

간세포에서 RBP4가 인슐린 신호전달경로에
미치는 분자생물학적 기전 규명

연세대학교 대학원
의 학 과
김 문 영

간세포에서 RBP4가 인슐린 신호전달경로에
미치는 분자생물학적 기전 규명

지도교수 예 병 일

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2009년 2월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

김 문 영

김 문 영의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2009년 2월 일

감 사 의 글

진리를 탐구하고 그에 가까이 감으로서 병자를 돕고자 하는 저의 긴 여정 중에 하나의 결실을 맺게 됨을 큰 영광으로 느끼며, 더 큰 진리의 바다로 향하는 항해에서 이 작은 시작을 하나의 뜻으로 삼고자 합니다.

이 결실이 맺어지기까지 시종일관 많은 관심과 가르침을 주신 예병일 교수님께 감사를 드립니다. 부족한 부분을 세심히 살피고 다듬어 주신 공인덕 교수님, 신영구 교수님, 김장영 교수님께도 깊이 감사를 드립니다. 그리고 항상 제 뒤에서 저를 묵묵히 믿고 기다려 주시고 후원해 주시는 백순구 교수님께도 무한한 감사를 드립니다. 또한 저의 학문적 발전에 항상 깊은 관심을 가져 주시고 따뜻한 격려를 해주신 권상욱 교수님과 김현수 교수님, 김재우 교수님께도 감사드립니다. 더불어 본 연구가 결실을 맺기까지 많은 수고를 아끼지 않아 주신 생화학교실 여러 선생님들과 소화기병센터의 여러분들께도 감사드립니다.

끝으로, 조그맣던 어린 유치원 아이가 어엿한 박사가 되기까지 한없는 애정을 보내주시고 든든한 버팀목이 되어주신 아버지와 어머니 그리고 동생 주현에게도 깊은 감사를 드립니다.

그 외에도 크고 작은 많은 일들을 저와 함께 한 모든 분들과 이 기쁨을 나누고 싶습니다.

2009년 1월

김 문 영

차 례

표 차례	i
그림 차례	ii
국문 요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 재료	6
2. 시료 분리	6
3. 일차 간세포 분리	6
4. 일차 간세포 배양	7
5. RBP4 처리	7
6. RNA 분리 및 cDNA 제조	8
7. cDNA microarray 분석	8
8. Real-time PCR	8
9. 신호전달기전 분석	9
III. 결과	13
1. cDNA microarray 분석	13
2. 신호전달경로 추적	13
3. 1차 Real-time PCR	18
4. 2차 Real-time PCR	24
IV. 고찰	27
V. 결론	31
참고문헌	32
영문 요약	36

표 차 례

Table 1. Primers for real-time PCR	11
Table 2. Primers for real-time PCR	12
Table 3. Genes with a minimum three fold increase in expression after RBP4 treatment	15
Table 4. Genes with a minimum 40% decrease in expression after RBP4 treatment	16
Table 5. The Results of real-time PCR	21
Table 6. The Results of real-time PCR	25

그림 차례

Figure 1. cDNA microarray analysis	14
Figure 2. Signal transduction pathway designed by Pathway Studio 5.1 software program	17
Figure 3. <i>Homo sapiens</i> insulin signaling pathway map	19
Figure 4. The results of RT-PCR	20
Figure 5. Relative mRNA amount of the genes related with insulin signaling pathway	22
Figure 6. <i>Homo sapiens</i> insulin signaling pathway map	23
Figure 7. Relative mRNA amount of the genes related with insulin signaling pathway	26

국 문 요 약

간세포에서 RBP4가 인슐린 신호전달경로에 미치는 분자생물학적 기전 규명

대사증후군은 생체내 대사이상과 관련된 여러 가지 증상이 동시에 나타나는 질병으로 현대화 과정에서 사람들의 생활형태가 변화함에 따라 그 유병률이 크게 증가하고 있다. 대사증후군은 성인질환 또는 생활습관병의 하나로 당뇨 및 심혈관 질환의 발병과 밀접한 관계가 있는 질병이다. 대사증후군이라는 질병을 정의하기 시작한 후 그 발병기전을 규명하기 위한 연구가 수많은 연구자들에 의해 꾸준히 진행되어 왔으나 현재까지는 수많은 인자가 대사증후군 발생과 관련이 있을 것이라는 사실만 알려져 있을 뿐 명확하게 대사증후군의 발생기전을 설명하지는 못하고 있다. 본 연구에서는 대사증후군 발생과 밀접한 관련을 지닐 것으로 보고되고 있는 RBP4가 대사증후군 발생에 어떤 기능을 하는지를 규명하고자 하였다.

생쥐에서 얻은 일차간세포에 RBP4를 처치한 후 mRNA를 분리하여 처치하지 않는 대조군과 함께 cDNA microarray를 실시하여 mRNA 발현량상에 어떤 차이가 있는지를 확인하였다. 이 실험에서 대사증후군과 연관지을 수 있는 특별한 후보물질을 찾지 못하여 인슐린 신호전달경로에 위치한 인자들에 초점을 맞추어 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용하여 어떤 인자들이 RBP4 처치의 영향을 많이 받는지를 확인하였다. 이 실험을 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. RBP4는 포도당신생성을 증가시키고, 해당작용을 감소시킴으로써 탄수화물 대사 과정에서 생체에 바람직하지 않은 결과를 가져 온다.
2. 포도당신생성이 증가하는 기전은 Akt의 발현감소에 의한다.
3. Akt와 PKC α 보다 상위에 위치한 PIP $_3$ 로 전달되는 신호전달기전은 RBP4에 의한 발현 양상의 변화가 일정하지 않게 나타난다.

이상의 결과에서 RBP4는 해당과정에 관여하는 효소들의 발현을 감소시키고, 포도당신생성에 관여하는 효소들의 발현이 증가시킴으로써 대사증후군을 유발하는 기능을 함이 판명되었다. 그러나 인슐린 신호전달경로에 관여하는 단백질 중에는 Akt와 같이 발현량 뿐 아니라 인산화 여부가 기능의 활성화와 밀접한 연관을 지닌 것들이 있으므로 인산화 여부가 신호전달에 중요한 단백질들을 대상으로 발현량의 변화 외에 인산화가 얼마나 일어나고 있는지를 확인해 볼 필요가 있다. 또한 real-time PCR을 이용한 mRNA의 발현량을 측정하는 것은 신호전달기능을 담당하는 인자들의 발현을 간접적으로 확인하는 방법이므로 mRNA로부터 정보를 전해 받은 단백질이 얼마나 만들어지는지를 확인하는 것이 더 필요하다.

요약하면 본 연구를 통해 RBP4가 인슐린 신호전달경로에 관여하는 인자들의 발현량을 확인한 결과 해당작용에 관여하는 인자들의 발현을 감소시키고, 포도당신생성 과정에 관여하는 인자들의 발현을 증가시켰으며, 포도당신생성과 관련된 인자들의 발현 증가는 RBP4의 직접 작용 또는 Akt의 발현감소에 의한 것임을 확인하였다. 그러나 더 명확한 기전을 규명하기 위해서는 인슐린 신호전달경로에 관련된 인자들의 인산화 여부와 단백질 발현량 확인이 더 필요하고, 이와 같은 연구가 더 진행되면 대사증후군 해결을 위한 실마리를 찾을 수 있을 것으로 기대된다.

핵심되는 말 : 대사증후군, 생쥐 간세포, 신호전달경로, RBP4, 해당작용, 포도당신생성

간세포에서 RBP4가 인슐린 신호전달경로에 미치는 분자생물학적 기전 규명

<지도교수 예병일>

연세대학교 대학원 의학과

김 문 영

I. 서 론

대사증후군은 syndrome X라고 명명되면서 널리 알려지게 된¹⁾ 질병이지만 1920년대에 이미 이 질병에 대한 개념이 소개된 바 있다²⁾. Vague 등³⁾은 비만의 정도가 제2형 당뇨병과 심혈관계 질환과 관련이 있음을 처음 지적하기도 했고, 현재는 비만의 정도에 따라 발생 빈도가 증가하는 일련의 대사 이상 질환을 가리킨다. 다른 용어로 인슐린 저항성 증후군⁴⁾ 또는 the deadly quartet⁵⁾ 등으로도 불려 왔으며, 당뇨병과 연관된 여러 가지 증상들이 복합적으로 나타나는 특징이 있다. 대사증후군에 흔히 동반되는 질병으로는 인슐린저항성과 내당저항성, 고혈압, 이상지혈증(dyslipidemia), 미세알부민뇨증(microalbuminuria) 등이 있다.

대사증후군에 대한 정의와 진단기준은 각 나라별로 차이가 있다. 이것은 대사증후군의 비교적 최근에 정의되기 시작한 질병이며, 각 나라의 생활습관에 따라 체형과 당뇨를 비롯한 질병발생 가능성이 달라지므로 연구자에 따라 다른 진단기준을 사용하고 있기 때문이다. 대사증후군 진단을 위해 흔히 이용되는 진단기준에는 세계보건기구(World Health Organization, WHO, 1998)⁶⁾와 NCEP ATP III(National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III, 2001)⁷⁾, EGIR(European Group for the study

of Insulin Resistance, 1999)⁸⁾, IDF(International Diabetes Federation, 2006)⁹⁾ 등에서 마련한 것이 있다. 이들 중에서 가장 먼저 제안된 WHO의 진단기준은 실제로 임상에서 이용하기에 단점이 있으므로 현재는 NCEP ATP III의 기준이 가장 흔히 이용되고 있다. 그러나 NCEP ATP III의 진단기준은 내당저항성과 인슐린 저항성을 잘 반영하지 못한다는 단점이 있다.

대사증후군은 비만, 당뇨, 고혈압과 같은 현대의 생활습관병 발생과 밀접한 관련을 지니고 있지만 그 병인에 대한 연구는 아직 초기단계에 불과한 상태이다. 대사증후군이 정의되기 시작한 후 그 발병기전을 규명하기 위한 연구가 수많은 연구자들에 의해 꾸준히 진행되어 왔으나 발병기전에 수많은 인자가 관여하고 있다는 사실이 알려졌을 뿐 어떤 인자가 병인에 중요한 역할을 하는지에 대해서는 아직 정확한 기전이 알려져 있지 않다. 현재 까지 대사증후군의 병인에 관여하는 인자로는 인슐린¹⁰⁾, 염증성 cytokine¹¹⁾, ARNT¹²⁾, 인슐린 저항성¹³⁾, vistafin^{14, 15)}, apelin¹⁶⁾, SIRT1^{16, 17)}, miRNA¹⁸⁾, adiponectin과 그 수용체¹⁹⁾, IKK β ^{20, 21)}, NF- κ B²⁰⁾, Foxa2²²⁾, JNK²³⁾등 많은 인자들이 있으나 전혀 검증되지 않은 상태이다. 그런 가운데 네이처지²⁴⁾에서 어떤 인자가 가장 대사증후군 병인 연구에 가장 영향력이 큰 논문인가를 연구자들이 선정하게 한 결과 Yang 등(2005)²⁵⁾의 논문이 37%의 지지율로 1위에 오른 바 있다.

Yang 등(2005)²⁵⁾은 혈액에 존재하는 RBP4가 비만과 제2형 당뇨에서 인슐린 저항성과 관련이 있다는 연구결과를 발표했으며, 다른 연구자들에 의해 혈액내 RBP4의 농도가 내당능장애(impaired glucose tolerance)나 제2형 당뇨병에서 증가되어 있다는 보고가 있었다²⁶⁾. 또한 RBP4가 비만^{27, 28)}이나 당뇨²⁸⁾와 연관성을 지닌다는 연구결과도 제시되어 있는 등 지금까지의 연구결과를 종합해 볼 때 RBP4가 대사증후군 발생에 일정한 역할을 할 것이라는 점은 쉽게 유추할 수가 있다.

그러나 RBP4가 대사증후군과 관련하여 병인을 설명하기 위한 가장 유

력한 후보물질로 거론되고 있고, 많은 연구가 이루어진 것은 분명하지만 지금까지 이루어진 연구결과는 오로지 대사증후군과의 상관성만을 보여주고 있을 뿐 어떤 기전에 의하여 RBP4가 대사증후군 발생에 기여하는지를 알아내지는 못하고 있는 상태이다. 현대 생활습관병 중에서 가장 유병률이 높고 다른 생활습관병과의 관련성이 가장 큰 것으로 생각되는 대사증후군을 해결하기 위해서는 그 병인을 규명하는 것이 필수적이고, 이를 위해서는 신호전달기전을 이해하는 것이 무엇보다도 중요하다.

그러므로 본 연구에서는 RBP4가 대사증후군 발생에 있어서 어떤 경로를 거쳐 대사증후군을 일으키는지에 신호전달기전에 관여하는 인자들을 중심으로 그 분자생물학적 기전을 규명하고자 한다. 이를 위해 RBP4를 처리한 세포주를 이용하여 cDNA microarray 방법을 통해 RBP4와 관련이 있는 유전자를 검색하고, 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time PCR)을 이용하여 각 유전자들의 발현이 RBP4에 의해 어떤 영향을 받는지를 규명함으로써 신호전달 단계에서 RBP4의 역할을 알아내고, 이를 통해 RBP4의 분자생물학적 기능을 알아보려고 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

25-30g 정도의 ICR mouse를 Orient사(Seongnam, Korea)로부터 구입한 후 실험동물실에서 키운 다음 연구에 이용하였다.

2. 시료 분리

실험용 생쥐에 펜토바비탈(pentobarbital) 30-40mg/kg을 복강에 주사하여 마취시켰다. 충분히 마취가 된 생쥐를 해부판에 고정시킨 뒤, 미리 멸균해 둔 해부세트로 복강을 열고 24게이지 카테터로 조심스럽게 문정맥을 절렀다. 카테터에 수액세트를 연결시켜 0.2 μ m 지름의 여과기에 여과한 관류용액(0.142M NaCl, 0.067M KCl, 0.01M HEPES, 0.5M EGTA, pH 7.4)을 흘려줌과 동시에 하대정맥을 가위로 잘랐다. 관류용액은 20분에 걸쳐 약 50-60ml 정도를 흘려 주면서 간이 노란색으로 변해 가는 것을 관찰하였다. 이어서 0.2 μ m 지름의 여과기에 여과한 아교질분해효소(66.7mM NaCl, 6.7mM KCl, 100mM HEPES, pH 7.6, 4.8mM CaCl₂, pH 7.6, Collagenase(Roche, Penzberg, Germany) 0.5mg/ml)를 같은 속도로 흘려주었다. 이 과정에서 간이 점점 팽창되어 부풀어 오르다가 차차 흐물흐물해지는 것이 관찰되면 관류를 중단하였다. 관류과정이 모두 끝나면 간이 오염이 되지 않도록 조심스럽게 분리하여 인산완충식염수에 담아 옮겼다.

3. 일차 간세포 분리

2.에서 분리한 실험동물의 간을 무균 실험대에서 페트리접시(petri dish)에 옮긴 후 멸균해 둔 해부용 가위와 포셉(forceps)으로 결의 막만 살짝 벗긴다. 다음으로 인산완충식염수내에서 간을 살살 흔들어주기를 반복하면서 간조직이 하나하나의 세포로 분리되기를 기다렸다. 각각으로 떨어진 세포가 눈으로 확인되면, 멸균한 메쉬(mesh)로 거른 후 6,000g의 속도로 10분

동안 원심분리하였다. 원심분리가 끝나면 세포를 제외한 나머지 용액을 제거하고 인산완충식염수로 씻어준 후 6,000g의 속도로 다시 한 번 10분동안 원심분리하였다. 위와 같은 방법을 두 차례 반복하면서 세포를 씻어주었다.

4. 일차 간세포 배양

3.에서 분리한 일차간세포는 100U/ml Penicillin, 100mg/ml streptomycin, 10% Fetal Bovine Serum(FBS; Gibco, Gaithersburg, MD, USA), 10nM insulin(Sigma, St. Louis, MO, USA), 0.1mM Dexametahzone(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 포함하는 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM) 배지를 이용하여 배양하였다. 일차배양을 용이하게 하기 위해 1.5g/ml Matrigel(BD biosciences, San Jose, CA, USA)로 미리 코팅한 세포배양용 접시(지름 35mm)에 표면의 약 80%를 덮을 만큼 세포를 깔아준 후 세포가 잘 자라기 시작하는지를 현미경으로 확인하였다. 관찰결과 세포가 둥근 모양으로 배양용 접시 바닥에 붙기 시작하는 것을 확인한 후 5% CO₂ humidified incubator에 보관하고 37℃에서 24시간 배양하였다.

5. RBP(retinol-binding protein) 4 처리

본 실험에 이용한 RBP4는 유전자 재조합으로 얻은 생쥐의 것 (recombinant mouse retinol-binding protein 4, (R&D System, Minneapolis, MN, USA))을 이용하였다.

4.에서 준비한 일차 간세포를 실험군과 대조군으로 나누어 실험군은 100U/ml Penicillin, 100mg/ml streptomycin, 0.2% Fetal Bovine Serum(FBS; Gibco, Gaithersburg, MD, USA), 10nM insulin(Sigma, St. Louis, MO, USA), 0.1mM Dexametahzone(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 포함하는 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM) 배지에 100 μ g/ml recombinant mouse retinol-binding protein 4를 처리하고, 대조군은 100U/ml Penicillin, 100mg/ml streptomycin, 0.2% Fetal Bovine

Serum(FBS; Gibco, Gaithersburg, MD, USA), 10nM insulin(Sigma, St. Louis, MO, USA), 0.1mM Dexametahzone(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 포함하는 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM)에서 각각 24시간 배양하였다.

6. RNA 분리 및 cDNA 제조

24시간 배양한 실험군과 대조군 일차 간세포에 Trizol(Promega, Madison, WI, USA)을 처리하여 세포를 배양용기로부터 떼어 낸다. 이를 미세원침관에 담은 후 간단히 원심분리하여 세포를 가라앉히고, 상층액을 제거하였다.

RNeasy Mini Kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 세포로부터 RNA를 분리하였으며, 이 과정에서 세포를 균질화하기 위해 QIAshredder(Qiagen, Hilden, Germany)도 함께 사용하였다. Microarray 실험을 위해 필요한 RNA는 5 μ g, 순도(260/280ratio 생략)는 1.8-2.1 정도이므로, 그 기준을 충족할 수 있도록 충분한 양의 세포로부터 RNA를 분리한 다음 순도를 측정하였다. 분리한 RNA는 cDNA microarray에 필요한 양만큼 보관한 후 남은 RNA로부터 다음 실험에 이용하기 위한 cDNA를 제조하였다. cDNA는 Omniscript Reverse Transcription Kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 제조하였다.

7. cDNA microarray 분석

6.에서 분리한 RNA는 cDNA microarray를 전문으로 하는 회사(Digital genomics, Seoul, Korea)에 분석을 의뢰하였다. 이 회사에서는 Affymetrix 사(Santa Clara, CA, USA)의 Agilent Whole Mouse Genome 44K 4Plex Chip을 이용하여 cDNA microarray를 실시하였다.

8. Real-time PCR

6.에서 얻은 cDNA를 이용하여 real-time PCR을 시행하였다. Real-time PCR 반응은 QuantiTect SYBR Green PCR kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 전체 12.5ul의 부피에 대해 2X master mix 6.25ul, Forward Primer 0.5ul, Reverse primer 0.5ul, cDNA 1ul, 증류수 4.25ul 의 조성으로 반응시켰다. 이 반응을 수행하기 위하여 Rotor-Gene 3000(Corbett Research, Mortlake, Australia) 장비를 이용하였다. Real-time PCR 반응은 95℃에서 15분간의 활성화 과정을 거친 후 40회에 걸쳐서 94℃ 20초, annealing temperature 30초, 72℃ 30초의 반응을 반복하도록 했다. 본 연구에 사용한 시발체(primer)를 Table 1, 2에 제시하였다. Table 1에 제시한 시발체는 인슐린 신호전달경로에서 해당과정과 포도당신생성 과정에 직접 관여하는 유전자에 대한 것으로 본 연구에서 mRNA 정량을 초기에 시도한 것들이며, Table 2에 제시한 시발체는 인슐린 신호전달경로에서 Table 1에 제시한 인자보다 더 상위단계에서 관여하는 물질에 대한 것이다.

반응이 끝난 후 장비에 기록된 결과를 바탕으로 RBP4를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 RBP4를 처리한 실험군의 발현량이 어떻게 변화했는지를 Mann-Whitney U test 방법으로 분석하였다.

9. 신호전달기전 분석

cDNA microarray를 통해 발현이 증가 또는 감소된 유전자를 골라낸 다음 Ariadne Genomics(Rockville, MD, USA)사의 소프트웨어 프로그램을 이용하여 이들 유전자들을 통해 형성될 가능성이 있는 신호전달기전을 추적했다.

또한 이미 대사증후군과 밀접한 관련이 있을 것으로 보고되고 있는 인슐린 신호전달경로(insuling signaling pathway), 지방산 대사경로(fatty acid metabolism pathway), 포도당 대사경로(glucose metabolism pathway)에 대하여 cDNA microarray 결과가 어떻게 적용될 수 있는지를 평가하였다.

cDNA microarray 결과를 토대로 예상가능한 RBP4의 작용기전을 유추

하고, mRNA 수준에서 RBP4와 상호작용할 것으로 예상되는 물질을 추적하기 위하여 real-time PCR을 실시함으로써 RBP4의 작용기전을 확인하고자 하였다.

Table 1. Primers for real-time PCR

Gene	Direction	Primer sequences (5'→3')	Product size (bp)
Irs1	sense	cccttgctttgattgagtc	126
	anti-sense	accagcaacttccagttcta	
Akt	sense	gaccatgaacgagtttgagt	123
	anti-sense	atgacctccttcttgaggat	
Pfk	sense	gtagcaagatgggtatggag	131
	anti-sense	ctttgtcacttgccacacact	
Pyk	sense	tcaggagacagcaaaagagt	132
	anti-sense	aagtgagatgcacaagaagt	
Gk	sense	gaggagaatcttctgtcca	127
	anti-sense	tcaggatgtaaggatctgc	
G6pc	sense	ctcttgctatctttcgagga	131
	anti-sense	aaagtgagcagcaaggtaga	
Fbp2	sense	gagagtattcaccagcgagt	111
	anti-sense	atgggttcaggctcactac	
Pepck	sense	ttcaaggtcactcaggaatc	120
	anti-sense	acacacatgctcacacagag	

Irs1: insulin receptor substance 1; Akt: Thymoma viral proto-oncogene 1; Pfk: Phosphofructokinase; Pyk: Pyruvate kinase; Gk: Glucokinase; G6pc: Glucose-6-Phosphatase; Fbp2: Fructose bisphosphatase 2; Pepck: Phosphoenolpyruvate carboxylase 1

Table 2. Primers for real-time PCR

Gene	Direction	Primer sequences	Product size (bp)
Pi3k	sense	agaaatcttgacaggacc	111
	anti-sense	agttttggcagtgactgagg	
Ikk β	sense	ggagtcagaagaaccccat	104
	anti-sense	gaagaacagcaccaggaga	
G6pc2	sense	gccagcttgagtgtacct	101
	anti-sense	gaccacagcaggtcaatacc	
Jnk	sense	gtcctcccctgctgatatt	105
	anti-sense	gcttgagatgctatcctga	
Ptp1b	sense	cattccacctcacacctca	99
	anti-sense	ctccaggacagcatgaactt	
Pyk	sense	gagtcttccccttgcctac	128
	anti-sense	aatcaccagatcaccaactc	
Ship	sense	gctattgatgaggctgagga	122
	anti-sense	tctgttgcaagaggaaggtc	
Skip	sense	atctctacgaaatccacccc	100
	anti-sense	tgatgctgacgtagtagcca	

Pi3k: Phosphatidylinositol 3-kinase; Ikk β : Inhibitor of kappaB kinase; G6pc2: Glucose-6-phosphatase 2; Jnk: Mitogen activated protein kinase; Ptp1b: Protein tyrosine phosphatase type 1b; Pyk: Pyruvate kinase; Ship: Inositol polyphosphate-5-phosphatase; Skip: pyruvate phosphatase

III. 결 과

1. cDNA microarray 분석

Recombinant mouse RBP4를 처리한 mouse 일차 간세포와 처리하지 않은 일차 간세포로부터 분리한 RNA를 이용하여 cDNA microarray를 실시한 결과의 한 예를 Figure 1에 제시하였다. 그림에서 대조군과 비교하여 실험군에서 발현이 증가된 경우를 빨간색, 발현이 감소된 경우를 초록색으로 표시하였으며, 발현량에 변화가 없는 경우는 검정색으로 표시하였다. 빨간색과 초록색의 선명도가 진해질수록 실험군과 대조군의 발현량에 차이가 많은 것을 의미한다.

3회의 cDNA microarray 실험에서 RBP4를 처리한 경우에 발현량이 3배 이상 증가하는 것으로 나타난 유전자는 모두 13개였고(Table 3), 발현량이 40% 이상 감소하는 것으로 나타난 유전자는 모두 11개였다(Table 4). 이 중에서 대사증후군과 관련하여 특별히 관심을 가질 만한 유전자는 발견되지 않았고, 인슐린 신호전달경로 및 포도당 신호전달경로에 관련된 유전자도 발견되지 않았으며, 지방산 신호전달경로에 관련된 유전자 1개 (Acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 10)의 발현이 40% 이상 감소된 것으로 나타났다.

2. 신호전달경로 추적

cDNA microarray 결과에서 2배 이상 발현이 증가된 경우와 50% 이상 발현이 감소된 유전자를 대상으로 Ariadne Genomics (Rockville, MD, USA)에서 개발한 Pathway Studio 5.1 프로그램을 이용하여 예측가능한 신호전달경로를 그림으로 나타냈다 (Figure 2). 그림에서 빨간색으로 표시한 것이 2배 이상 발현이 증가된 경우이고, 분홍색으로 표시한 것이 50% 이상 발현이 감소된 경우를 나타낸다.

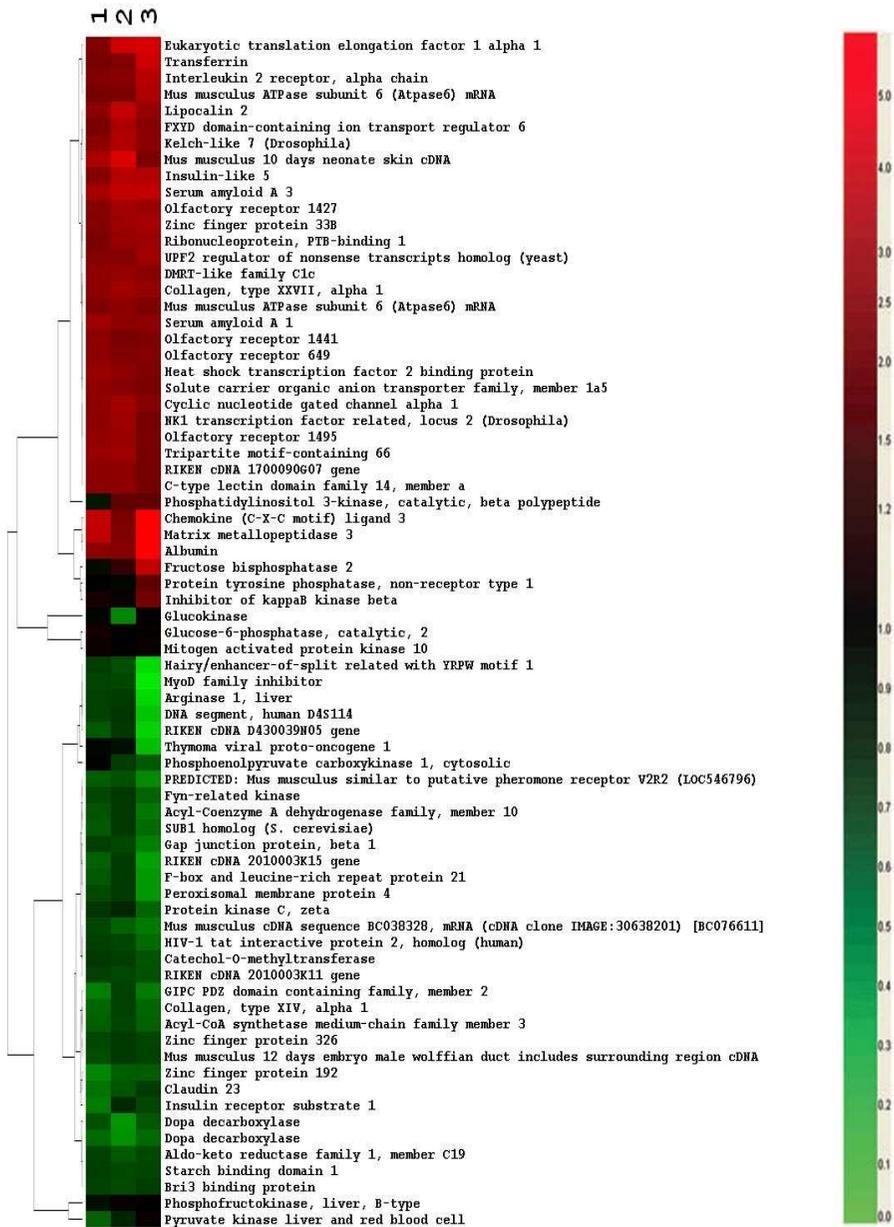


Figure 1. cDNA microarray analysis. Gene expression patterns of three RBP4 treated samples. Red and green colors indicate increased and decreased gene expression, respectively.

Table 3. Genes with a minimum three fold increase in expression after RBP4 treatment

Symbols (accession number*)	Titles	Main function of end-product
<i>Cxcl3</i> (NM_203320)	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	Migration and adhesion of monocytes and mediates
<i>Mmp3</i> (NM_010309)	Matrix metalloproteinase 3	Proteolysis and peptidolysis
<i>Alb</i> (NM_009654)	Albumin	Lipid binding
<i>Eef1a1</i> (NM_010106)	Eukaryotic translation elongation factor 1 α_1	GTP binding, protein biosynthesis
<i>Saa3</i> (NM_011315)	Serum amyloid A 3	Lipid transporter activity
<i>Insl5</i> (NM_011831)	Insulin-like 5	Contains a classical signature of the insulin superfamily
<i>Lcn2</i> (NM_008491)	Lipocalin 2	Transporter activity
<i>Trf</i> (NM_133977)	Transferrin	Ferric iron binding
<i>Klhl7</i> (AK082520)	Kelch-like 7 (Drosophila)	Protein binding
<i>Zfp33b</i> (AK009327)	Zinc finger protein 33B	DNA-binding protein domain
<i>Il2ra</i> (AF054581)	Interleukin 2 receptor, alpha chain	Negative regulation of inflammatory response
<i>Olf1427</i> (NM_146679)	Olfactory receptor 1427	Perception of smell
<i>Col27a1</i> (AK076297)	Collagen, type XXVII, alpha 1	Structural molecule activity

* indicates the number used for NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) information.

Table 4. Genes with a minimum 40% decrease in expression after RBP4 treatment

Symbols (accession number*)	Titles	Main function of end-product
<i>Comt</i> (NM_007744)	Catechol-O-methyltransferase	Catecholamine metabolism
<i>Frk</i> (NM_010237)	Fyn-related kinase	Intracellular signaling cascade
<i>Sub1</i> (NM_011294)	SUB1 homolog (S. cerevisiae)	Transcription coactivator activity
<i>Acad10</i> (AK033963)	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 10	Proteolysis and peptidolysis
<i>Cldn23</i> (NM_027998)	Claudin 23	Structural molecule activity
<i>Gjb1</i> (NM_008124)	Gap junction protein, beta 1	Cell-cell signaling
<i>Acsm3</i> (NM_212441)	Acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3	Fatty acid metabolism
<i>Pxmp4</i> (NM_021534)	Peroxisomal membrane protein 4	Biological_process unknown
<i>D0H4S114</i> (NM_053078)	DNA segment, human D4S114	Regulation of transforming growth factor beta receptor Signaling pathway
<i>Coll4a1</i> (NM_181277)	Collagen, type XIV, alpha 1	Cell adhesion
<i>Arg1</i> (NM_007482)	Arginase 1, liver	Arginine catabolism
<i>Fbxl21</i> (NM_178674)	F-box and leucine-rich repeat protein 21	Ubiquitin cycle

* indicates the number used for NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) information.

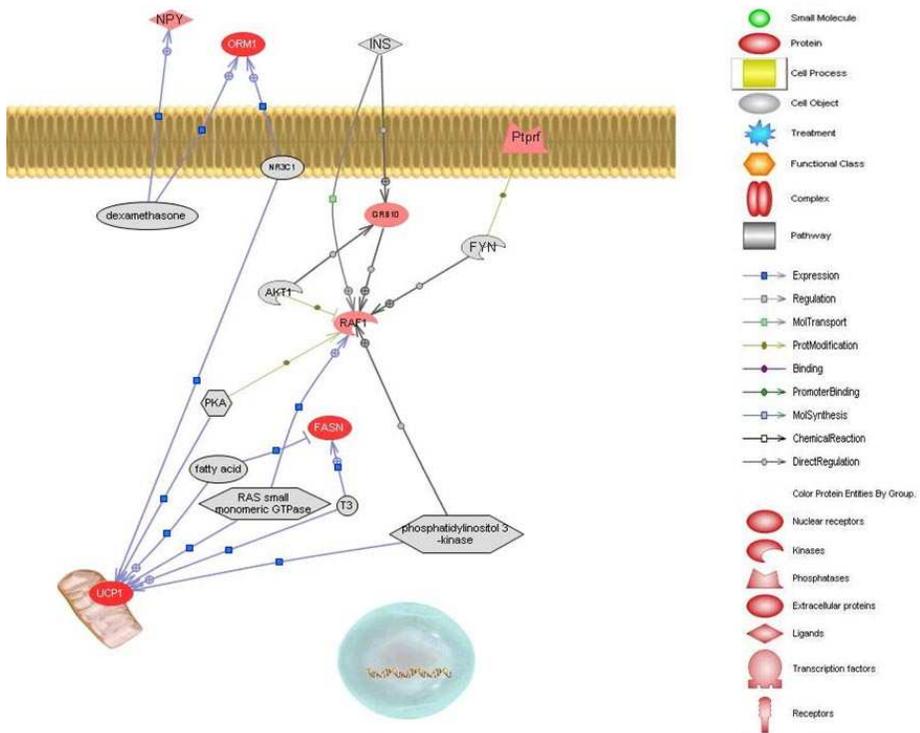


Figure 2. Signal transduction pathway designed by Pathway Studio 5.1 software program

cDNA microarray 실험 결과를 이용하여 추정가능한 신호전달기전을 그려 보았으나 RBP4와 대사증후군을 연관지을 수 있는 적합한 신호전달모델을 찾을 수 없었다. 그래서 인슐린 신호전달경로(Figure 3)에 초점을 맞추어 RBP4에 의한 신호전달경로 관련인자들의 발현량상을 분석하였다.

3. 1차 Real-time PCR

Figure 3에서 빨간색 네모로 표시한 부분에 들어 있는 관련인자를 대상으로 real-time PCR을 실시하기 위해 합성한 시발체는 Table 1에 표시하였다.

시발체가 잘 기능을 하는지 확인하기 위해 역전사 증합효소 연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)을 실시한 결과를 Figure 4에 제시하였으며, real-time PCR 결과를 Table 5에, 이 표의 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 값을 Figure 5에 표시하였다. 그림에 나타난 바와 같이 Irs1, Akt, Pyk, G6pc는 대조군과 비교할 때 RBP4를 처리한 경우 발현이 감소하였으며, Fbp2, Pepck의 발현은 대조군보다 RBP4를 처리한 경우에 증가하였다. Pfk와 Gk는 RBP4 처리시 발현이 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

이상의 결과를 종합해 보면 해당과정(glycolysis)에 관여하는 세 가지 효소, 즉 Pfk, Pyk, Gk는 RBP4에 의해 모두 발현이 감소되고, 포도당신생성(gluconeogenesis)에 관여하는 세 가지 효소, 즉 G6pc, Fbp2, Pepck중 G6pc는 RBP4에 의해 발현이 감소되지만 Fbp2와 Pepck는 RBP4에 의해 발현이 증가되며, 결과적으로 RBP4는 해당과정은 억제하나 포도당신생성 과정을 유도함으로써 생체에 해로운 방향으로 기능을 하게 되어 대사증후군 발생을 유도하는 방향으로 기능을 하는 것으로 나타났다.

이상에서 얻은 결과를 Figure 6에 표시하였다. 파란색은 RBP4 처리에 의해 발현이 감소한 경우, 빨간색은 RBP4 처리에 의해 발현이 증가한 경우를 가리킨다. 또 굵은 화살표로 표시한 경우는 발현정도의 차이가 큰 경



Figure 4. The results of RT-PCR. 100 bp ladder was used as marker. IRS1: insulin receptor substance 1; AKT: Thymoma viral proto-oncogene 1; PFK: Phosphofructokinase; PYK: Pyruvate kinase; GK: Glucokinase; G6PC: Glucose-6-Phosphatase; FBP2: Fructose biphosphatase 2; PEPCK: Phosphoenolpyruvate carboxylase 1

Table 5. The Results of real-time PCR

Symbol	Gene Full name	ΔCt^* (compared to GAPDH Ct)		$\Delta\Delta\text{Ct}^\dagger$	$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$
		Control	RBP4		
Irs1	Insulin Receptor substrate 1	12.01	15.06	3.05	$0.13\pm 0.04^*$
Akt	Thymoma viral proto-oncogene 1	8.93	9.98	1.05	$0.53\pm 0.15^*$
Pfk	Phosphofruktokinase	9.25	9.62	0.37	0.85 ± 0.26
Pyk	Pyruvate kinase, muscle	7.16	10.15	2.99	$0.13\pm 0.02^*$
Gk	Glucokinase	20.60	20.68	0.08	0.90 ± 0.39
G6pc	Glucose-6-Phosphatase	13.64	14.78	1.14	$0.47\pm 0.08^*$
Fbp2	Fructose bisphosphatase2	14.31	13.71	-0.60	$1.57\pm 0.27^*$
Pepck	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1	14.14	13.78	-0.36	$1.32\pm 0.21^*$

The numbers of ΔCt indicates the cycle from which the quantities of PCR products are over the manually set threshold.

$\Delta\Delta\text{Ct}$ s are the differences between the ΔCt values of control and RBP4.

$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ indicates the expressed levels of the mRNAs when the control value is 1.

*: statistically significant ($p < 0.05$).

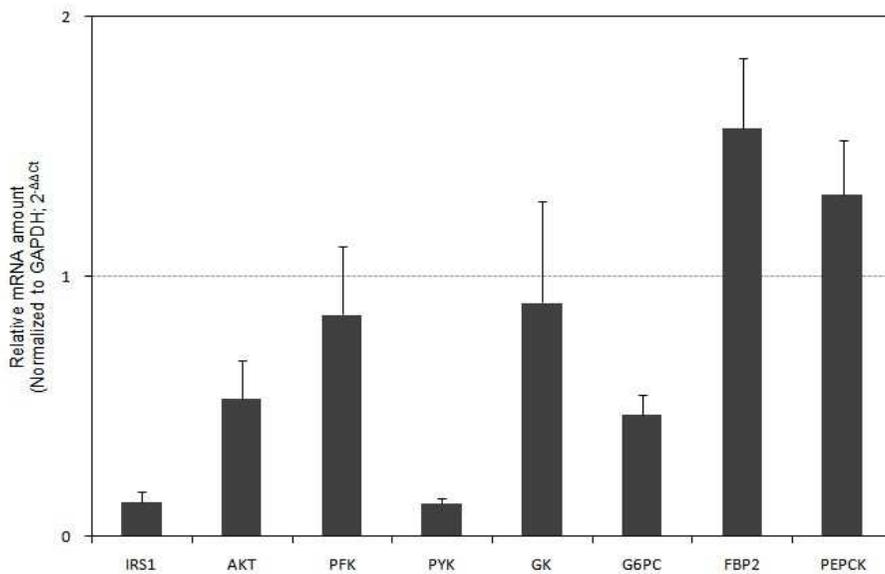


Figure 5. Relative mRNA amount of the genes related with insulin signaling pathway. IRS1: insulin receptor substance 1; AKT: Thymoma viral proto-oncogene 1; PFK: Phosphofructokinase; PYK: Pyruvate kinase; GK: Glucokinase; G6PC: Glucose-6-Phosphatase; FBP2: Fructose bisphosphatase 2; PEPCCK: Phosphoenolpyruvate carboxylase 1

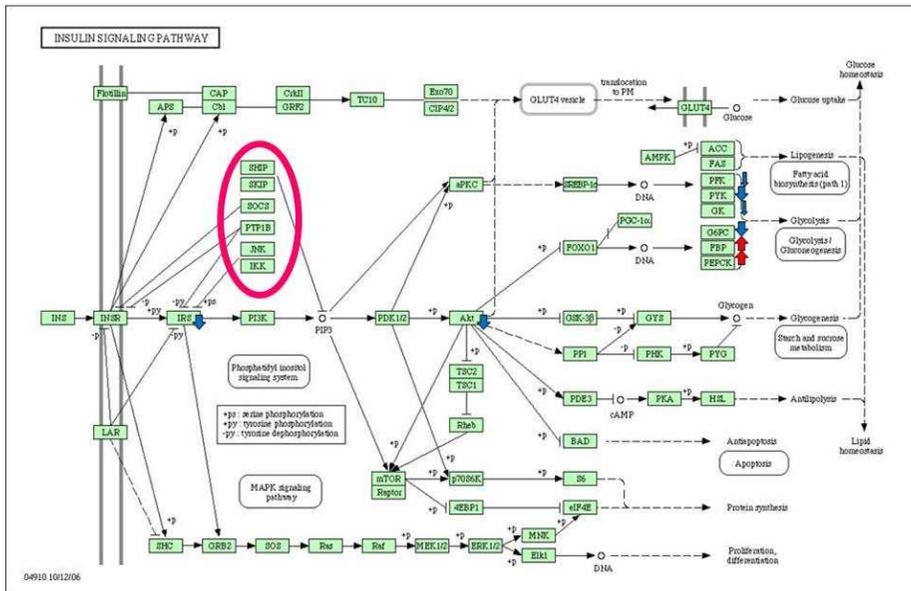


Figure 6. *Mus musculus* insulin signaling pathway map

(<http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/hsa/hsa04910.html>).

Thick arrows indicates decreased mRNAs expression compared with those of controls and thin arrows also does decreased mRNA expression but it is statistically insignificant.

우를 가리키고 가는 화살표로 표시한 것은 발현정도의 차이가 미약한 경우를 가리킨다. 빨간색 타원으로 표시한 것은 위에서 얻은 결과를 바탕으로 RBP4가 어느 위치에서 기능을 하는지를 확인하기 위해 다음 실험에서 발현량을 확인하기 위한 표적으로 삼은 단백질을 표시한 것이다.

4. 2차 Real-time PCR

Figure 6에서 빨간색 타원으로 표시한 부분에 들어 있는 관련인자를 대상으로 real-time PCR을 실시하기 위해 합성한 시발체(primer-생략)는 Table 2에 표시하였다. 이를 이용하여 real-time PCR을 실시한 결과를 Table 6에 표시하였으며, 이 표의 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 값을 Figure 7에 표시하였다. 그림에 나타난 바와 같이 Pi3k는 대조군과 비교할 때 RBP4를 처리한 경우 발현이 증가하였으며, G6pc2, Jnk, Ptp1b, Pyk, Skip의 발현은 대조군보다 RBP4를 처리한 경우에 감소하였다. Ikk β 와 Ship는 RBP4 처리시 발현이 미약하게 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

Table 6. The Results of real-time PCR

Symbol	Gene Full name	ΔCt (compared to GAPDH Ct)		$\Delta\Delta\text{Ct}$	$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$
		Contro 1	RBP4		
Pi3k	Phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide	8.82	7.78	-1.04	2.37±1.61*
Ikk	Inhibitor of kappaB kinase beta	10.02	9.84	-0.18	1.27±0.64
G6pc2	Glucose-6-phosphatase, catalytic, 2	12.96	13.87	0.55	0.56±0.20*
Jnk	Mitogen activated protein kinase 10	13.91	15.26	1.35	0.39±0.10*
Ptp1b	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1	4.83	5.28	0.45	0.76±0.25*
Pyk	Pyruvate kinase liver and red blood cell	1.68	2.70	1.03	0.50±0.06*
Ship	Inositol polyphosphate-5-phosphatase D	16.74	16.27	-0.48	1.53±0.79
Skip	Putative phosphatase	12.28	11.81	-0.48	1.39±0.11*

The numbers of ΔCt indicates the cycle from which the quantities of PCR products are over the manually set threshold.

$\Delta\Delta\text{Ct}$ s are the differences between the ΔCt values of control and RBP4.

$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ indicates the expressed levels of the mRNAs when the control value is 1.

*: statistically significant ($p < 0.05$).

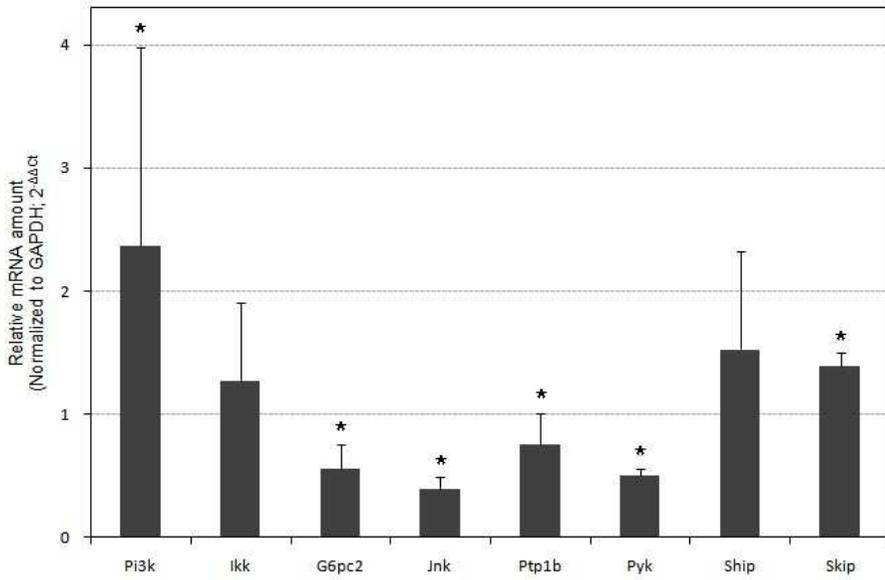


Figure 7. Relative mRNA amount of the genes related with insulin signaling pathway. Pi3k: Phosphatidylinositol 3-kinase; Ikk β : Inhibitor of kappaB kinase; G6pc2: Glucose-6-phosphatase 2; Jnk: Mitogen activated protein kinase; Ptp1b: Protein tyrosine phosphatase type 1b; Pyk: Pyruvate kinase; Ship: Inositol polyphosphate-5-phosphatase; Skip: pyruvate phosphatase; *: statistically significant ($p < 0.05$).

IV. 고 찰

대사증후군은 실험, 임상, 역학 연구를 통해 1988년에 처음 정의되었다¹⁾. 처음 정의할 때는 고인슐린혈증에 동반되는 여러 가지 심혈관 질환 유발인자를 이용했으나 그 후로 여러 연구자들이 이 정의에 대하여 수정 보완을 해 왔다^{6, 7, 29)}. 현재의 정의에 따르면 대사증후군은 여러 증상들을 종합하여 앞으로 더 큰 질병(생활습관병)으로 발전할 수 있는 가능성을 지닌 임상증상을 바탕으로 정의된 질병이다. 그러나 대사증후군을 하나의 질병으로 취급해야 하는지도 확실치 않고, 병인에 대한 기전도 확실히 밝혀져 있지 않으며, 관련 유전자에 대한 연구가 수많은 연구자에 의하여 진행되고 있으나 정확한 유전적 요인도 규명되지 않았고, 환경적 요인에 대해서도 명확히 규명되지 않았으므로 아직도 많은 연구가 필요한 실정이다.

대사증후군 발생에 관여하는 인자들에 대해서는 아주 다양한 연구결과들이 제시되어 왔다. 본 연구에서는 지금까지 대사증후군과 연관성을 지닌다고 제시된 수십가지 후보인자들중 관련 연구자들이 가장 큰 연관성을 지닐 것이라고 판단²²⁾하고 있음에도 불구하고 어떤 경로에 의해 대사증후군의 병인으로 기능을 할 것인가에 대해서는 연구가 이루어진 바가 없는 RBP4를 표적으로 하여 그 작용기전을 규명하기 위한 연구를 진행하였다.

본 연구에서 생쥐를 실험동물로 이용하여 일차 간세포를 분리한 다음 RBP4를 처리한 세포와 처리하지 않은 세포로부터 RNA를 분리하여 cDNA microarray를 실시한 결과 3차례의 반복 실험에서 mRNA 발현량상이 일관된 형태로 증가 또는 감소하는 유전자중에서 특별히 RBP4의 신호 전달기전의 표적으로 삼을 만한 것들은 찾지 못했다. 3회의 반복 실험에서 40% 이상 발현이 감소된 유전자중 *Acad10* (Acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 10)의 경우 지방산 대사에 관여하므로 RBP4의 표적으로 의심할 수도 있으나 지방산 대사 경로가 워낙 복잡하고, cDNA microarray에서 얻은 결과를 적용해 본 결과 신호전달기전에 관여

하는 각각의 단백질에 대한 효과가 일정하게 나타나지 않았다.

Figure 3은 인슐린 신호전달경로를 표시한 것이다. 빨간색 네모로 표시한 부분 중 해당과정과 포도당신생성 과정에 관여하는 단백질을 만들어낼 수 있는 정보를 지닌 mRNA를 대상으로 real-time PCR 방법을 이용하여 mRNA 발현량을 확인한 결과 Irs1, Akt, Pyk, G6pc는 대조군과 비교할 때 RBP4를 처리한 경우 발현이 감소하였으며, Fbp2, Pepck의 발현은 대조군보다 RBP4를 처리한 경우에 증가하였다. PFK와 Gk는 RBP4 처리시 발현이 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 이상의 결과는 해당 과정에 관여하는 세 가지 효소(Pfk, Pyk, Gk)가 RBP4에 의해 모두 발현이 감소되었고, 포도당신생성(gluconeogenesis)에 관여하는 세 가지 효소(G6pc, Fbp2, Pepck)중 Fbp2와 Pepck가 RBP4에 의해 발현이 증가되었음을 보여 준다. 이를 종합해 보면 RBP4는 해당과정을 억제하고, 포도당신생성 과정을 유도함으로써 건강에 해가 되는 방향으로 기능을 하게 되어 대사증후군 발생을 유도하는 방향으로 기능을 함을 의미한다. 이 결과는 IRS가 포도당신생성 과정에서 중요한 조절자 기능을 한다는 기존의 보고³⁰⁾와 RBP4 처리시 Pepck의 mRNA 발현이 증가된다는 보고²⁵⁾에 부합되며, 그 외의 인자에 대해서는 본 연구에서 얻은 결과가 mRNA 발현에 대한 최초의 보고다.

해당과정의 윗단계에 위치하는 PKCa는 그 발현량상이 일정하지 않았을 뿐 아니라 증감 정도가 극히 미미하였으나 포도당신생성에 관여하는 Akt의 경우는 RBP4 처리시 그 발현이 감소된 것이 특징이라 할 수 있다. Akt는 다음 단계에 음성으로 작용하여 신호전달과정의 하위 단계에 위치한 인자들의 발현을 억제하는 기능을 하므로 발현량이 감소된 것은 포도당신생성에 관여하는 인자들의 발현이 증가한 것과 이론적으로 일치하고 있다.

인슐린 신호전달경로에서 더 상위단계에서 RBP4가 어떤 기전으로 기능을 하는지를 확인하기 위해 real-time PCR을 시행하였다(Table 6, Figure 7). 그 결과 Pi3k는 대조군과 비교할 때 RBP4를 처리한 경우 발현이 증가

하였으며, G6pc2, Jnk, Ptp1b, Pyk, Skip의 발현은 대조군보다 RBP4를 처리한 경우에 감소하였으며, Ikk β 와 Ship는 RBP4 처리시 발현이 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다. G6pc에 대해서는 이전의 결과를 확인하기 위해 반복실험한 것이다. Farese 등(2005)³¹⁾의 연구를 비롯하여 당뇨와 비만에서 인슐린 신호전달경로에서 위에 제시한 인자들이 어떤 기능을 하는가에 대한 연구결과는 보고되어 있으나 본 연구에서는 mRNA 발현량을 측정하는 것이 특징이라 할 수 있다. Figure 6에서 볼 수 있는 바와 같이 해당과정과 포도당신생성 과정으로 연결되는 신호전달기전의 상위 단계는 PIP₃와 관계가 있다. PIP₃의 발현에 영향을 주는 것으로는 Ship, Skip, Pi3k가 있는데 Ship와 Skip는 PIP₃가 기능을 잘 하지 못하는 방향으로 자극을 주고, Pi3k는 PIP₃가 기능을 잘 하는 방향으로 자극을 준다. 그런데 본 연구결과에서 Ship, Skip, Pi3k가 모두 RBP4에 의해 발현이 증가되는 것으로 나타났으므로 결과적으로 Ship와 Skip는 PIP₃가 기능을 잘 하지 못하는 방향으로 자극을 주고, Pi3k는 PIP₃가 기능을 잘 하도록 자극을 주게 된다. 즉 RBP4는 인슐린 신호전달경로의 중간에 위치한 PIP₃의 윗단계에서 서로 상반되는 기능을 하게 하므로 신호전달기전상 PIP₃의 윗단계에서 특별한 기능을 한다고 생각하기는 어렵다.

그러므로 본 연구에서 얻은 결과만을 토대로 RBP4의 작용기전을 이야기하자면 해당과정에 관여하는 효소들의 발현을 감소시키고, 포도당신생성에 관여하는 효소들의 발현이 증가시킴으로써 대사증후군을 유발하는 방향으로 기능을 한다고 할 수가 있다. 그러나 인슐린 신호전달경로에 관여하는 단백질 중에는 Akt²¹⁾와 같이 발현량 뿐 아니라 인산화 여부가 기능의 활성화와 밀접한 연관을 지닌 것들이 있다. 따라서 RBP가 인슐린 신호전달경로에 작용하는 기전을 확인하기 위해서는 인산화 여부가 신호전달에 중요한 단백질들을 대상으로 발현량의 변화 외에 인산화가 얼마나 일어나고 있는지를 확인해 볼 필요가 있다. 또한 본 연구에서는 real-time PCR을 통해 mRNA의 발현량이 얼마나 증가 또는 감소하는지를 확인하는 방법을 선택

했지만 mRNA의 발현량의 변화는 신호전달기능을 담당하는 인자들의 발현을 간접적으로 확인하는 방법에 불과한 것이 연구결과의 제한점이다. 궁극적으로는 분자생물학의 중심개념에서 다음 단계에 위치하는 단백질이 얼마나 만들어지는지가 직접적으로 신호전달기능과 연관성을 지니므로 웨스턴블롯 면역염색법(Western blot immunostaining)과 같이 단백질의 발현량을 측정할 수 있는 방법을 통해 단백질 발현량을 확인할 필요가 있다. 이와 같은 연구결과가 얻어져야 대사증후군 발생기전에서 RBP4의 정확한 기능을 확인할 수 있을 것이며, 대사증후군 해결을 위한 실마리를 찾을 수 있게 될 것이므로 추후의 연구가 필요한 상태이다.

본 연구를 요약하면 real-time PCR을 이용하여 RBP4가 인슐린 신호전달경로에 관여하는 인자들의 발현량상을 확인한 결과 해당작용에 관여하는 인자들의 발현을 감소시키고, 포도당신생성 과정에 관여하는 인자들의 발현을 증가시켰으며, 포도당신생성과 관련된 인자들의 발현 증가는 RBP4의 직접 작용 또는 Akt의 발현감소에 의한 것임을 확인하였다. RBP4에 의한 대사증후군 발생을 더 명확히 하기 위해서는 관련 인자들의 인산화 여부와 단백질 발현량 확인이 더 필요한 상태이다.

V. 결 론

지금까지 대사증후군 발생과 연관이 있을 것으로 제시된 수십가지 인자들중 관련 연구자들이 가장 연관성이 높다고 평가한 RBP4를 이용하여 이를 생쥐의 일차간세포에 처치한 후 real-time PCR 방법을 이용하여 인슐린 신호전달경로에 관여하는 인자들의 발현량을 확인하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. RBP4는 포도당신생성을 증가시키고, 해당작용을 감소시킴으로써 탄수화물 대사 과정에서 인체에 바람직하지 않은 결과를 가져 온다.
2. 포도당신생성이 증가하는 기전은 Akt의 발현감소에 의한다.
3. Akt와 PKCa보다 상위에 위치한 PIP₃로 전달되는 신호전달기전은 RBP4에 의한 발현 양상의 변화가 일정하지 않게 나타난다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 RBP4는 insulin signaling pathway에서 Akt에 작용하거나 포도당신생성과 해당작용에 직접 작용할 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. Reaven, G.M., Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 1988;37:1595-607.
2. Cameron, A.J., et al., The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinol Metab Clin north Am*, 2004;33:351-75
3. Vague J. La differenciation sexuelle, facteur determinant des formes de l'obesite. *Presse Med*, 1947;30:339-40
4. DeFronzo, R.A. and E. Ferrannini, Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*, 1991;14:173-94.
5. Kaplan, N.M., The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med*, 1989;149:1514-20.
6. Alberti, K.G. and P.Z. Zimmet, Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*, 1998;15:539-53.
7. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*, 2001;285:2486-97.
8. Balkau, B. and M.A. Charles, Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet Med*, 1999;16:442-3.

8. Alberti, K.G., P. Zimmet, and J. Shaw, Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med*, 2006;23:469-80.
10. Eckel, R.H., et al., The metabolic syndrome. *Lancet*, 2005;365:1415-28
11. Sutherland, J., et al., The metabolic syndrome and inflammation. *Metabolic Syndr Rel Desord* 2004;2:82-104
12. Czech, M.P. ARNT misbehavin' in diabetic beta cells. *Nat Med*, 2006;12:39-40
13. Lazar, M.A. The humoral side of insulin resistance. *Nat Med*, 2006;12:43-4
14. Hug, C., and Lodish, H.F. Vistatin: a new adipokins. *Science* 2005;307:366-7
15. Bettowski, J. Apelin and visfatin: unique "beneficial" adipokines upregulated in obesity? *Med Sci Monit*, 2006;12:112-9
16. Yang, T., et al., SIRT1 and endocrine signaling. *Trends in Endocrinol Metab*, 2006;17:186-92
17. Tang, B.L. SIRT1, neuronal cell survival and the insulin/IGF-1 aging paradox. *Neurobiol Aging*, 2006;27:501-5
18. Tang, G. siRNA and miRNA: an insight into RICS. *Trends Bichem Sci*, 2005;30:106-14
19. Kadowaki, T., et al., Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 2006;116:1784-92
20. Cai D., et al., Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK β and NF κ B. *Nat Med*, 2005;11:193-190

21. Arkan, M.C., et al., IKK β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med*, 2005;11:191-198
22. Wolfrum, C., et al., Foxa2 regulated lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. *Nature*, 2004;432:1027-32
23. Sabio G., et al., A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science*, 2008;322:1539-43.
24. Notable metabolism papers 2003-2005. *Nat Med*, 2006;12:58-61
25. Yang Q., et al., Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*, 2005;436:356-62
26. Cho, Y.M., et al., Plasma retinol binding protein-4 concentration are elevated in human subjects with glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2006;11:2457-61
27. Janke., J., Retinol-binding protein 4 in human obesity. *Diabetes*, 2006;55:2805-10
28. Graham, T.E., et al., Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med*, 2006;354:2552-63.
29. Grundy, S.M., et al., Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific statement. *Circulation*. 2005;112:2735-52
30. Fritsche, L., et al., How Insulin Receptor Substrate Proteins Regulate the Metabolic Capacity of the Liver - Implications for Health and Disease, 2008;15:1316-29
31. Farese., R.V., et al., Insulin-Sensitive Protein Kinases (Atypical

Protein Kinase C and Protein Kinase B/Akt): Actions and Defects
in Obesity and Type II Diabetes. *Exp Biol Med* (Maywood),
2005;230:593-605

Abstract

Molecular mechanism of RBP4 on the basis of insulin signaling pathway in primary hepatocytes

Moon Young Kim

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Byung-II Yeh)

Metabolic syndrome is a cluster of symptoms closely associated with diabetes, obesity, and cardiovascular disease such as hypertension. The prevalence of this is being increased as the lifestyle changes. Since the definition of the metabolic syndrome was defined, many researchers has studied to examine the pathogenesis, but the mechanism is not known so far. Only many factors has been proposed to be related with the occurrence of metabolic syndrome. In this study, I tried to confirm the molecular mechanism of RBP4 which is regarded one of the critical factors in the pathogenesis of metabolic syndrome.

Recombinant mouse RBP4 was treated to the primary hepatocytes prepared from the ICR mouse. After RNA purification cDNA microarray was performed to check the mRNA quantities. However, as significant factors were not found by this method I focused those of insulin signaling pathway. mRNA expression was measured real-time PCR and I got the results below.

1. RBP4 has an undesirable effect for metabolic syndrome by increase of gluconeogenesis and decrease of glycolysis.

2. The increase of gluconeogenesis is due to decreased expression of Akt.

3. The effects of several factors which influences on PIP₃ expression, which plays a role as controller at the upper level than PKC α and Akt in the insulin signalling pathway, are not constant by RBP4.

On the basis of the results it is concluded RBP4 may induce metabolic syndrome by increase of gluconeogenesis and decrease of glycolysis. However, the phosphorylation is very important as well as the expressed quantity in the function of proteins. Many proteins associated with insulin signaling pathway are also can be phosphorylated to have a specific function such as Akt. Therefore, the studies to check the phosphorylation of the factors are needed. And protein expression has to be studied because mRNA quantitation by real-time PCR is a indirect method.

In summary, RBP4 increase gluconeogenesis mediated by Akt and decrease glycolysis in insulin signaling pathway. To get the clue to solve the metabolic syndrome the researches to confirm the phosphoryation of the factors and protein expression analysis are needed.

Key words : Metabolic syndrome, Mouse hepatocytes, Signal transduction, RBP4, Glycolysis, Gluconeogenesis