었다. 그러나 selenate이 지방세포의 분화 단계에서 어떤 시점에 영향을 주는지, 그리고 어떤 유전자들의 발현이 지방세포의 분화에 관여하는지에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 selenate의 지방세포분화가 어떤 시점에 가장 효과적으로 작용하는지 그리고 selenate이 지방세포분화에 관여하는 selenoprotein 유전자들의 발현양상을 알아 보고자 마우스 3T3-L1 세포를 이용하여 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

세포배양, 지방세포분화유도 및 selenate처리

마우스3T3-L1 세포주는 ATCC (American Type Culture Collection, Manassa, VA, USA)에서 분양 받아 사용하였다. 3T3-L1 지방전구세포는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS)에 유지하였다. 3T3-L1세포가 confluent된 다음 2일 후(day 0)에 10% FBS에 지방세포분화 유도배지성분 (insulin 167 nM, IBMX 0.5 mM, DEX 5 μM)이 함유된 DMEM에 세포의 분화를 유도하였다. 세포는 10%-FBS와 insulin이 첨가된 배지에서 2일간 배양하였으며, 이후 10%FBS-DMEM 배지에서 추가로 2일간 배양하여 성숙된 지방분화세포를 유도하였다. 모든 배지에는 penicillin 100 U/ml과 streptomycin 100 μg/ml이 포함되도록 하였다. 세포는 37°C로 유지되는 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다. 세포내 지방구 형성을 확인하기 위하여 Oil-red O (ORO) (Sigma Co, St Louis,

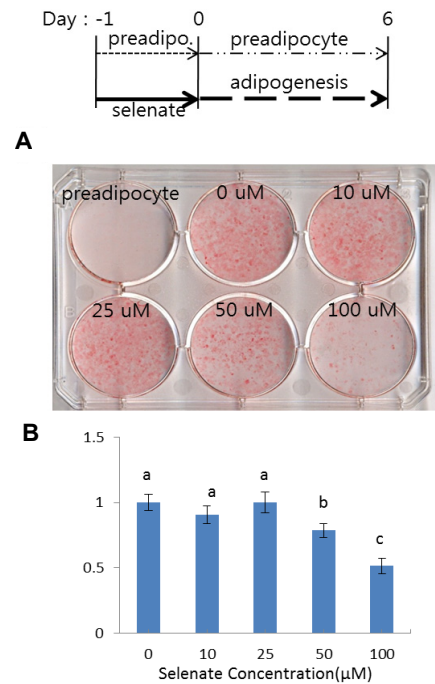


Fig. 1. Pre-treatment of selenate inhibits adipocyte differentiation in a dose-dependent manner on 3T3-L1 cells. One-day post-confluent (day-1) 3T3-L1 preadipocytes were subjected to a 24 hr selenate treatment with various concentrations. After differentiation, cells were measured to Oil-red O staining for photographic analysis of lipid accumulation (A), followed by a quantitative analysis of ORO-stained intracellular lipids among differentiated 3T3-L1 cells (B). The amount of ORO-stained intracellular lipid was expressed as relative fold of control (0 μM). a, b, c Values (means ± S.D) with different letters represent significant differences at p<0.05.

MO, USA) 염색을 실시하였다. ORO 염색은 세포분화유도 6일(day 6) 후에 실시하였으며, 염색된 세포는 광학현미경으로

Table 1. Primer pairs used to analyze gene expression by real-time RT-PCR and size of product

Genes	Primer sequence (5'-3')	Size of product (bp)	Accession number (GenBank)
<i>β-Actin</i>	Forward: GGGAAGGTGACAGCATTG Reverse : ATGAAGTATTAAGGCCGAAGATT	77	NM_007393
<i>Xbp1</i>	Forward: GGATTTGGGAAGAAGAGAACCACAA Reverse : CCGTGAGTTTTCTCCCGTAAAA	65	NM_013842
<i>Grp78</i>	Forward: CGGACGCACTTGAATGAC Reverse : AACCACCTTGAATGGCAAGAA	63	NM_001163434
<i>Chop</i>	Forward: GTCCTGTCTCAGATGAAATTGG Reverse : AAGGTTTTGATTCTTCTCTTCGT	73	NM_007837
<i>Seps1</i>	Forward: GCTGGACCAAGCCGAGACT Reverse : GCTAAAGCCTCTTGCCGCTTA	62	NM_024439
<i>Sepp1</i>	Forward: CAAGAAGAAGATGGCATA Reverse : AATGTGAGGAAGGAGTAA	122	NM_001042613

관찰한 후 지방의 축적 정도를 측정하기 위하여 isopropanol 을 이용하여 염색을 세포로부터 추출한 다음 분광광도계 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Selenate의 처리 효과를 조사하기 위하여 selenate을 농도별 (0-100 μM)로 3T3-L1지방전구세포가 confluent 1일 전에 처리를 한 다음 지방분화유도 배지를 이용하여 분화유도를 하고 분화유도 6일 후 ORO 염색을 실시하였다. RNA추출은 분화유도 4일 후에 실시하여 유전자들의 발현을 비교 분석하였다. Selenate의 농도별 결과 중에서 50 μM을 선택하여 지방전구세포의 confluent 이전 24시간 처리, 분화유도 전기, 분화유도 중기, 그리고 전분화기간을 selenate을 처리하여 지방세포의 분화에 어떤 영향을 미치는지 조사하였다. 지방세포분화 또는 ER-stress 지표 유전자들의 발현은 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)로 분석하였다.

Total RNA 추출과 quantitative RT-PCR 분석

3T3-L1세포로부터 total RNA의 추출은 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 제조사의 이용안내에 따라 total RNA를 추출하였다. cDNA 합성은 1 μg의 추출된 total RNA를 Improm-II Reverse Transcription System (Promega, Madison, USA)를 이용하여 합성하였다. 합성된 cDNA는 qRT-PCR을 위하여 이용되었다. qRT-PCR은 MyiQ (Bio-Rad, Hercules, USA)을 이용하여 시행하였다. qRT-PCR을 위한 primer의 정보는 Table 1에 제시하였다. PCR 반응물은 cDNA (10 ng) 5 μl, primer (5 pmole)는 각각 0.5 μl, SYBR Green (Applied Biosystems, USA) 10 μl, ddH₂O 4 μl 를 넣어 총 20 μl 가 되도록 혼합하고 95°C 3분간 최초 변성을 시킨 다음 95°C 15초간 변성, 60°C에서 15초간 접합, 72°C 40초간 확장 과정을 40회 반복하였다. 그리고 94°C 1분간 재 접합 과정을 거친 후 55°C에서 1분간 재 확장 과정을 실시하였다. 마지막으로 55°C에서 0.5°C씩 상승시켜 형광접합물질인 SYBR Green이 떨어져 나오는 마지막 과정을 수행하였다. 유전자 발현의 상대적 발현양은 Livak와 Schmittgen [11]가 제시한 2^{-ΔΔCt} 방법을 이용하였다.

통계처리

통계처리는 SAS 프로그램을 이용하였으며, 실험성적은 평균과 표준오차를 구하고 분산분석을 실시한 다음 Duncan's multiple range test에 의하여 95% 수준에서 유의성을 검정하였다[4]. Selenoprotein 유전자 발현은 대조군과 비교하여 Student's t-test 한 후 유의수준 0.05 및 0.01 이하로 유의성 분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

Selenate의 처리 시기와 지방전구세포의 분화 억제

Selenate의 처리시기별 농도별 지방전구세포 3T3-L1의 분

화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 selenate을 세포가 confluent된 1일 후, 즉 세포분화 유도 1일 전에 selenate를 24시간 처리하였다. 처리농도는 0 μM, 10 μM, 25 μM, 50 μM, 100 μM 등으로 달리하여 세포에 처리하였다. Selenate처리 24시간 후 세포는 일반적인 3T3-L1세포의 분화유도 프로그램과 같이 2일간 10% FBS + adipogenic inducing medium으로 배양, 2일간 10% FBS + Insulin으로 배양, 그리고 나머지 2일은 10% FBS + DMEM으로 배양하였다. Selenate의 처리에 의하여 지방전구세포는 분화가 억제되었으며, 처리된 selenate의 농도가 높아짐에 따라 그 억제효과는 높았다(Fig. 1). ORO staining을 양적으로 분석한 결과(OD측정) 10 μM 과 25 μM 에서는 유의적인 지방세포분화 억제 효과를 나타내지 않았으며, 처리농도 50 μM에서 약 20%정도 지방세포의 분화를 억제하였다. 최고농도의 selenate (100 μM)에서는 정상적인 분화를 유도한 처리구(0 μM)에 비하여 세포내 지방축적이 약 50% 감소된 것을 확인할 수 있었다.

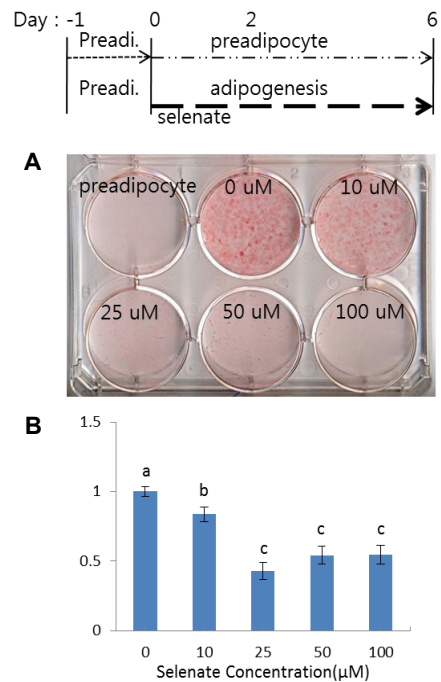


Fig. 2. Treatment of selenate on the early phase of adipogenesis inhibits adipocyte differentiation in a dose-dependent manner on 3T3-L1 cells. (A) Post-confluent 3T3-L1 preadipocytes (day 0) were subjected to a 48h selenate treatment (day 0-day 2) with various concentrations. After differentiation, cells were measured to Oil-red O staining for photographic analysis of lipid accumulation (A), followed by a quantitative analysis of ORO-stained intracellular lipids among differentiated 3T3-L1 cells (B). The amount of ORO-stained intracellular lipid was expressed as relative fold of control (0 μM). a, b, c Values (means ± S.D) with different letters represent significant differences at p<0.05.

지방세포분화의 초기(day0-day2: early phase of adipocyte differentiation)에 selenate의 처리가 지방전구세포의 분화에 어떤 영향을 미치는지 조사하기 위하여 위에 처리한 selenate을 같은 농도로 3T3-L1세포에 2일간 분화 초기(day0-day2)에 지방세포분화유도 배지와 함께 배양하였다. 분화초기에 처리된 selenate은 효과적으로 지방세포의 분화를 억제하였으며, selenate의 처리농도가 증가할수록 지방세포의 분화를 강력하게 억제함을 볼 수 있었다(Fig. 2). 그러나 selenate을 지방세포분화 유도배지에 배양한 후 2일간 (day2-day4; post-mitotic growth arrest) 처리한 경우 지방세포분화 억제 효과는 크게 감소함을 보여 주었다(Fig. 3). 이 경우 selenate의 농도를 증가시켜도 지방세포의 분화는 정상적으로 진행됨을 확인하였다. 마지막으로 지방전구세포의 분화 전 기간(day0-day6)동안 selenate을 처리한 경우 지방전구세포의 분화는 효과적으로 억제 되었으며, 처리된 selenate의 농도가 증가함에 따라 유의하게 세포의 분화를 억제하였다(Fig. 4).

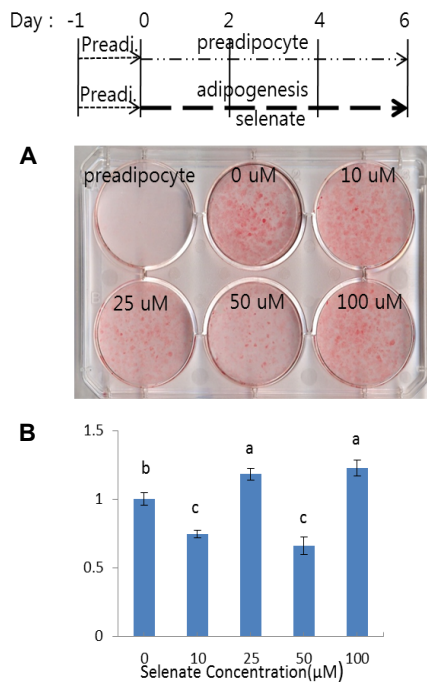


Fig. 3. Treatment of selenate on the post-mitotic growth arrest phase of adipogenesis attenuates adipocyte differentiation on 3T3-L1 cells. The post-mitotic growth arrest phase of 3T3-L1 preadipocytes (day 2-day 4) were subjected to a 48hr selenate treatment with various concentrations. After differentiation, cells were measured to Oil-red O staining for photographic analysis of lipid accumulation (A), followed by a quantitative analysis of ORO-stained intracellular lipids among differentiated 3T3-L1 cells (B). The amount of ORO-stained intracellular lipid was expressed as relative fold of control (0 μM). a, b, c Values (means ± S.D) with different letters represent significant differences at $p < 0.05$.

지방세포에서 selenate와 ER stress지표 유전자발현

소포체(ER)의 stress는 지방세포분화의 가장 초기단계의 현상중의 하나로 소포체에서 생화학적, 생태학적 변화를 거치면서 수많은 단백질을 새롭게 만들게 되는데, 경우에 따라 지나치게 많이 만들어진 단백질 때문에 소포체는 스트레스를 받게 된다. 이와 같은 ER스트레스는 비만과 인슐린저항성과도 밀접한 상호 관계가 있는 것으로 알려져 있다[14, 18]. 따라서 selenate의한 지방세포분화 억제에 ER stress 연관 마커 유전자들의 발현 양상이 어떻게 반응하는지 확인하기 위하여 selenate의 각 처리시기별 및 처리 농도에 따라 Glucose - response protein 78 kDa (*Grp78*), X-box binding protein 1 (*Xbp1*), C/EBP homologous protein (*Chop*) 유전자들의 발현을 qRT-PCR을 이용하여 세포의 분화유도 4일 후(day 4)에 total RNA을 추출하여 분석하였다(Fig. 5). 지방전구세포에 selenate를 처리한 후 지방세포를 분화 유도한 경우 ER-stress marker 유전자들인 *Grp78*, *Xbp1*, 그리고 *Chop*은 주로 고농도에서 그 발현이 크게 감소함을 보였다. 본실험에서 소포체 스

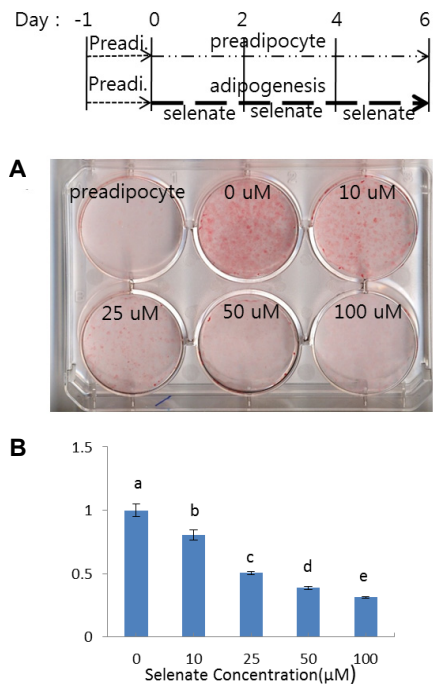


Fig. 4. Treatment of selenate on the all period of adipogenesis inhibits adipocyte differentiation on 3T3-L1 cells. The 3T3-L1 preadipocytes (day 0-day 6) were subjected to a 6-day selenate treatment with various concentrations. After differentiation, cells were measured to Oil-red O staining for photographic analysis of lipid accumulation (A), followed by a quantitative analysis of ORO-stained intracellular lipids among differentiated 3T3-L1 cells (B). The amount of ORO-stained intracellular lipid was expressed as relative fold of control (0 μM). a, b, c, d Values (means ± S.D) with different letters represent significant differences at $p < 0.05$.

트레스 지표유전자들의 발현이 감소된 것은 세포내 지방의 축적이 ER스트레스를 유발하고 관련 지표유전자들의 발현을 유도한다는 보고[18]와 유사함을 볼 수 있다. 즉, HepG2세포 배양시험에서 중성지방은 ER stress marker 유전자들의 발현과 인슐린 저항(insulin resistance)을 유도하였다. 본 시험에서는 selenate의 처리는 지방전구세포의 분화를 억제함으로써 지방전구세포의 분화와 더불어 진행되는 세포내 지방구형성을 억제함으로써 세포의 ER스트레스의 증가를 억제한 것으로 사료된다. Selenate의 처리는 지방전구세포에게 대사스트레스(세포내 지방산, 포도당 증가 등)에 대한 소포체의 스트레스 증가를 억제함으로써 소포체내의 GRP78 단백질들이 PERK, ATF6, IRE1과 결합한 상태에서 분리되고, GRP78으로부터 자유로워진 위의 단백질들은 활성화되고 활성화된 이들 단백질들은 각각의 신호전달 체계를 통하여 ER stress의 다음 단계 반응을 이어간다. IRE1의 경우 *Xbp1*의 발현을 촉진하고, 활성화된 spliced XBP1은 핵 내로 이동하여 unfolded protein response (UPR) 유전자들(*Grp78*, *Xbp1*, *Chop*)의 발현을 다시 촉진하게 된다[19]. 그러나 지방전구세포에서 selenate와 연관된 ER 스트레스와 세포내 신호전달 기작은 아직 밝혀진바 없기 때문에 이에 대한 연구가 더 필요한 것으로 사료된다.

지방전구세포에서 selenate의 처리와 selenoprotein 유전자 발현

본 연구에서 selenate를 지방전구세포 혹은 지방세포분화 초기에 처리하였을 때 지방세포의 분화를 효과적으로 억제하는 것을 ORO 염색을 이용하여 확인하였다. 그리고 이러한 분화억제에는 ER스트레스 유전자들 또한 관여하는 것으로 확인하였다. 지방세포분화, ER스트레스, 그리고 selenate와 공통적으로 연관된 selenoprotein 유전자들 중 *Seps1*과 *Sepp1* 유전자들의 발현 양상을 조사하였다. 본 연구에서는 3T3-L1 세포에서 50 μM의 selenate를 post-confluent 1일 후 24시간 처리하였으며, 지방세포분화유도 체계에 따라 day 0부터 day 4까지 매일 RNA를 추출한 다음 *Seps1*과 *Sepp1*의 발현을 qRT-PCR로 분석하였다. Fig. 6 (A)에서 보는 바와 같이 *Seps1* mRNA의 수준은 day 0에서 selenate가 처리되지 않은 대조구에 비해 2.2배 그 발현이 증가하였으며($p<0.05$), 분화유도 day 1에서도 그 정도는 낮아졌으나 여전히 높은 발현을 보였다. 그러나 day 2를 기점으로 급격하게 *Seps1*의 발현은 감소하였으며 이후에는 오히려 대조구에 비하여 크게 낮아진 발현 양상을 보였다($p<0.05$). *Sepp1*의 경우에도 *Seps1*과 유사한 발현 양상을 보였는데, 특히 분화유도 초기에 대조구에 비하여 3.6배(day 0) 혹은 5.2배(day 1) 높은 발현을 보였다($p<0.05$) (Fig. 6B). *Sepp1*의 발현은 분화유도 day 2를 기점으로 급격하게 감소하였으며

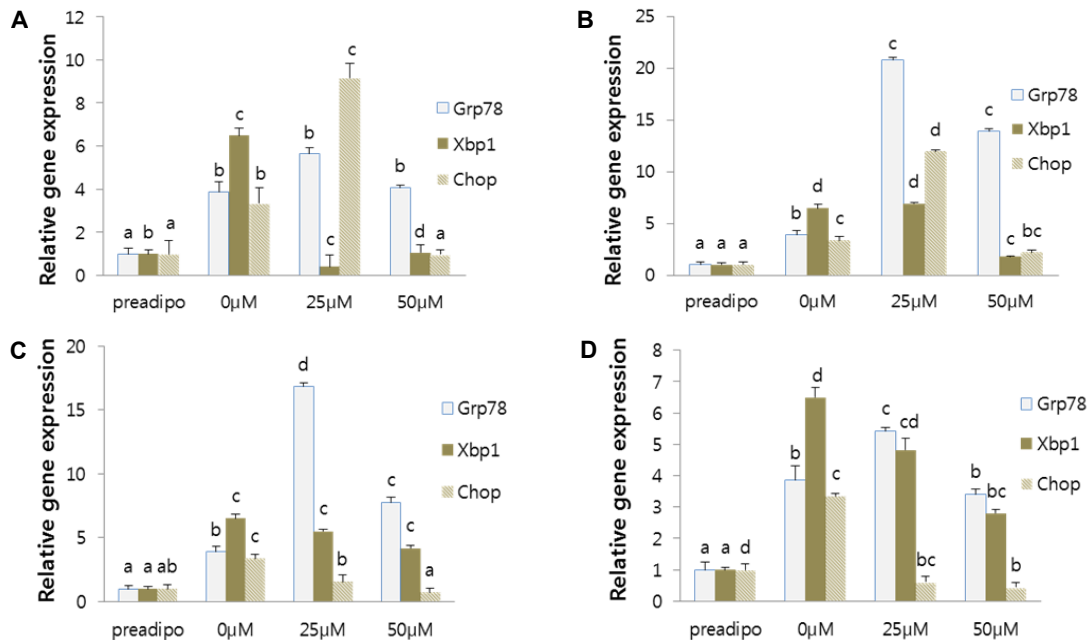


Fig. 5. Expression of ER-stress marker genes on 3T3-L1 cells incubated with selenate. Cells were incubated with various concentrations of selenate and were treated with selenate during specific given time period of adipogenesis. Cells harvested at day 6 were subjected to quantitative gene expression analysis by real-time RT-PCR. The signals were normalized to β -actin internal control and the results were expressed as relative fold of induction. (A) pre-treatment of selenate on one-day postconfluent of cells; (B) selenate treatment during the early phase of adipogenesis; (C) selenate treatment during the post-mitotic growth arrest phase of adipogenesis; (D) selenate treatment during the all period of adipogenesis. a, b, c, d Values with different letters within the same bars significant differences at $p<0.05$.

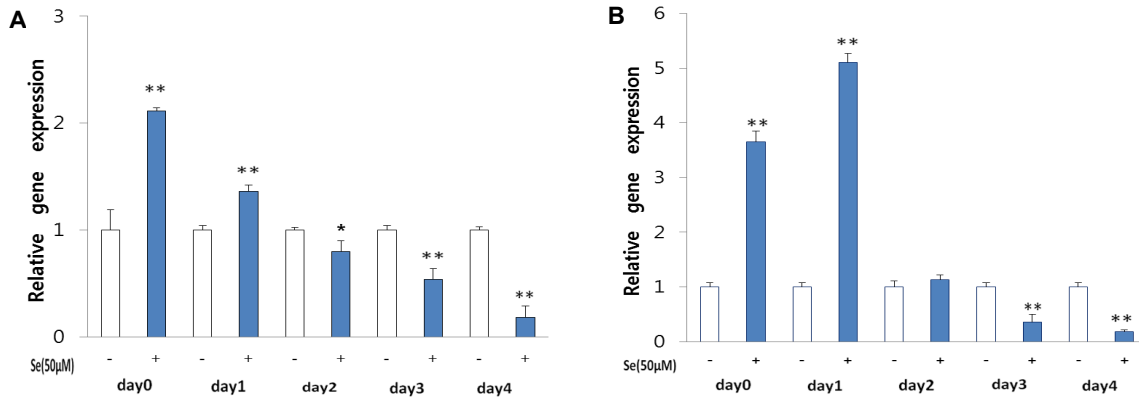


Fig. 6. Analysis of solenoprotein gene expressions with quantitative real-time RT-PCR. One-day post-confluent (day-1) 3T3-L1 pre-adipocytes were subjected to a 24 hr selenite (50 µM) treatment and each time period total RNA was extracted for *Seps1* (A) or *Sepp1* (B) gene expressions. Data are given as means of values ± S.D from three independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, compared to control group.

이후에도 낮은 발현 수준을 유지하였다. *Seps1*의 경우 포도당 대사와 연관된 ER스트레스에 의해 발현되며, *Seps1*단백질은 지방전구세포에서 분화유도 초기에 급격한 발현 감소와 함께 지방세포분화를 억제한다고 한다[8]. 본 연구에서는 *Seps1*의 발현이 세포의 분열이 최종적으로 일어나는 mitotic clonal expansion 기간(day 0-day 2)에는 높은 발현을 보이지만 post-mitotic growth arrest (day 2-day 4) 기간에는 *Seps1* 유전자가 낮은 발현을 보이는 것은 selenate 처리에 의한 지방세포 분화 억제와 연관이 있는 것으로 보인다. Selenium을 급여한 동물실험에서 체중감소효과가 보고된바[2] 있으나 Selenium이 지방세포분화와 연관된 구체적 기작에 대해서는 아직 잘 알려진 바가 없다. 본 연구에서도 selenate에 의한 분화유도 초기 급격한 *Seps1*의 발현변화에 대하여 현 단계에서 명확한 이유를 찾을 수 없으므로 이에 대한 체계적 연구가 필요한 것으로 사료된다. Solenoprotein P의 대표적 isoform 중의 하나인 *Sepp1*은 비만과 인슐린 내성과 관련 있는 것으로 알려져 있으며 지방세포에서 *Sepp1*의 유전자를 knock-down을 한 경우 정상적인 지방세포의 분화가 억제되었다고 한다[21]. 또한 3T3-L1 세포에서 TNF α 또는 H $_2$ O $_2$ 를 처리한 결과 *Sepp1*의 발현이 억제되었고, 산화적 스트레스와 염증반응에 의한 *Sepp1*의 발현 억제는 지방세포분화와 지방합성 연관 유전자(lipogenic genes)들의 발현을 억제한다고 하였다[21]. 이는 지방세포가 정상적 분화를 하기 위해서는 *Sepp1*은 정상적으로 발현되어야 함을 의미하며, 본 연구에서와 같이 selenate의 처리에 따른 *Sepp1*의 급격한 발현 변화와 post-mitotic growth arrest 기간 (day 2-day 4)의 낮은 발현 양상이 세포내 정상적 지방구형성과 세포의 분화를 억제한 것으로 사료된다. Selenate 처리에 따른 이들 solenoprotein들의 분화유도 초기 급격한 발현 변화와 지방세포분화 억제조절에 대한 기작은 앞으로 밝혀져야 할 부분이다.

감사의 글

본 논문은 차세대 바이오그린21 사업(과제번호: PJ007981) 및 2013년도 경남과학기술대학교 기성회 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

References

- Berg, E. A., Wu, J. Y., Campbell, L., Kagey, M. and Stapleton, S. R. 1995. Insulin-like effects of vanadate and selenate on the expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase and fatty acid synthase in diabetic rats. *Biochimie* **77**, 919-924.
- Bock, B. C., Kanarek, R. B. and Aprille, J. R. 1995. Mineral content of the diet alters sucrose-induced obesity in rats. *Physiol Behav* **57**, 659-668.
- Burk, R. F. and Lane, J. M. 1979. Ethane production and liver necrosis in rats after administration of drugs and other chemicals. *Toxicol Appl Pharmacol* **50**, 467-478.
- Duncan, D. B. 1995. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* **11**, 1-42.
- Ezaki, O. 1990. The insulin-like effects of selenate in rat adipocytes. *J Biol Chem* **265**, 1124-1128.
- Gao, Y., Feng, H. C., Walder, K., Bolton, K., Sunderland, T., Bishara, N., Quick, M., Kantham, L. and Collier, G. R. 2004. Regulation of the solenoprotein SelS by glucose deprivation and endoplasmic reticulum stress - SelS is a novel glucose-regulated protein. *FEBS Lett* **563**, 185-190.
- Kim, C. Y., Kim, G. N., Wiacek, J. L., Chen, C. Y. and Kim, K. H. 2012. Selenate inhibits adipogenesis through induction of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **426**, 551-557.
- Kim, C. Y. and Kim, K. H. 2013. Dexamethasone-induced solenoprotein S degradation is required for adipogenesis. *J Lipid Res* **54**, 2069-2082.
- Kim, K. H., Gao, Y., Walder, K., Collier, G. R., Skelton, J.

- and Kissebah, A. H. 2007. SEPS1 protects RAW264.7 cells from pharmacological ER stress agent-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **354**, 127-132.
10. Kryukov, G. V., Castellano, S., Novoselov, S. V., Lobanov, A. V., Zehab, O., Guigó, R. and Gladyshev, V. N. 2003. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* **300**, 1439-1443.
 11. Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**, 402-408.
 12. Lu, J. and Holmgren, A. 2009. Selenoproteins. *J Biol Chem* **284**, 723-727.
 13. McNeill, J. H., Delgatty, H. L. and Battell, M. L. 1991. Insulinlike effects of sodium selenate in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes* **40**, 1675-1678.
 14. Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L. H. and Hotamisligil, G. S. 2004. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* **306**, 457-461.
 15. Papp, L. V., Lu, J., Holmgren, A. and Khanna, K. K. 2007. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal* **9**, 775-806.
 16. Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G. and Hoekstra, W. G. 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* **179**, 588-590.
 17. Schrauzer, G. N. 1987. Effects of selenium antagonists on cancer susceptibility: new aspects of chronic heavy metal toxicity. *J UOEH* **20**, S208-215.
 18. Sharma, N. K., Das, S. K., Mondal, A. K., Hackney, O. G., Chu, W. S., Kern, P. A., Rasouli, N., Spencer, H. J., Yao-Borengasser, A. and Elbein, S. C. 2008. Endoplasmic reticulum stress markers are associated with obesity in non-diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 4532-4541.
 19. van der Kallen, C. J., van Greevenbroek, M. M., Stehouwer, C. D. and Schalkwijk, C. G. 2009. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the development of diabetes: is there a role for adipose tissue and liver? *Apoptosis* **14**, 1424-1434.
 20. Ye, Y., Shibata, Y., Yun, C., Ron, D. and Rapoport, T. A. 2004. A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* **429**, 841-847.
 21. Zhang, Y. and Chen, X. 2011. Reducing selenoprotein P expression suppresses adipocyte differentiation as a result of increased preadipocyte inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **300**, E77-85.

초록 : 3T3-L1세포에서 selenate의 처리가 세포의 분화와 selenoprotein의 발현에 미치는 영향

박설희¹ · 문양수^{2*}

(¹경희대학교 의과대학 기초의과학과, ²경남과학기술대학교 동물생명과학과)

본 연구는 지방전구세포에서 selenate가 지방세포의 분화와 초기 분화조절 연관 selenoprotein의 유전자발현 양상을 조사하기 위하여 실시하였다. Selenate의 농도를 달리하여(0-100 μ M) 지방전구세포가 confluent한 시기, 지방세포분화 유도 초기(day0-day2), 분화유도 중기(day2-day4), 또는 분화전기간(day0-day6)으로 구분하여 처리한 다음 세포내 지방구형성과 소포체(ER)스트레스 및 selenoptotein 유전자들의 발현 양상을 분석하였다. Selenate에 의한 지방세포분화 억제효과는 지방세포가 post-confluent (cell cycle arrest), 분화유도 초기(mitotic clonal expansion), 또는 지속적인 처리가 주어진 상태에서 농도 의존적으로 나타났다($p < 0.05$). 그러나 selenate를 분화유도 중기(post-mitotic growth arrest)에 처리되었을 때는 세포분화억제 효과가 감소하였다. *Seps1*와 *Sepp1*의 selenoprotein 유전자들은 mitotic clonal expansion시기에 높게 발현하였다가 post-mitotic growth period에는 급격한 발현감소현상을 나타내었다($p < 0.05$). 본 연구 결과는 selenate에 의한 지방전구세포의 분화억제효과는 세포분화초기에 효과적인 기능이 있음을 보여 주었으며, selenoprotein의 분화유도초기와 중기의 변환지점에 이들 유전자들의 급격한 발현변화가 selenate에 의한 지방세포의 분화억제와 관련이 있는 것으로 보여진다.