

전구지방세포에서 퓨린성 수용체에  
의한 세포 내 칼슘이온 조절

연세대학교 대학원

의 학 과

이 형 주

전구지방세포에서 푸린성 수용체에  
의한 세포 내 칼슘이온 조절

지도 공 인 덕 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2009년 1월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

이 형 주

# 이형주의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2009년 1월 일

## 감사의 글

본 논문의 처음 연구계획에서부터 완성에 이르기까지 학문적 기틀을 잡아 주시고 친절하고 소상한 가르침을 베풀어 주셨던 지도교수이신 공인덕 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 논문의 내용에 많은 조언과 자문을 아끼지 않으셨던 김수기 교수님, 최응호 교수님, 예병일 교수님께 감사드립니다. 아울러 연구과정에서 지도와 격려를 아끼지 않으신 이중우 교수님, 정성우 교수님, 지금은 스위스에서 학교를 빛내고 있는 오랜 친구인 박규상 교수님, 연구와 논문에 큰 도움을 주신 백준흠 선생님께도 깊은 감사를 드립니다. 그리고 대학원 시절 항상 격려와 조언으로 이끌어 주신 선후배님께 감사를 드립니다.

끝으로 오늘이 있기까지 저를 위해 항상 기도로 용기와 희망과 격려를 아끼지 않으신 부모님께 이 논문을 드리며 사랑하는 두 아들과 아내와 함께 이 기쁨을 함께 누리고자 합니다.

2009년 1월

저자 씀

# 차 례

그림 차례 .....	iii
표 차례 .....	iv
국문요약 .....	v
제 1장 서론 .....	1
제 2장 재료 및 방법 .....	6
2.1. 모델 세포주 및 배양 .....	6
2.2. 실험 용액 및 약물 .....	6
2.2.1. 실험 용액 .....	6
2.2.2. 약물 .....	6
2.3. 세포 내 칼슘이온농도 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 측정 .....	7
2.4. 전구지방세포에서 지방세포로의 분화유도 및 지방세포의 Oil-Red-O 염색 .....	9
2.4.1. 전구지방세포에서 지방세포로의 분화유도 .....	9
2.4.2. 지방세포의 Oil-Red-O 염색 .....	9
2.5. 역전사 연쇄 증합반응 (RT-PCR) .....	9
2.6. 실시간 역전사 연쇄 증합반응 (Realtime RT-PCR) .....	10
2.7. 세포 내 cAMP 농도 측정 .....	12
2.8. 자료 분석 .....	12
제 3장 결과 .....	13
3.1. ATP에 의한 세포 내 칼슘이온농도 변화 .....	13
3.2. 푸린성 수용체 길항제에 의한 세포 내 칼슘이온농도 변화 .....	17

3.3. ATP에 의한 세포 내 cAMP 농도 변화 .....	19
3.4. 분화 유도에 의한 Oil-Red-O 염색 .....	20
3.5. 역전사 연쇄 중합반응 방법을 이용한 분화유전자의 분자생물학적 규명 ...	20
3.6. 분화 전후 P2Y 수용체 및 IP <sub>3</sub> 수용체 아형의 발현 변화 .....	23
3.6.1. P2Y 퓨린성 수용체 .....	23
3.6.2. IP <sub>3</sub> 수용체 .....	23
제 4장 고찰 .....	26
제 5장 결론 .....	30
참고문헌 .....	31
영문요약 .....	40

## 그림 차례

그림 1. 세포 내 칼슘이온농도 이미징 측정을 위한 장치 및 모식도 .....	8
그림 2. ATP 농도에 따른 세포 내 칼슘이온농도 변화 .....	14
그림 3. 세포 외 칼슘이 ATP에 의한 세포 내 칼슘이온농도 변화에 미치는 효과 .....	15
그림 4. U-73122가 ATP에 의한 세포 내 칼슘이온농도 변화에 미치는 효과 .....	16
그림 5. 비선택적 길항제인 suramin이 세포 내 칼슘이온농도 변화에 미치는 효과 .....	18
그림 6. ATP에 의한 세포 내 cAMP 농도 변화 .....	19
그림 7. 전구지방세포에서 지방세포로 분화 유도한 후 Oil-Red-O 염색 .....	21
그림 8. 전구지방세포와 지방세포에서의 분화에 따른 Oil-Red-O 염색 반응과 분화 지표 .....	22
그림 9. 전구지방세포와 지방세포에서의 P2Y 퓨린성 수용체의 분자생물학적 규명 .....	24
그림 10. 전구지방세포와 지방세포에서의 IP <sub>3</sub> 수용체의 분자생물학적 규명 .....	25

## 표 차례

표 1. 설치류에서 백색지방과 갈색지방의 특징 .....	5
표 2. 역전사 연쇄 중합반응에 사용된 분화유도 특정 유전자 primer .....	11
표 3. 실시간 역전사 연쇄 중합반응에 사용된 P2Y 수용체 및 IP <sub>3</sub> 수용체 primer ...	11

## 전구지방세포에서 퓨린성 수용체에 의한 세포 내 칼슘이온 조절

세포 외에서 ATP가 원형질막 G-단백의 일종인 P2Y 수용체에 결합하게 되면 다양한 생리학적 작용을 하게 된다. 단기간으로는 세포 외 뉴클레오티드로써 작용을 하며, 장기간으로는 세포의 증식, 분화, 세포사멸에 관여하기도 한다. 전구지방세포인 3T3-L1 세포는 마우스 태아로부터 분리하였으며, 일반적으로 *in vitro* 상에서는 지방세포로 분화하거나 지방세포의 기능을 하기도 한다. 그러나 아직까지 전구지방세포에서 P2Y 수용체 아형의 종류나 역할에 대해서 알려지지 않고 있다. 이에 본 연구에서는 칼슘 이미징 기법과 역전사 연쇄 중합반응의 방법을 이용하여 3T3-L1 세포에 발현된 P2Y 퓨린성 수용체의 아형과 기능적 특성을 규명해 보고자 하였다. 본 연구를 통해 규명된 주요 결과는 다음과 같다.

1. ATP ( $EC_{50}=224\pm 0.06 \mu\text{M}$ ,  $N=5$ ,  $n=35$ )에 의한  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  농도 의존적으로 증가하였으며, 세포 외에 칼슘이 제거된 조건에서도 ATP에 의해서  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 가 증가하였다.
2. P2Y 수용체의 비선택적인 길항제인 suramin (1 mM) 투여 시에는 ATP에 의한  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  대조군과 비교하여 대부분 억제되었다.
3. U-73122 (1  $\mu\text{M}$ )은 ATP에 의한  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  증가를 대부분 ( $n=34$ ) 억제하였으나, U-73343 (1  $\mu\text{M}$ ) 투여 시에는  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 가 억제되지 않는 것으로 나타났다.
4. 전구지방세포와 분화된 지방세포에서 발현되는 특정 유전자 ( $G_0/G_1$ ) 간에는 확연한 차이가 있음을 볼 수 있다.
5. 실시간 역전사 연쇄 중합반응을 이용하여 P2Y<sub>2, 5, 6</sub> 아형의 수용체가 발현되어

있고, 특히 P2Y<sub>5</sub>가 가장 많이 발현되어 있음을 확인할 수 있었다. 그리고 전구지방세포에서는 IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>가 가장 많이 발현되어 있었지만, 지방세포로 분화된 후에는 IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> 발현이 거의 없음을 확인하였다.

6. 퓨린성 수용체에 의해 시간의존적으로 cAMP의 농도가 증가하였다.

이상의 결과들로부터 전구지방세포에서는 P2Y<sub>5</sub> 수용체가 가장 많이 발현되어 있으며, 복합적인 P2Y 수용체 (P2Y<sub>2</sub>, <sub>5</sub>, <sub>6</sub>)는 세포 내 칼슘이온농도와 cAMP를 조절하여 세포의 증식과 분화에 관여할 것으로 사료된다.

---

핵심되는 말 : 전구지방세포, 칼슘, cAMP, P2Y<sub>5</sub>

# 전구지방세포에서 퓨린성 수용체에 의한 세포 내 칼슘이온 조절

<지도교수 공 인 덕>

연세대학교 대학원 의학과

이 형 주

## 제1장 서론

비만은 우리나라뿐만 아니라 전 세계적으로 주요 건강문제가 되고 있으며, 심혈관질환, 당뇨병, 암, 관절염 등과 같은 심각한 질환의 주요 원인으로 지목되고 있다. 이러한 인식에도 불구하고 비만은 점차로 증가하고 있는 추세이어서 비만에 대한 다양한 수준에서의 기전탐색과 규명이 시급한 실정이다.

최근 들어 비만에 대한 세포 내 분자 수준에서 신호전달 경로를 규명하는 연구가 활발하게 이루어지고 있는데, 특히 지방조직의 주요 세포 성분인 지방세포(adipocyte)가 전구지방세포 (preadipocyte)로부터 분화하는데 관여하는 조절 기전들이 일부 보고되어 있다 (Gregoire 등, 1998; Tang 등, 1999; 2005).

일반적으로 지방세포는 해부학적 위치, 형태학적 구조, 기능 및 조절에 따라 백색지방 (white adipose tissue, WAT)과 갈색지방 (brown adipose tissue, BAT)으로 구별 된다 (표 1). 백색지방은 체내 에너지 항상성 유지에 중추적 역할을 담당한다 (Karamanlidis 등, 2007). 즉, 에너지 흡수량이 소비량에 비해 많은 경우 이를 중성지방의 형태로 저장하고, 에너지가 부족한 경우 에너지를 이용할 수 있도록 조절한다 (Lee 등, 2005). 최근에는 지방세포가 능동적으로 adipocytokine 등을 분비하여, 체내 에너지 섭취와 소비의 균형을 조절한다고 보고되고 있다 (Cantile 등, 2003). 지방세포에서 분비되는 물질로는 펩타이드성 호르몬인 leptin, adiponectin,

resistin, 또는 TNF- $\alpha$ 와 같은 adipocytokine 등과 FFA (free fatty acids)와 같은 지질 등이 존재한다 (Ho 등, 2005). 이들 분비물질들은 뇌, 간, 근육을 포함하는 여러 생체기관에 광범위하게 영향을 줌으로써 지방과 당대사를 포함한 체내 에너지 대사 항상성 유지에 중요한 역할을 수행하는 것으로 밝혀져 있다 (Cantile 등, 2003; Liu 등, 2006). 지방세포의 성장은 지방 크기가 증가되는 것과 지방세포가 전구지방세포로부터 분화되는 것을 말하며, 전구지방세포의 규명이 세포의 증식과 분화를 조절하는 인자를 규명할 수단으로 알려져 있다.

갈색지방은 많은 수의 미토콘드리아를 가지고 있으며 (Si 등, 2007), 미토콘드리아에 존재하는 사이토크롬 (cytochrome) 색소에 의해 갈색을 띠고 있다 (Hansen 등, 2004; Lee 등, 2005). 또한 지방분해와 지방산 산화 능력을 포함한 대사활성이 크고, 열 생산을 통하여 체온을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Cantile 등, 2003; Hansen 등, 2004). 갈색지방의 열발생 기능은 미토콘드리아와 UCP1 (uncoupling protein 1)이라는 미토콘드리아 단백질에 의해 일어난다 (Liu 등, 2006; Si 등, 2007). 갈색지방은 갓 태어난 동물에 많으며, 인간의 경우 태아와 신생아에서만 발견되고 성인에서는 나타나지 않는다. 설치류의 경우 성체에서도 상당한 양이 발견되며, 저온에 노출될 경우에 그 양이 증가하게 되며 (Karamanlidis 등, 2007), 특히 동면동물에서 지방세포의 발달은 동면 시에 현저히 나타난다.

지방세포의 분화과정은 전구지방세포에서 지방세포로 전환되는데, 분화 특정 호르몬에 의한 외부 자극과 복잡한 유전자발현 조절과정을 통하여 일어나며 (Green 등 1974; Ho 등, 2006), 이러한 외부 신호는 지방세포 특이적인 유전자 발현 조절 경로를 통하여 조절된다 (Farmer 등, 2006). 지방세포 분화를 유도하는 외부 신호 중 인슐린은 가장 널리 알려져 있는 호르몬이며 (Lee 등, 2005; Ho 등, 2006), 전구지방세포는 인슐린 자극에 의해 지방세포로 분화된다 (Otto 등, 2005). 인슐린은 당질의 흡수와 중성지방의 합성을 증가시키는 등, 지질의 형태로 에너지를 저장하고, 지질분해효소를 활성화시킴으로써 혈액 내에 순환하는 지질단백에서 유래된 지방산 흡수를 촉진하기도 한다 (MacDougald 등, 1995; Gregoire 등, 1998; Lee 등, 2005; Otto 등, 2005). 인슐린에 의해 지방세포 분화가 유도되는 동안 PPAR $\gamma$ , C/EBP family, ADD1/SREBP1 등의 전사인자들의 전사 발현이 증가하게 되며

(Lane 등, 1999; Kim 등, 2007), 이들 전사인자들은 상호 전사를 유도함으로써 지방세포 분화를 유도하는 것으로 알려져 있다 (Gregoire 등, 1998; Tang 등, 1999; 2005; Zandbergen 등 2005).

ATP (adenosine 5'-triphosphate)는 세포 내에서 에너지원으로 이용될 뿐 아니라 세포 외에서는 전령물질 (messenger)로 작용하면서 다양한 생리적 기능에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Burnstock, 1997). 세포 외액의 ATP와 같은 아데닌 뉴클레오티드는 세포 외막에 존재하는 퓨린성 수용체 (purinergic receptor)를 매개로 작용을 나타내며, 여기에는 P1과 P2 수용체가 있다. 일반적으로 세포 외액의 퓨린 뉴클레오티드와 뉴클레오시드는 포유동물의 장기와 뼈, 지방 등과 같은 조직에 광범위하게 분포하고 있으면서 (Fries 등, 2004) 신경전달 (Ralevic 및 Burnstock, 1998; Newman, 2003), 근수축 (Akasu 등, 1981; Kong, 1993; Lee 등, 2000), 호르몬, 신경전달물질 및 사이토카인 (cytokine) 분비 (Fries 등, 2004) 등과 같은 생리적 기능을 조절한다.

특히 P2 수용체는 다양한 세포에 광범위하게 분포하고 있는 세포 외 뉴클레오티드의 작용을 매개하며, 여기에는 리간드-의존성 P2X 수용체와 G-단백 연결 P2Y 수용체가 포함된다. 현재까지 포유류에서 클로닝 된 P2Y 수용체에는 P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>5</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>10</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, P2Y<sub>14</sub> 등의 아형들이 보고되어 있다. (Janssens, 1997; Ralevic 및 Burnstock, 1998; Fries 등, 2004). 이 중 P2Y<sub>1</sub>, 2, 4, 6 수용체는 사람에게서 클로닝 되어 왔고 기능적으로 활성화된 형태라고 알려져 있는 반면 (Ralevic 및 Burnstock, 1998; sak 등, 2002; Abbracchio 등, 2003) 그 외 아형들, 특히 P2Y<sub>5</sub>와 P2Y<sub>10</sub>, 그리고 최근에 보고된 P2Y<sub>12</sub>, 13, 14 아형들에 대해서는 아직 알려진 바가 적다 (Murakami 등, 2008; Pasternack 등, 2008).

P2Y 퓨린성 수용체에 의한 세포 내 신호전달 기전은 대부분 phospholipase C (PLC)가 활성화, inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) 생성, 세포 내 칼슘 동원의 경로를 따르며 (Harden 등, 1995), P2Y<sub>1</sub>, 2, 4, 6, 14 수용체 아형들이 이러한 기전을 나타낸다 (Chen 등 1995). 그 외 adenylyl cyclase (AC)를 경유하는 cAMP를 조절하는 기전도 알려져 있는데 (Ralevic 및 Burnstock, 1998), P2Y<sub>5</sub>, 12, 13 수용체 아형들이 여기에 속한다 (Burnstock, 2007). 특이하게, P2Y<sub>11</sub>은 PLC와 AC 기전을 모두

활성화시키는 것으로 알려져 있다 (Burnstock, 2007).

한편, 선행연구에 의하면 ATP는 지방세포에서 포도당 이동, 지방분해, 인슐린 작용, 세포질 내 칼슘 조절 등 다양한 생리적 기능조절에 관여하는 것으로 보고되어 있다. 그러나 지방 전구세포에서의 퓨린성 작용에 대한 연구는 드물어, 전구 지방세포에서 지방세포로 분화하는데 있어 퓨린성 기전의 관련성에 관해서는 잘 알려져 있지 않다. 최근 들어 ATP가 P2Y 수용체를 활성화시켜 전구 지방세포의 이주 (migration)와 지방세포로의 분화를 촉진하는 것으로 보고되었지만 (Omatsu-Kanbe 등, 2006) 그 기전에 대해서는 여전히 밝혀져 있지 않으며, 또한 여러 P2Y 수용체 중 어떠한 아형(들)이 작용하는지도 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 전구 지방세포를 대상으로 여기에 발현되어 있을 것으로 예상되는 퓨린성 수용체의 발현특성을 규명하고 이를 통하여 분화 전·후 지방세포에서 P2Y 퓨린성 신호전달의 기전을 탐색해 보고자 하였다.

표 1. 설치류에서 백색지방과 갈색지방의 특징

	WAT	BAT
주요 위치	서혜부, 복막후	견갑골, 겨드랑이, 척추방
색	상아색, 노란색	갈색
혈관시스템	++	+++
신경 자극 전달	교감신경계(++)	교감신경계(+++)
지방 세포	단세포	다세포
기능	체내 에너지 항상성 유지	열 생산을 통한 체온 조절
미토콘드리아	+	+++
UCPs	UCP2(++)	UCP1, UCP2(+), UCP3
GMP 환원효소	-	+++
Leptin	+++	+++
$\alpha$ , $\beta$ -adrenoceptors	$\beta$ 3(++), $\alpha$ 2(+)	$\beta$ 3(+++)
PGC-1	+	+++
Cig 30 mRNA	-	++

(Seo 등, 2004)

## 제 2장 재료 및 방법

### 2.1. 모델 세포주 및 배양

본 연구에서 사용한 전구지방세포인 3T3-L1 세포는 마우스 태아에서 분리한 것으로 미국 세포주 은행 (ATCC)에서 분양받아 사용하였다. 3T3-L1 세포는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)에 10% 우 혈청 (Bovine Serum, BS) 및 100,000 unit/L penicillin이 첨가된 배지에서 배양하였다. 세포주는 ATCC의 프로토콜에 따라 3~4일 간격으로 배지를 갈아주었고 7일을 주기로 계대배양하였다.

### 2.2. 실험 용액 및 약물

#### 2.2.1. 실험 용액

칼슘 이미징 실험을 위한 세포 외 관류액 (external solution; PSS)의 조성 (mM)은 135 NaCl, 5 KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 glucose (pH 7.4) 이었다.

#### 2.2.2. 약물

우 혈청 및 antimycotic-antibiotics는 Gibco BRL로부터, fura-2/AM은 Molecular probes로부터 각각 구입하였고, DMEM, ATP, U-73122, U-73343, suramin, isobutylmethylxanthine (IBMX), insulin, dexamethasone, Oil-Red-O는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Fura-2/AM과 U-73122, U-73343은 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 사용하였고, IBMX는 3차 증류수와 KOH에 녹였으며, 그 외의 모든 시약은 3차 증류수에 녹여 사용하였다.

### 2.3. 세포 내 칼슘이온농도 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 측정

세포 내 칼슘이온농도 ( $[Ca^{2+}]_i$ )의 변화를 측정하기 위해 형광이미지 시스템 (fluorescence imaging system)을 사용하였다. 먼저 세포배양액 1 ml에 fura-2/AM 5  $\mu$ M 농도를 첨가한 후 1분간 초음파 처리 (sonication) 후 여기에 전구지방세포가 붙어있는 coverslip을 넣은 다음 37°C 세포 배양기 (CO<sub>2</sub> incubator, 95% air, 5% CO<sub>2</sub>)에서 1시간 부하시켰다. 부하가 끝나면 세포의 관류액으로 2회 세척하여 세포 외액의 잔여 fura-2/AM을 충분히 제거한 다음 도립현미경 (IX51, Olympus, Japan) 위의 관류 챔버에 올려놓고 관류액 (normal PSS)을 중력에 의해 2 ml/min 속도로 10분 이상 관류시켜 충분한 탈에스테르화 (deesterification)가 되도록 하였다.

형광이미지는 75-W Xenon lamp로부터 나오는 광원 (light source) 중 fura-2/AM에 적합한 340/380 nm ( $F_{340/380}$ ) 파장으로 여기 (excitation) 시켰을 때 510 nm의 파장에서 방출 (emission)되는 형광 세기를 CCD 카메라 (cooled charge-coupled device camera, Cascade, Roper, USA)가 증폭시켜 이미지로 나타내었는데 (그림 1), 이때 얻어지는 형광이미지는 약물투여 시 0.1 Hz의 빈도로 60 초간 측정하였으며 세척동안에는 0.03 Hz의 빈도로 측정하여 광원으로 인한 세포 손상을 최소화하였다. 세포 내 칼슘이온농도는 자극을 주기 전 fura-2/AM 부하로 인한 기본 형광값 ( $F_0$ )에서 약물을 투여하였을 때 변화되는 형광값 ( $F_{340/380}$ )의 비율로 측정하였으며  $Ratio(F_{340}/F_{380})$  값이 세포 내 칼슘이온농도의 변화를 반영하도록 하였다. 세포마다 fura-2/AM에 부하되는 정도에 차이가 있어, 본 연구에서는  $F_0$  값이 1,000 이상으로 충분히 잘 부하된 세포에서 얻은 값만을 포함시켰다.

측정한 형광이미지는 소프트웨어 패키지인 MetaFluor 6.1 (Universal Imaging Corporation, USA)로 기록한 뒤, 단일세포의  $Ratio(F_{340}/F_{380})$  값을 평균 내어 분석하였으며, 이들 형광  $Ratio(F_{340}/F_{380})$  값의 최대 (peak)치를 비교하여 분석하였다.

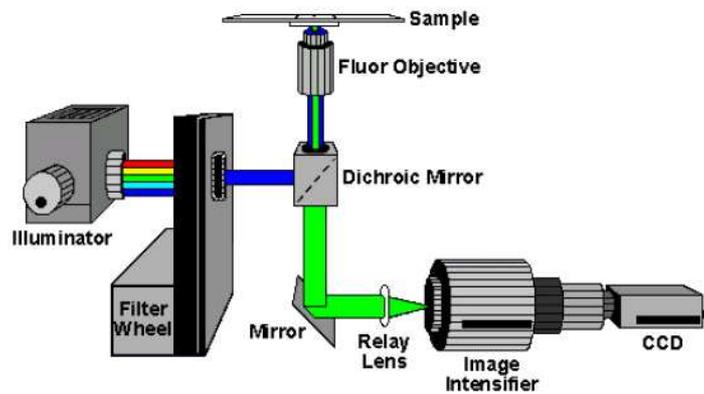


그림 1. 세포 내 칼슘이온농도 이미징 측정을 위한 장치 및 모식도. Illuminator에서 나오는 광원 중 filter를 통과한 340/380 nm의 파장이 dichroic mirror에서 반사되어 시료 (sample)를 여기 (excitation) 시키면 사방으로 형광이 방출 (emission)되며 이 중 510 nm 파장에 해당하는 형광이 relay lens와 증폭기 (image intensifier)를 통과하면서 CCD 카메라에 포착되고 이것이 컴퓨터의 하드 디스크에 저장된다.

#### 2.4. 전구지방세포에서 지방세포로의 분화유도 및 지방세포의 Oil-Red-O 염색

#### 2.4.1. 전구지방세포에서 지방세포로의 분화유도

35 mm 용기에 배지 (DMEM + BS + penicillin)를 채운 다음 세포를 깔고 (% 밀도) 2일 후에 배지를 교체해주었다. 4일째 되는 날, 용기에 세포가 꽉 차게 되면 배지를 깔고 2일 더 기다린다. 6일째 되는 날에 MDI (1  $\mu$ M dexamethasone + 167 nM insulin + 520  $\mu$ M IBMX)를 1ml 배지에 섞어서 처리 하였다 (이때 배지의 조성은 DMEM + FBS + penicillin). 8일째 되는 날에 insulin만 들어간 배지로 바꾸어주고, 10일 차에 동일 배지로 교체해주어 분화가 완료된 지방세포를 확보하였다.

#### 2.4.2. 지방세포의 Oil-Red-O 염색

분화가 완료된 지방세포가 들어 있는 용기를 PBS로 2회 세척하여 배지를 완전히 제거해 주었다. 고정액 (10% formalin + 90% PBS)으로 3분간 세포를 고정시킨 후, 100% propylene glycol을 이용하여 2분 30초간 2회 과정으로 세포를 탈수시킨다. Oil-Red-O를 이용하여 10분간 염색을 하였다. 이때 60 $^{\circ}$ C (염색약 굳는 현상 방지)를 유지해주는 것이 중요하다. 세척액 (85% propylene glycol + 3차 증류수)으로 3분간 세척을 하고, 마지막으로 3차 증류수로 잔여물이 없어질 때까지 세척을 하였다. 광학현미경으로 염색된 세포 이미지를 얻었다.

#### 2.5. 역전사 연쇄 증합반응 (RT-PCR)

Guanidinium thiocyanate-phenol-choloroform 추출 방법을 이용하여 3T3-L1 세포로부터 전체 RNA를 분리하였다 (Chomczynski 및 Sacchi, 1987). 먼저 세포를 guanidinium thiocyanate buffer로 용해시킨 다음 페놀 및 클로로포름을 가하여 얼음 위에서 15분 이상 세워두었다. 이를 4 $^{\circ}$ C에서 10,000 xg로 15분간 원심 분리한 후 상층액을 조심스럽게 취하여 동량의 isopropanol과 잘 섞은 뒤 -70  $^{\circ}$ C에

서 1시간 이상 세워두어 RNA를 침전시켰다. 다시 4 °C에서 10,000 xg로 15분간 원심 분리하여 RNA 침전물을 얻었으며, 이를 75% ethanol로 씻어낸 후 원심 분리하여 RNA 시료를 얻었다.

정량한 1 µg의 RNA를 1 mM dNTP, 50 µM oligod(T), 20 U RNase inhibitor와 50 U murine leukemia virus reverse transcriptase (Perkin-Elmer, Shelton, CT, USA)와 함께 37 °C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 이어 역전사 연쇄 중합반응은 분화 관련 유전자에 대한 primer를 이용하여 적당한 조건에서 이루어졌으며 이들의 염기서열은 표 2에 각각 요약하였다. 역전사 연쇄 중합반응액에는 합성된 cDNA 0.05 µg, 각각의 primer (10 pmoles), 1.25 units의 AmpliTaq DNA polymerase (perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA), 10 nmoles dNTP 등이 포함되게 하여, 94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 1분으로 35회 (cycle)동안 반응시켰다. 역전사 연쇄 중합반응 산물은 ethidium bromide가 포함된 1.5 % agarose gel에 전기 영동하여 U.V. 하에서 관찰하였다.

## 2.6. 실시간 역전사 연쇄 중합반응 (Realtime RT-PCR)

총 RNA의 분리와 cDNA 합성은 전술한 바와 같고 내부대조군은 GAPDH의 cDNA를 PCR로 증폭시켰다 (2.4 참조). 합성된 총 cDNA 50 mg과 1X QUANTITECT SYBR Green PCR Master Mix, 0.5 µM primer pairs를 섞어 혼합물을 제작하였다. 준비된 혼합물을 95 °C 15분 동안 예열 한 후 95 °C 15초, 58 °C 30초, 72 °C 30초의 주기로 45회 반복 실시간 역전사 연쇄 중합반응을 수행하였고 (Rotor-Gen 3000 thermal cycler, Corbett Research, USA) 55 °C에서 99 °C까지의 온도로 용해곡선을 그려 primer의 특이성을 확인하였다. 결과는  $2^{-\Delta\Delta CT}$  공식을 적용하여 상대적 비의 변화를 표현하였다 (Livak 등 2001). 특정 primer는 표 3에 제시하였다.

표 2. 역전사 연쇄 중합반응에 사용된 분화유도 특정 유전자 primer

Primer		Sequence	Accession code	Size(bp)
GAPDH	Sense	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	M32599	451
	Antisense	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'		
AP2	Sense	5'-CCTGGAAGACAGCTCCTCCTC-3'	K02109	453
	Antisense	5'-ATCCAGGCCTCTTCCTTTGCTC-3'		
CD36	Sense	5'-CACATTCCTACATGCAAGTCCAG-3'	L23108	324
	Antisense	5'-CCAATCCAAGTAAGGCCATCTC-3'		
G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	Sense	5'-GCCTGACCTTCTCCAGCAAGTG-3'	X95280	425
	Antisense	5'-TCATGATCTGTGTCTCCCTTCTC-3'		

표 3. 실시간 역전사 연쇄 증합반응에 사용된 P2Y 수용체 및 IP<sub>3</sub> 수용체 primer

Primer		Sequence	Accession code	Size(bp)
GAPDH	Sense	5'-CTGGAGAAACCTGCCAAGTA-3'	M32599	130
	Antisense	5'-AGTGGGAGTTGCTGTTGAAG-3'		
P2Y <sub>1</sub>	Sense	5'-CTGATCTTGGGCTGTTATGG-3'	NM_008772	109
	Antisense	5'-CCGTCAGGACAATTATCACC-3'		
P2Y <sub>2</sub>	Sense	5'-CTGCACAGGCCTAACAGAAC-3'	NM_008773	106
	Antisense	5'-GCCGAATGTCTTAGTCTCA-3'		
P2Y <sub>4</sub>	Sense	5'-TTTTCTCACCTGCATCAGT-3'	NM_020621	110
	Antisense	5'-CCAAACACCTAGGCAGAGAA-3'		
P2Y <sub>5</sub>	Sense	5'-ACTCTGTACGGGTGCATGTT-3'	NM_175116	95
	Antisense	5'-CTCACTTTGAGGGCACAGAT-3'		
P2Y <sub>6</sub>	Sense	5'-TCCTCACCTGCATTAGCTTC-3'	AF298899	110
	Antisense	5'-CCACACGACTCCACACACTA-3'		
P2Y <sub>10</sub>	Sense	5'-GCCTTGCAAGTCTCTGTTGT-3'	NM_172435	93
	Antisense	5'-CAGAGCTTCCATGACGAGAT-3'		
P2Y <sub>12</sub>	Sense	5'-CACCTATGGCTTACGTCAC-3'	NM_027571	108
	Antisense	5'-GAGTTTGAGCACCTCAGCAT-3'		
P2Y <sub>13</sub>	Sense	5'-CGGTGATTACCAAAAAGGTG-3'	NM_028808	107
	Antisense	5'-AAAGAAGACAGCCATGACGA-3'		
P2Y <sub>14</sub>	Sense	5'-GGAACACCCTGATCACAAAG-3'	NM_133200	112
	Antisense	5'-GAGCTGGGCACATAAAAAGAA-3'		
IP <sub>3</sub> R <sub>1</sub>	Sense	5'-GAACAGAACGAGCTGAGGAA-3'	BC003271	141
	Antisense	5'-TCCTAGAAGGCCGATTCTTT-3'		
IP <sub>3</sub> R <sub>2</sub>	Sense	5'-TACGCCCCGTACAAGTATGT-3'	BC033315	114
	Antisense	5'-GGAAGTGCATAACGCAGAAAGT-3'		
IP <sub>3</sub> R <sub>3</sub>	Sense	5'-CATCATCGTGTGAAACCTCA-3'	BC010323	132
	Antisense	5'-TCAAACCTGTCCCTCTCCAG-3'		

## 2.7. 세포 내 cAMP 농도 측정

세포 내 cAMP 농도 변화를 측정하기 위해 CatchPoint™ cAMP Fluorescent

Assay Kit (Molecular Devices Corporation, Orleans, CA, USA)를 사용하였다. Kit에서 제공하는 세포 배양 용기 (96 well)에  $1 \times 10^4$ 개의 세포를 깔고 하루동안 37°C 세포 배양기에 안정화 시켰다. 배지를 제거하고 10 mM 글루코즈 (glucose)가 포함된 Krebs-Ringer Bicarbonate Buffer (KRBG) 씻어낸 후, 세포 내에 발생한 cAMP가 분해되지 않게 하기 위해 0.75 mM IBMX를 100  $\mu$ l KRBG에 넣어 세포가 들어있는 모든 용기에 10분간 처리하였다. 100  $\mu$ M, 1 mM ATP를 50  $\mu$ l PBS에 넣고 각각 용기에 5분, 10분, 15분, 30분, 60분 처리하였다 (37°C). 다음 과정부터는 CatchPoint™ cAMP Fluorescent Assay Kit에서 제공해 준 실험방법과 시약을 이용하여 진행하였다.

cAMP 측정은 FlexStation II (Molecular Devices Corporation, Orleans, CA, USA)를 이용 측정하였으며 SoftMax Pro v5.2 (Molecular Devices Corporation, Orleans, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

## 2.8. 자료 분석

결과는 평균 (mean)과 표준오차 (SEM)로 나타내었으며, 통계적인 의미는 unpaired t-검정과 분산분석 (one-way ANOVA)으로 검정하여, p값이 0.05 이하일 때를 유의한 차이가 있다고 간주하였다. 결과에서 제시한 그림에서 실험횟수는 N으로, 세포 수는 n으로 표기하였다.

## 제 3장 결과

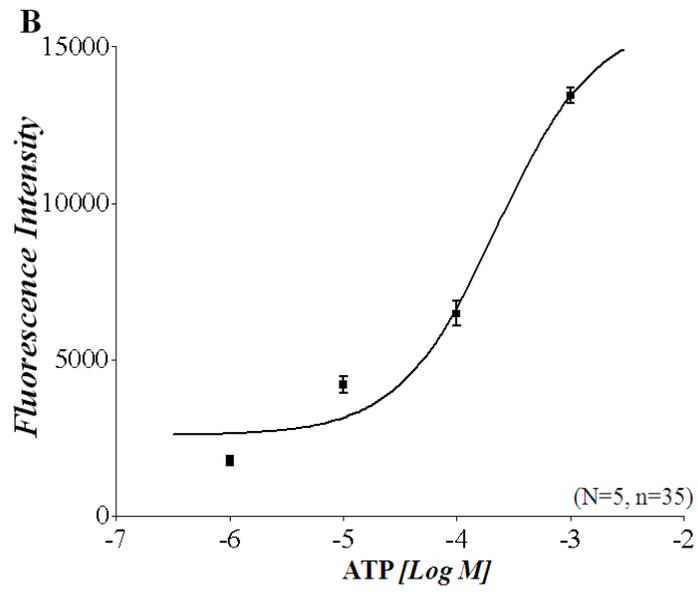
### 3.1. ATP에 의한 세포 내 칼슘이온농도 변화

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

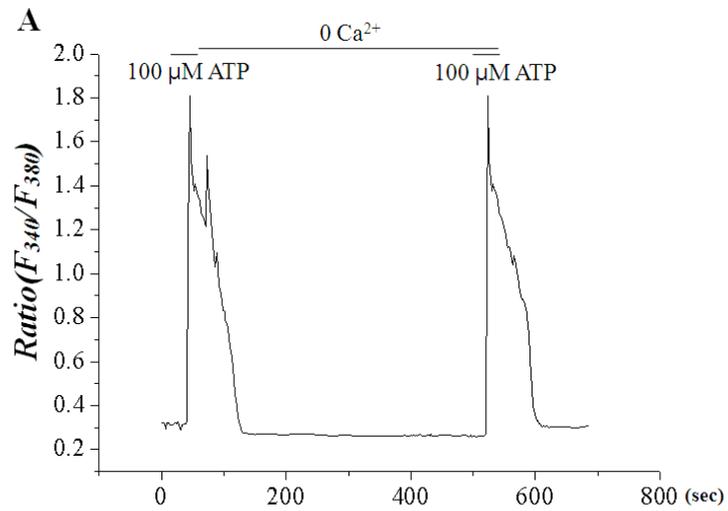
ATP 투여 후 일시적 세포 내 칼슘이온농도 증가가 세포 외 칼슘유입 때문인지, 세포 내 칼슘저장소 (endoplasmic reticulum, ER)로부터의 유리인지를 알아보기 위하여 세포 외 칼슘을 제거한  $Ca^{2+}$ -free ( $0 Ca^{2+}$ ) 관류액을 5분간 전처리한 후 ATP에 의한 세포 내 칼슘이온농도의 변화를 관찰하였다 (그림 3A). 실험결과 세포 외 칼슘이 제거된 조건에서도 ATP에 의한 세포 내 칼슘이온농도 증가는 대조군과 비슷하게 유지되어 통계적 유의성은 없었다 (그림 3B). 이 결과로 세포 외 칼슘이 ATP에 의한 세포 내 칼슘이온농도에는 영향을 미치지 않은 것으로 확인하였다. 이와 같은 결과는 ATP에 의한 칼슘 증가가 세포 외부의 칼슘과는 무관하게 세포 내 칼슘저장소로부터의 동원에 의함을 시사한다.

다음으로는 ATP에 의한 세포 내 칼슘동원 기전을 확인하고자 PLC 경로 차단제인 U-73122 2  $\mu$ M을 사용하여 대조군과 비교하였다. U-73122를 5분 동안 전처리 후 ATP에 의한 세포 내 칼슘반응이 완전히 차단되었다 (n=33)(그림 4A, B). 반면에, U-73122의 구조적 유사체 (isoform)인 U-73343 2  $\mu$ M를 동일시간 전처리한 경우 ATP에 의한 칼슘이온의 증가는 영향을 받지 않았다 (그림 4C, D). 따라서 이와 같은 결과들을 종합해 볼 때 ATP에 의한 퓨린성 수용체 활성화의 주요 기전은 PLC 경로를 통한 세포 내 칼슘저장소로부터의 칼슘 동원임을 확인하였다.

그림 2. ATP 농도에 따른 세포 내 칼슘이온농도 변화. 그림 A는 형광물질인



fura-2/AM을 세포 내로 부하한 후 (5  $\mu$ M) ATP를 각 농도 별로 60초간 투여 하였을 때 세포 내 칼슘이온농도의 변화를 기록한 것이다. ATP 투여 농도에 따른 세포 내 최고 형광값의 변화양상은 그림 B와 같다.



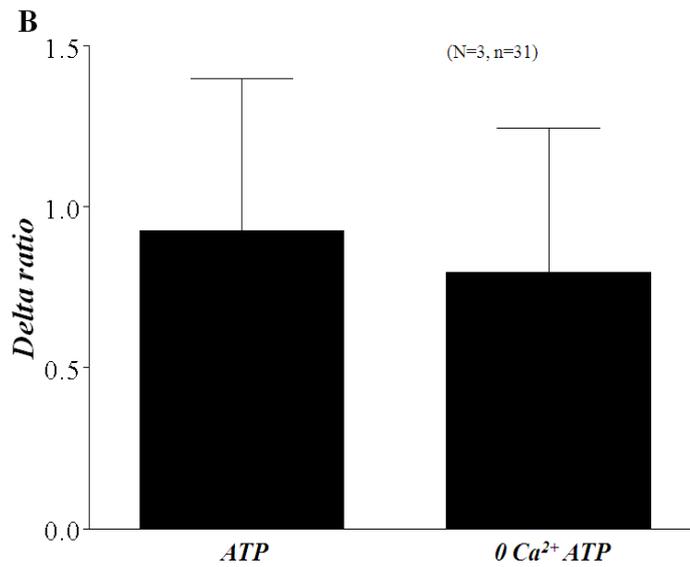
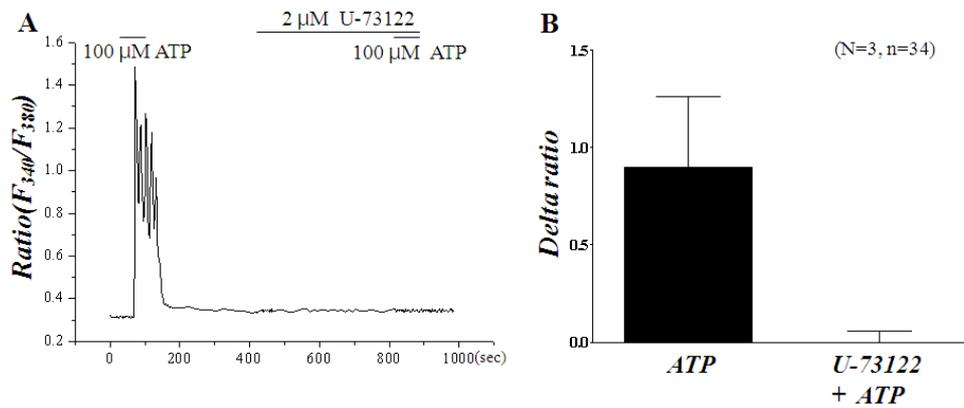


그림 3. 세포 외 칼슘이 ATP에 의한 세포 내 칼슘이온농도 변화에 미치는 효과. 세포 외 칼슘을 제거한 0 Ca<sup>2+</sup> 관류액을 5분간 전처리한 후 ATP에 의한 세포 내 칼슘이온농도의 변화를 관찰하였다 (A). 실험결과 0 Ca<sup>2+</sup> 조건에서 ATP를 투여하였을 때 대조군과 유의한 차이가 없었다 (B).



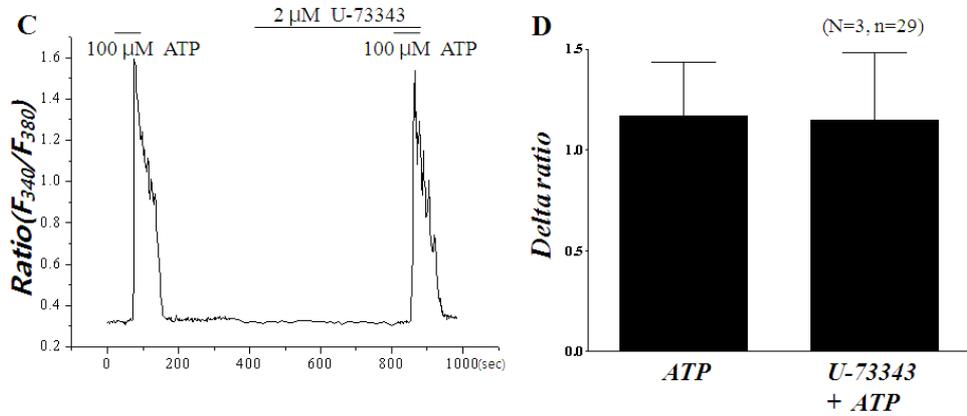
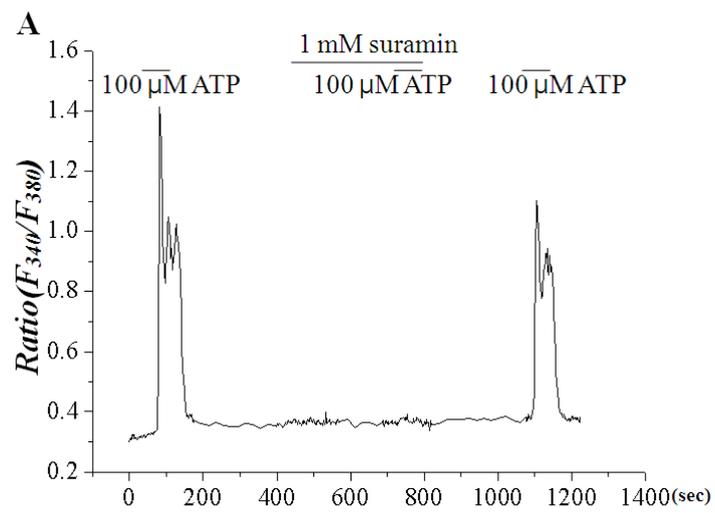


그림 4. U-73122가 ATP에 의한 세포 내 칼슘이온농도 변화에 미치는 효과. PLC 억제제인 U-73122 2  $\mu$ M을 5분 동안 전처리한 경우 ATP에 의한 세포 내 칼슘이온 증가가 완전히 봉쇄되었으나 (A, B), 구조적 유사체이며, PLC 억제 효과가 없는 U-73343 2  $\mu$ M은 전혀 억제 효과가 없었다 (C, D).

### 3.2. 퓨린성 수용체 길항제에 의한 세포 내 칼슘이온농도 변화

ATP에 의한 세포 내 칼슘이온의 증가가 P2Y 수용체를 매개하는지 확인하기 위해, P2Y 수용체 비선택적인 길항제인 suramin (1 mM)을 사용하여  $[Ca^{2+}]_i$ 을 관찰하였다. ATP에 의한 세포 내 칼슘반응은, suramin을 전처리 후에는 대조군과 비교하여 대부분 억제되었다 ( $92.23 \pm 4.9\%$ )(그림 5).



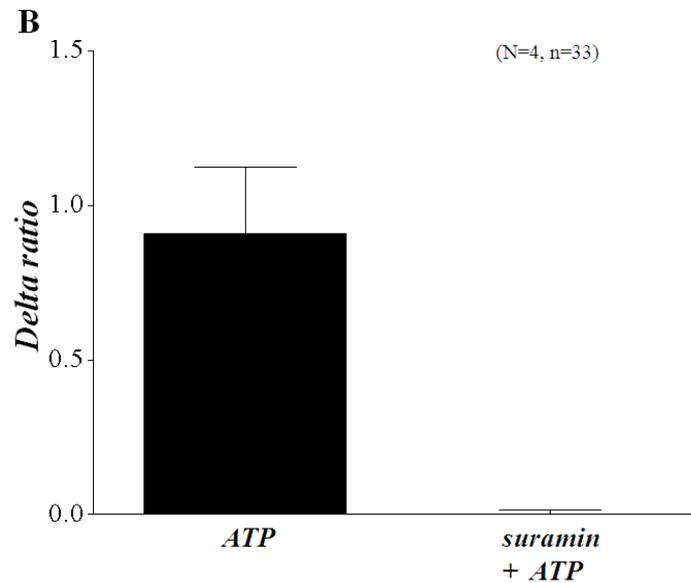


그림 5. 비선택적 길항제인 **suramin**이 세포 내 칼슘이온농도 변화에 미치는 효과. Suramin을 5분간 전처치한 후 ATP에 의한 세포 내 칼슘이온농도의 변화를 관찰하였다. 그 결과 세포 내 칼슘반응은 대조군의 ATP에 의한 세포 내 칼슘반응 최고값의 90% 이상 감소되어 suramin에 의해 대부분 억제됨을 확인할 수 있었다.

### 3.3. ATP에 의한 세포 내 cAMP 농도 변화

P2Y 수용체에 의한 세포 내 cAMP 농도 변화를 확인하기 위해 cAMP kit를 이용하여 ATP 처리 후 cAMP의 변화를 관찰하였다. 1 mM ATP에 의해서 세포 내 cAMP가 증가되었는데, 시간에 따라 점차 증가되었으며, 약 30분 이후에는 비교적 일정한 값을 보여 1시간 처리 후 세포 내 cAMP는 ATP 투여 전 2.12 pmol/ml에서 투여 후 17.42 pmol/ml로 크게 증가하였다 (그림 6).

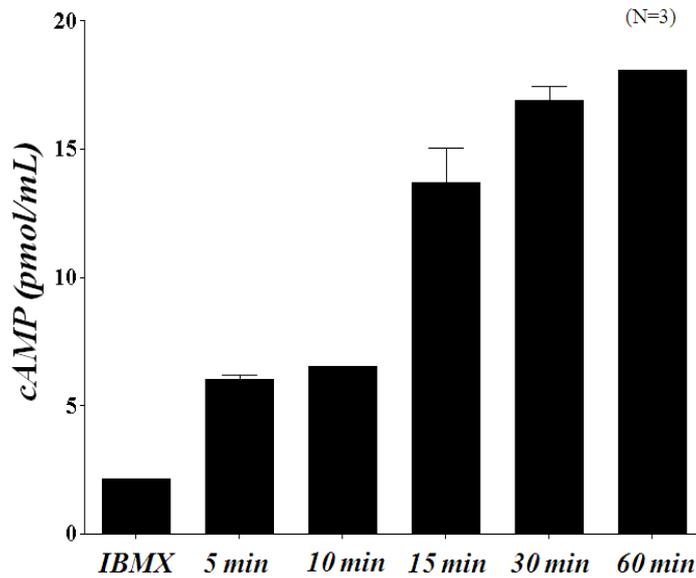


그림 6. ATP에 의한 세포 내 cAMP 농도 변화. 각 시간 별로 1 mM ATP를 처리하였을 때 세포 내 cAMP 농도 변화를 기록한 것이다. ATP 처리 시간에 따라 cAMP의 농도가 점차 증가하는 것을 알 수 있었다.

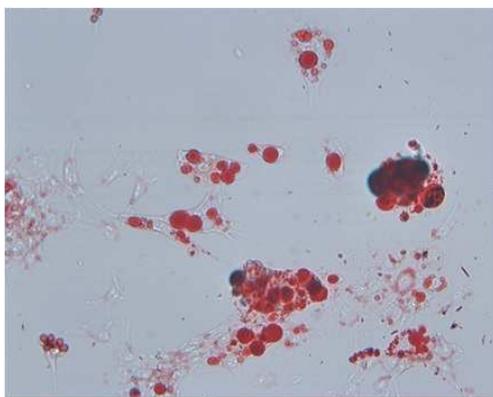
### 3.4. 분화 유도에 의한 Oil-Red-O 염색

전구지방세포에서 지방세포로 분화 유도했을 때, 분화 정도를 확인하기 위한 방법으로 분화가 된 지방세포에 Oil-Red-O 시료를 이용하여 지방세포를 염색하였다. MDI 시료를 처리하는 순간부터 분화가 유도되고 insulin을 2회 처리하게 되면 작은 지방방울이 형성되었다 (그림 7).

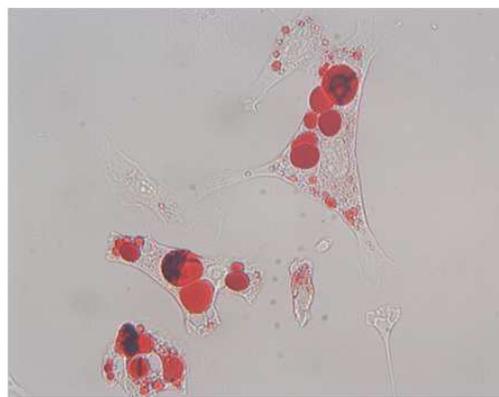
### 3.5. 역전사 연쇄 증합반응 방법을 이용한 분화유전자의 분자 생물학적 규명

적절한 분화유도 확인을 위하여 분화과정에서 발현되는 특정 유전자 adipose

protein 2 (aP2), L23108 (CD36),  $G_0/G_1$  switch gene ( $G_0/G_1$ ) 의 분포 정도를 비교하였다. 3T3-L1 세포로부터 RNA를 분리한 다음 특정 유전자들의 primer를 이용하여 역전사 연쇄 중합반응을 실시하였다. 그림 9에서 나타난 바와 같이 전구지방세포 mRNA 상태에서는 aP2와 CD36이 약하게 발현되어 있었으나 지방세포 mRNA 상태에서는 aP2와 CD36이 강하게 뚜렷이 발현되어 있었으며, 특히 전구지방세포에서 없었던  $G_0/G_1$ 가 관찰되었다 (그림 8).



(20 X)



(40 X)

그림 7. 전구지방세포에서 지방세포로 분화 유도한 후 **Oil-Red-O** 염색. 전구지방세포를 분화 유도하여 지방세포로 만든다. 그리고 지방세포로 분화가 되었는지 확인하기 위하여 Oil-Red-O 염색을 통해 확인하였다 (20 X, 40 X는 현미경 렌즈 배율). 지방세포로 분화하면서 작은 지방방울이 생기고, 그 지방방울이 붉은색으로 가득 채워지는 것을 확인하였다.

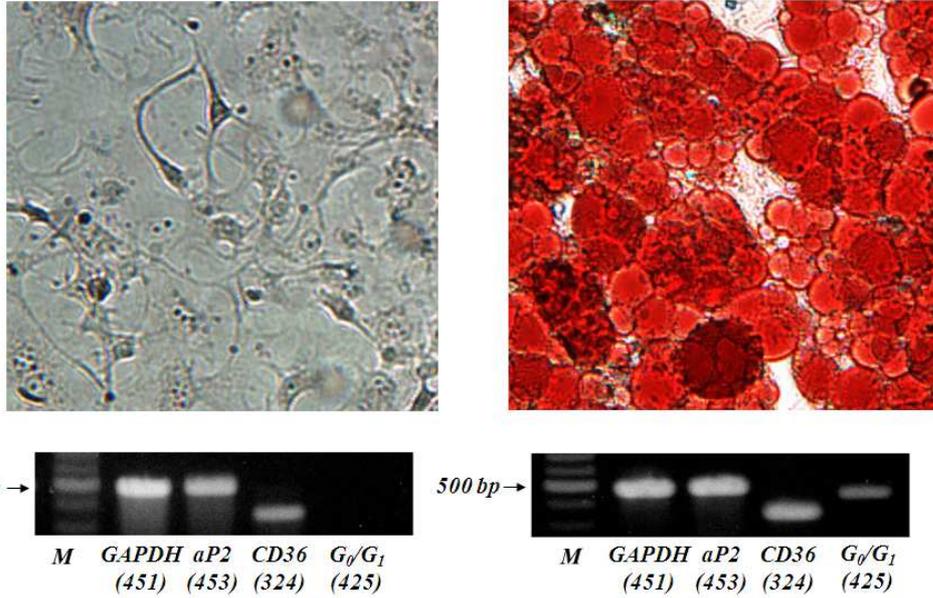


그림 8. 전구지방세포와 지방세포에서의 분화에 따른 **Oil-Red-O** 염색 반응과 분화 지표. 전구지방세포와 지방세포 상태에서 분화 정도를 확인하기 위해 두 상태의 세포에서 RNA를 분리한 다음 분화 유도 특정 유전자에 선택적인 primer를 이용하여 역전사 연쇄 증합반응을 실시하였다 (표 2. 참조). 대조군으로는 GAPDH를 사용하였으며, A는 전구지방세포 상태일 때 분화 유도 특정 유전자의 발현정도이며, B는 지방세포 상태일 때 분화 유도 특정 유전자의 발현정도이다. 전구지방세포에서 음성이던 Oil-Red-O 염색이 지방세포로 분화 후에는 강한 양성을 띠게 된다.

### 3.6. 분화 전후 P2Y 수용체 및 IP<sub>3</sub> 수용체 아형의 발현 변화

#### 3.6.1. P2Y 퓨린성 수용체

약물학적 방법을 통해 전구지방세포에서 세포 내 신호전달 기전이 주로 P2Y 퓨린성 수용체에 의해 이루어지고 있음을 확인한 후, 3T3-L1 세포막에 발현되어 있는 P2Y 수용체 아형을 규명하고자 하였다. 전구지방세포로부터 RNA를 분리한 다음, 특정 아형에 선택적인 primer를 이용하여 실시간 역전사 연쇄 중합반응을 실시하였다. 그림 9에서 나타난 바와 같이 P2Y<sub>2</sub>:P2Y<sub>5</sub>:P2Y<sub>6</sub>=3.13:38.97:1 크기로 수용체가 발현되어 있음을 알 수 있었다.

한편 전구지방세포로부터 지방세포로 분화를 유도한 뒤, 같은 실험을 반복하여, 분화 전·후를 비교하였는데, 그 결과는 P2Y<sub>2</sub>:P2Y<sub>5</sub>:P2Y<sub>6</sub>=5.78:8.57:5.74 이었다.

#### 3.6.2. IP<sub>3</sub> 수용체

3T3-L1 세포의 소포체에서 발현되는 IP<sub>3</sub> 수용체 아형을 확인하기 위해 전구지방세포와 지방세포로부터 RNA를 분리한 다음, 특정 아형에 선택적인 primer를 이용하여 실시간 역전사 연쇄 중합반응을 실시하였다. 그림 10에서 나타난 바와 같이 상대적인 발현양은 IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>, IP<sub>3</sub>R<sub>1</sub>, 그리고 IP<sub>3</sub>R<sub>2</sub> 순이었으며, 특히 IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>의 경우 IP<sub>3</sub>R<sub>1</sub>의 약 5.92배로 그 발현양이 가장 컸다. 한편, 지방세포로의 분화 이후 IP<sub>3</sub> 수용체의 상대적 발현 또한 크게 달라졌는데, 주목할 만한 것은, 분화 전 가장 발현량이 높던 IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>가 거의 모두 사라졌다.

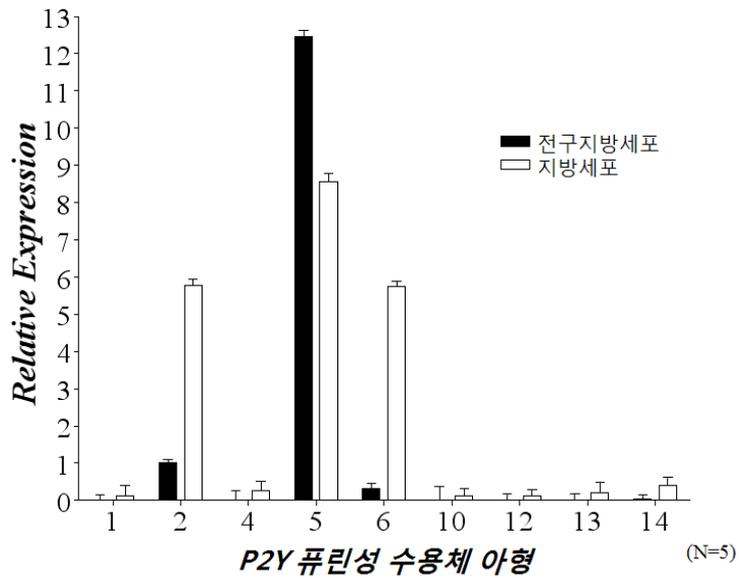


그림 9. 전구지방세포와 지방세포에서의 P2Y 퓨린성 수용체의 분자생물학적 규명. 전구지방세포와 지방세포에서 RNA를 분리한 다음 실시간 역전사 연쇄 증합반응을 실시한 결과 (표 3. 참조), P2Y<sub>5</sub> 수용체가 가장 많이 발현되었으며, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub> 수용체가 발현되어있음을 확인하였다. 대조군으로 GAPDH를 사용하였으며, 상대적 발현량은 전구지방세포 P2Y<sub>2</sub>를 '1'로 기준을 두고 표현하였다.

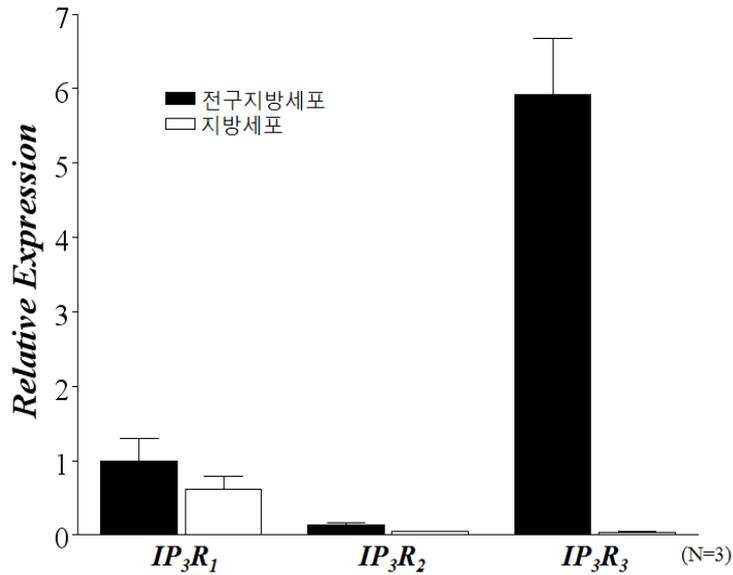


그림 10. 전구지방세포와 지방세포에서의  $IP_3$  수용체의 분자생물학적 규명. 전구지방세포와 지방세포에서 RNA를 분리한 다음 실시간 역전사 연쇄 중합반응을 실시한 결과 (표 3. 참조) 전구지방세포에서는  $IP_3R_3$  수용체가 가장 많이 발현된 반면에 지방세포에서는  $IP_3R_3$  수용체가 발현되지 않았음을 확인하였다. 대조군으로 GAPDH를 사용하였으며, 상대적 발현량은 전구지방세포  $IP_3R_1$ 를 '1'로 기준을 두고 표현하였다.

## 제 4장 고찰

본 연구에서는 세포 내 칼슘이온의 측정, cAMP 정량, 분화유도, 그리고 몇몇 분자생물학적 기법을 활용하여 전구지방세포인 3T3-L1 세포에 발현된 P2Y 수용체의 아형 확인하고 그 특성을 규명하는 것을 목적으로 하였다.

세포 내 칼슘신호전달과 관련하여 P2Y 수용체의 특징은 세포 외부의 칼슘이온과는 무관하게, 주로 G-단백 ( $G_{q/11}$ )을 매개로 세포 내 칼슘이온 저장소로부터 칼슘이온을 동원하는 것이다 (Janssens 등, 1997; Ralevic 및 Burnstock, 1998; Fries 등, 2004). 3T3-L1 세포에 대한 세포 외액의 ATP 노출은 일시적인 세포 내 칼슘이온의 증가를 나타내었는데, 이와 같은 반응은 세포 외액의 칼슘이온에 무관하게 나타났으며, 비선택적인 퓨린 수용체 길항제인 suramin에 의해 대부분 억제되었다. P2Y 퓨린성 수용체 중 대표적으로 P2Y<sub>1</sub>, 2, 4, 6은 주로 PLC 경로를 통한 IP<sub>3</sub>의 생성에 의해 칼슘조절에 관여하는데, 본 실험의 결과에서는 P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>5</sub> 및 P2Y<sub>6</sub>가 검색되었으며, 그중 P2Y<sub>5</sub>의 발현이 상대적으로 가장 높았다. 한편, ATP에 의한 세포 내 칼슘이온 증가는 농도 의존적이었으며, PLC 억제제인 U-73122에 의해 선택적으로 그 효과가 봉쇄되는 것으로 보아, 세포 내 칼슘이온의 증가는 전적으로 PLC 의존적인 경로를 통해 이루어짐을 알 수 있었다. PLC 활성화 이후의 칼슘신호전달기전은 대표적으로 IP<sub>3</sub> 수용체가 관여함으로 IP<sub>3</sub> 수용체 아형의 발현 분포를 확인하여 보았는데, 주로 IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>가 가장 많았으며, 일부 IP<sub>3</sub>R<sub>1</sub>가 일부 발현되었으나, 상대적으로 IP<sub>3</sub>R<sub>2</sub>은 미미하였다. 이상의 결과는 ATP에 의한 3T3-L1 세포에서의 칼슘증가는 대부분 PLC 활성화를 경유하여 IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>를 통한 세포내 ER로부터의 칼슘동원에 기인함을 의미한다.

전구지방세포에 발현된 것으로 확인된 P2Y<sub>2</sub>, 5, 6 아형의 퓨린성 수용체들은 대부분 인간을 비롯하여 포유동물 조직에서 널리 분포하며 기능적으로 활성화되어 있는 아형들이다 (Ralevic 및 Burnstock, 1998; Sak 및 Webb, 2002; Abbracchio 등, 2003; Fries 등, 2004; Pasternack 등, 2008). 결과에 나타난 바와 같이 3T3-L1 세포에서 P2Y<sub>5</sub> 수용체의 발현이 가장 두드러진다는 매우 주목할 만한 사실이다. P2Y<sub>5</sub> 수용체는 현재 인간과 마우스 두 종에서 유전자가 클로닝되어 있으며, G-단백 ( $G_s$  혹은  $G_i/o$ )과 연관이 있다는 몇몇 보고 이외는 특이 수용체 효현제나 봉쇄제가 알려져 있지 않고 있으며, 생리적 혹은 병태 생리적 기능에 대해서는 거의 알려진

바가 없다 (Janssens 등, 1997; Ralevic 및 Burnstock, 1998; sak 및 Webb, 2002; Abbracchio 등, 2003; Aoki 등, 2008). 특히 P2Y<sub>5</sub>를 경유한 세포 내 칼슘신호 전달 과정과 관련하여 PLC-IP<sub>3</sub> 경로에 대해서는 보고된 바가 없으며, cAMP 경로와의 가능성에 대해서도 그 알려진 바가 매우 적었다. 본 실험에서 확인한 ATP에 의한 세포 내 칼슘이온 증가에는 크게 관여하지 않을 것으로 추측되나, 선택적인 효현제나 봉쇄제의 부재로 현재로서는 그 가능성을 완전히 배제할 수 없다. siRNA 혹은 과발현 기법 등을 활용하여 P2Y<sub>5</sub> 수용체의 발현을 억제시키거나, 혹은 크게 발현량을 높였을 때 세포 내 칼슘이온 농도에 미치는 효과를 측정한다면, 보다 정확한 관련성 여부를 확인 할 수 있겠다.

최근 P2Y<sub>5</sub> 수용체와 관련된 신호전달 과정과 역할에 대한 흥미로운 보고로, 인간 머리카락 손실과 관련된 유전자로 알려졌으며, cAMP 증가를 통한 증식, 분화 및 생존에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다 (Pasternack 등, 2008). 따라서 본 연구에서는 ATP를 통한 퓨린 수용체 자극 시 cAMP 농도의 변화를 초래할 수 있는지, 혹은 P2Y<sub>5</sub> 수용체가 이에 관여하는지 알아보려고 하였다. 결과에 나타내었듯이 ATP 투여 시 3T3-L1 세포 내에서 cAMP의 뚜렷한 증가를 볼 수 있었으며, 투여 시간에 따른 점진적인 변화를 관찰할 수 있었다. 다만, 이와 같은 cAMP의 증가가 P2Y<sub>5</sub> 수용체에 선택적인지의 여부는 본 실험에서는 확인할 수 없었는데, 향후 P2Y<sub>5</sub> 수용체를 knock-out 시킨 모델에서 확인해 본다면, 그 작용을 명확히 할 수 있을 것으로 사료된다.

전구지방세포는 다양한 생리적 혹은 병리적 조건하에서 분화 (differentiation), 목표지점으로 이동 (migration)되어 지방세포로 기능하게 되는데, 본 실험에서는 기존에 알려진 MDI 처리 기법을 활용하여, 분화를 유도시키고 분화 전·후의 P2Y<sub>5</sub>수용체의 아형의 변화나 작용 기전의 차이점들을 확인하고자 하였다. 우선 적절한 분화유도를 확인을 위해 두 가지를 시행하였다. 첫째, 분화유도 유전자 adipose protein 2 (aP2), L23108 (CD36), G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> switch gene (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>) (Omatsu-Kanbe, 2006)의 분포 정도를 분자생물학적 방법을 이용하여 비교하였다. 전구지방세포 상태에서는 aP2와 CD36이 약하게 발현되어 있으나 지방세포 mRNA 상태에서는 aP2와 CD36이 뚜렷이 발현되어 있었으며, 특히 전구지방세포

에서 없었던  $G_0/G_1$ 가 관찰되었다. 이로써 분화가 이루어지면서 각각의 유전자들의 발현이 많아지고 특히 완전 분화가 된 지방세포에서  $G_0/G_1$ 가 관찰됨으로써, 전구지방세포로 부터 지방세포로의 분화를 확인하였다. 둘째, 지방세포로의 분화 정도를 형태학적으로 관찰하였으며, 지방세포 내 지방과립의 선택적인 염색을 위해 Oil-Red-O 특이 염색을 시행하였으며 (Omatsu-Kanbe 등, 2006), 결과에 나타난 대로 대부분 성공적인 분화가 이루어 졌고, 그 경우 Oil-Red-O 염색에 강한 양성을 보여주었다. 이들 기준을 근거로 분화 유도 후 P2Y 수용체 아형에 대한 발현 양상의 변화를 분화유도 전과 비교해 보았는데, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>5</sub>, 그리고 P2Y<sub>6</sub> 수용체 발현에 대한 상대적인 양적인 차이를 보였으나, 질적인 면에서 큰 변화를 확인할 수는 없었다. 한편, 주목할 만한 사실 중의 하나는 IP<sub>3</sub> 수용체 아형에 대한 큰 변화였다. 지방전구세포, 즉 분화 유도 전 세포의 경우, 세 가지 IP<sub>3</sub> 수용체 아형 중 가장 상대적인 발현량이 높은 IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>가 분화 유도 후 거의 완전히 억제되어 있었다. 이와 같은 사실은 분화 유도 후 IP<sub>3</sub> 수용체를 매개로 하는 많은 G-단백 연결 수용체들의 세포 내 칼슘동원기전이 크게 기능에 관여하지 못함을 의미하며, 비록 칼슘동원에 관여하는 P2Y 수용체의 양적 및 질적 변화가 크지 않더라도, P2Y 수용체 활성화를 통한 세포 내 칼슘이온 증가의 역할이 크게 감소될 것임을 시사해 준다.

ATP는 지방조직에서 다양한 기능을 담당하고 있다 (Kim 등, 2004; Wang 등, 2007). 일련의 실험결과들로부터, 지방세포에서 퓨린성 수용체의 활성화는 포도당이동, 지방분해, 인슐린 신호과정 등에 관여하며, 세포성장, 세포조직골격의 변화, 세포막 trafficking 조절에 관여하는 것으로 보고되어 왔고, 최근에 와서는 지방전구세포에서 세포 외액의 ATP가 지방세포로의 분화조절의 transcription factor로 작용하는 것은 아니지만 지방전구세포에서 몇몇 adipogenic hormones의 민감도를 증가시킴으로서 지방조직형성과정 (adipogenesis)을 촉진시키는 것으로 보고된 바 있다 (Kim 등, 2004; Omatsu-Kanbe 등, 2006). 본 실험의 결과를 미루어 볼 때 분화유도전인 지방전구세포 상태에서는 P2Y 수용체의 활성화는 주로 PLC-IP<sub>3</sub> 경로를 통한 세포 내 칼슘이온증가에 관여하며, 분화 유도 후에는 주요 IP<sub>3</sub> 수용체인 IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> 수용체가 발현되지 않아 이를 통한 칼슘신호전달은 억제되어 있을 것으로

생각된다. 한 가지 다른 신호전달의 가능성은 분화유도 후 cAMP를 통한 조절 기능이다. 이미 성숙한 지방세포에서 cAMP를 통한 대사과정은 많이 알려져 있는데 (Bell 등, 2002; Moon 등, 2008), 이와 같은 기전은 분화 전후에 지방세포에서도 확인되었다. 다만 이미 언급한데로, P2Y<sub>5</sub> 수용체의 직접적인 관여 여부 혹은 cAMP 신호전달의 추가적인 연구결과가 뒤따라진다면, 매우 명확한 결과를 설명할 수 있을 것으로 판단된다.

이상의 결과를 유추하여 볼 때 P2Y 수용체의 활성화는 전구지방세포에서는 세포 내 칼슘이온농도를 증가시켜, 세포의 증식, 이동 및 분화를 촉진시키고, 지방세포로 충분한 분화가 이루어지고 난 후에는 세포 내 cAMP를 증가시킴으로서 지방 대사 조절에 관여하며, 지방세포의 발달과 성숙에 기여할 것으로 추측된다. 이와 같은 연구 결과는 향후 지방세포의 분화, 기능을 이해하는 중요한 자료로서 이해될 수 있으며 지방세포 생물학에서 퓨린 수용체의 역할에 관한 이해를 높이고, 앞으로 다양한 생리적 혹은 병적 환경 하에서의 역할을 설명할 수 있을 것으로 기대한다.

## 제 5장 결론

전구지방세포와 분화가 유도된 지방세포에 존재하는 퓨린성 수용체의 특성 및 그 기전의 일부를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 대부분의 지방전구세포에서 ATP 투여 시 현저한  $[Ca^{2+}]_i$  증가를 관찰할 수 있었으며, 이와 같은 변화는 세포외 칼슘과 무관하게 세포내 칼슘저장소로부터의 동원에 의해 이루어 졌다.
2. ATP에 의해 유도된 세포내 칼슘이온 증가는 전적으로 PLC의 매개 하에 이루어짐을 알 수 있었다.
3. 지방세포로의 분화과정은  $G_0/G_1$ 의 발현 유무와 세포의 형태학적 특성, 특히 Oil-red-O 특이염색으로 확인 가능하였다.
4. 3T3-L1 세포에서 P2Y<sub>2</sub>, 5, 6 아형의 퓨린성 수용체를 코딩하는 mRNA들이 확인되었으며 특히, P2Y<sub>5</sub>가 가장 많이 발현되어 있었고, 이들의 발현은 지방세포 분화 후에도 질적으로 크게 달라지지 않았다.
5. 전구지방세포에서는 IP<sub>3</sub> 수용체 아형 중 IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>가 가장 높은 발현을 보인 반면, 지방세포로 분화된 후에는 IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> 발현이 거의 없음을 확인하였다.
6. P2Y 수용체를 통한 cAMP 증가가 관찰되었고, 이와 관련된 주요 아형의 P2Y 수용체는 P2Y<sub>5</sub> 수용체일 것으로 추측하였다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 지방전구세포 혹은 분화 유도 후 지방세포에 P2Y 수용체가 작용하되, 일부는 세포내 칼슘이온 농도의 증가를 통해, 또 일부는 세포내 cAMP 농도의 증가를 매개로 기능하는 것으로 판단되며, 이와 같은 세포신호 전달을 통해 adipogenesis 과정, 혹은 성숙 지방세포에서의 세포 증식, 성숙, 분화, 이동 혹은 세포사멸과정 등에 다양하게 관여할 것으로 추측된다.

## 참고문헌

- Abbracchio MP, Burnstock G. Purinergic signaling: Pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol* 1998;78:113-145.
- Abbracchio MP, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Miras-Portugal MT, et al. Characterization of the UDP-glucose receptor(re-named here the P2Y<sub>14</sub> receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 2003;24:52-55.
- Akasu T, Hirai K, Koketsu K. Increase of acetylcholine-receptor sensitivity by adenosine triphosphate: a novel action of ATP on ACh-sensitivity. *Br J Pharmacol* 1981;74:505-507.
- Aoki J, Inoue A, Okudaira S. Two pathways for lysophosphatidic acid production. *Biophys* 2008;1781:513-518
- Baryshnikov S, Rogachevskaja O, Kolesnikov S. Calcium signaling mediated by P2Y receptors in mouse taste cells. *J Neurophysiol* 2003;90:3283-3294.
- Bell A, Gagnon A, Dods P, Papineau D, Tiberi M, Sorisky A. TSH signaling and cell survival in 3T3-L1 preadipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283:c1056-c1064.
- Burnstock G. Overview: purinergic mechanism. *Ann NY Acad Sci* 1990; 603:1-17.

- Burnstock G. Introduction: Purinergic transmission, semin, Neurosci 1996;8:171-174.
- Burnstock G. The past, present, and future of purine nucleotides as signaling molecules. Neuropharmacology 1997;36:1127-1139.
- Burnstock G, Williams M. P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;295:862-869.
- Burnstock G. Purine and Pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:1471-1483.
- Burnstock G. Purinergic signalling ; past, present and future. *Braz J Med Bio Res* 2008;S0100-879X2008005000037.
- Cantils M, Procino A, D'Armiento M, Cindolo L, Cillo C. HOX gene network is involved in the transcriptional regulation of in vivo human adipogenesis. *J Cell Physiol* 2003;194:225-236.
- Chambers JK, Macdonald LE, Sarau HM, Ames RS, Freeman K, Foley JJ, et al. A G protein-coupled receptor for UDP-glucose. *J Biol Chem* 2000;275:10767-10771.
- Charlton ME, Williams AS, Fogliano M, Sweetnam PM, Duman RS. The isolation and characterization of a novel G protein-coupled receptor regulated by immunologic challenge. *Brain Res* 1997;764:141-148.
- Chen ZP, Levy A, Lightman SL. Nucleotides as extracellular signalling

- molecules. *J Neuroendocrinol* 1995;7:83-96.
- Communi D, Govaerts C, Parmentier M, Boeynaems JM. Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 1997;272:31969-31973.
- Communi D, Gonzalez NS, Detheux M, Brezillon S, Lannoy V, Parmentier M, et al. Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *J Biol Chem* 2001;276:41479-41485.
- Dubyak GR. Knock-Out Mice Reveal Tissue-Specific Roles of P2Y Receptor Subtypes in Different Epithelia. *Mol Pharmacol* 2003;63:773-776.
- Dubyak GR, el-Moatassim C. Signal transduction via P2 purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 1993;265:C577-C606.
- Farmer SR. Transcriptional Control of Adipocyte Formation. *Cell Meta* 2006;b4:263-273.
- Fischer W, Franke H, Illes P. Evidence for the existence of P2Y1, 2, 4 receptor subtypes in HEK-293 cells: reactivation of P2Y1 receptors after repetitive agonist application. *Nau-Sch Arch Pharmacol* 2005;371:466-472.
- Fries JE, Wheeler-Schilling TH, Guenther E, Kohler K. Expression of P2Y1, P2Y2, P2Y4, and P2Y6 receptor subtypes in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:3410-3414.
- Green H, Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation

in culture. *Cell* 1974;3:127-133.

Gregoire F, Smas C, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol* 1998;78:783-809.

Harden TK, Boyer JL, Nicholas RA. P2-purinergic receptors: subtype-associated signaling responses and structure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995;35:541-79.

Hansen JB, te Riele H, Kristiansen K. Novel function of the retinoblastoma protein in fat: regulation of white versus brown adipocyte differentiation. *Cell Cycle* 2004;3(6):774-8.

Hassan M, Yazidi CE, Landriel JF, Lairon D, Phloretin enhances adipocyte differentiation and adiponectin. *Biochem Bio Res Comm* 2007;361:208-213.

Ho M , Foxall S , Higginbottom M , Donofrio DM , Liao J , Richardson PJ , Maneuf YP . Leptin-mediated inhibition of the insulin-stimulated increase in fatty acid uptake in differentiated 3T3-L1 adipocytes. *Metabol Clin Exp* 2006;55:8-12.

Ihara H, Hirukawa K, Goto S, Togari A. ATP-stimulated interleukin-6 synthesis through P2Y receptors on human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;326:329-334.

Janssens R, Boeynaems JM, Godart M, Communi D. Cloning of a human heptahelical receptor closely related to the P2Y5 receptor. *Biochem Biophys*

- Res Comm 1997;236:106-112.
- Jin JG, Kunapuli SP. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:8070-8074.
- Karamanlidis G, Karamitri A, Docherty K, Hazlerigg DG, Lomax MA. C/EBPbeta reprograms white 3T3-L1 preadipocytes to a Brown adipocyte pattern of gene expression. J Biol Chem 2007;282(34):24660-24669.
- Kim BW, Choo HJ, Lee JW, Kim JH, Ko YG. Extracellular ATP is generated by ATP synthase complex in adipocyte lipid rafts. Exp Mol Med 2004;36(5):476-85.
- Kim JW, Tang QQ, Lane MD. Effect of phosphorylation and S-S bond-induced dimerization on DNA binding and transcriptional activation by C/EBPbeta. Proc Natl Acad Sci USA 2007;104:1800-1804.
- Kügelgen IV, Wetter, A. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. Naunyn-Schmiedelberg's Arch Pharmacol 2000;362:310-323.
- Lane M, Tang QQ, Jiang MS. Role of the CCAAT Enhancer Binding Proteins(CEBPs) in Adipocyte Differentiation. Biochem Bio Res Com 1999;266:677-683.
- Lee CW, Rivera R, Gardell S, Dubin AE, Chun J. GPR92 as a new G12/13- and Gq-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5. J Bio Chem 2006;281:23589-23597.

- Lee H, Jun DJ, Suh BC, Choi BH, Lee JH, Do MS, Suh BS, Ha HJ, Kim KT. Dual Roles of P2 Purinergic Receptors in Insulin-stimulated Production and Lipolysis in Differentiated Rat White Adipocytes Leptin. *J Bio Chem* 2005;280:28556-28563.
- Lee JW, Kong ID, Chun SJ, Park KS, Lee JM. Studies on the characteristics of the purinoceptors in the uterine smooth muscle. *The New Medical Journal* 1994;37:37-43.
- Lee SC, Vielhauer NS, Leaver EV, Pappone PA. Differential regulation of Ca<sup>2+</sup> signaling and membrane trafficking by multiple P2 receptors in brown adipocytes. *J Memb Biol* 2005;207:131-142.
- Liu YC, Satoh K, Hasegawa Y. Feeding scallop shell powder induces the expression of uncoupling protein 1 (UCP1) in white adipose tissue of rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006;70(11):2733-8.
- MacDougald OA, Lane MD. Transcriptional Regulation of Gene Expression During Adipocyte Differentiation. *Annu Rev Biochem* 1995;64:345-373.
- Mechki J, Tuluc F, Bredeteau O. Signaling pathways downstream of P2 receptors in human neutrophils. *Purinergic sign* 2006;2:537-544.
- Moon HS, Lee HG, Guo DD, Kim IY. Lipolysis is stimulated by PEGylated conjugated linoleic acid through the cyclic adenosine monophosphate-independent signaling pathway in 3T3-L1 cells: Activation of MEK/ERK MAPK signaling pathway and hyper-secretion of adipo-cytokines. *J Cell Physiol* 2008;214:283-294.

Murakami M , Shiraishi A , Tabata K , Fujita N Identification of the orphan GPCR, P2Y(10) receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res* 2008;371:707-712.

Nicholas RA, Watt WC, Lazarowski ER, Li Q, Harden K. Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP-and UTP-specific receptor. *Mol Pharmacol* 1996;50:224-229.

Nicholas RA. Identification of the P2Y(12) receptor: a novel member of the P2Y family of receptors activated by extracellular nucleotides. *Mol Pharmacol* 2001;60:416-420.

Noguchi K, Ishii S, Shimizu T. Identification of P2Y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the edg family. *J Bio Chem* 2003;278:25600-25606.

Omatsu-Kanbe M, Inoue K, Fujii Y, Yamamoto T, Isono T, Fujita N, Matsuura H. Effect of ATP on preadipocyte migration and adipocyte differentiation by activating P2Y receptors in 3T3-L1 cells. *Biochem J* 2006;393:171-180.

Otto TC, Lane MD. Adipose Development: From Stem Cell to Adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2005;40:229-242.

Pasternack S, Kügelgen IV, Aboud KA, Lee YA, Rüschemdorf F. G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. *Nature Genetics* 2008:329-334.

Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 1998;50:413-492.

Pasternack SM , von Kügelgen I , Aboud KA , Lee YA ,  
Rüschendorf F , Voss K , Hillmer AM , Molderings GJ ,  
Franz T , Ramirez A , Nürnberg P , Nöthen MM ,  
Betz RC . G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are  
involved in maintenance of human hair growth. *Nat Genet* 2008;40:329-334.

Sak K, Webb TE. A retrospective of recombinant P2Y receptor subtypes and  
their pharmacology. *Arch Biochem Biophys* 2002;397:131-136.

Si Y, Palani S, Jayaraman A, Lee K. Effects of forced uncoupling protein 1  
expression in 3T3-L1 cells on mitochondrial function and lipid metabolism. *J  
Lipid Res* 2007;48(4):826-36.

Srinivas SP, Yeh JC, Ong A, Bonanno JA. Ca<sup>2+</sup> mobilization in bovine corneal  
endothelial cells by P2 purinergic receptors. *Curr Eye Res* 1998;17:994-1004.

Srinivas SP, Ong A, Goon L, Goon L, Bonanno JA. Lysosomal Ca(2+) stores in  
bovine corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2341-2350.

Tang QQ, Gronborg M, Huang H, Kim JW, Otto TC, Pandey A, Lane MD.  
Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by  
MAPK and glycogen synthase kinase3 beta is required for adipogenesis. *Proc  
Natl Acad Sci USA* 2005;102:9766-9771.

- Tang QQ, Lane MD. Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancer-binding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocyte differentiation. *Genes* 1999;13:2231-2241.
- Torres B, Zambon AC, Insel PA. P2Y11 receptors activate adenylyl cyclase and contribute to nucleotide-promoted cAMP formation in MDCK-D(1) cells: a mechanism for nucleotide-mediated autocrine-paracrine regulation. *J Biol Chem* 2002;277:7761-7765.
- Wang MH, Marrero MB, Inscho EW. P2 receptor regulation of Ca<sup>2+</sup> in cultured mouse mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292:1380-1389.
- Wang YH, Zheng HY, Qin NL, Yu SB, Liu SY. Involvement of ATP-sensitive potassium channels in proliferation and differentiation of rat preadipocytes. *Sheng Li Xue Bao* 2007;59(1):8-12.
- Zandbergen F, Mandard S, Escher P, Tan NS, Patsouris D, Jatkoe T, Rojas-Caro S, Madore S, Wahli W, Tafuri S, Müller M, Kersten S. The G0/G1 switch gene 2 is a novel PPAR target gene. *Biochem J* 2005;392:313-24.

## ABSTRACT

### **Calcium signaling mediated by P2Y receptor in 3T3-L1 preadipocyte**

Hyung Joo Lee

*Department of Medicine*

*The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor In Deok Kong)

Extracellular ATP elicits diverse physiological effects by binding to the G-protein-coupled P2Y receptors on the plasma membrane. In addition to the short-term effects of extracellular nucleotides on cell functions, there is evidence that such purinergic signalling can have long-term effects on cell proliferation, differentiation and death. The 3T3-L1 cell line derived from mouse embryo is a well-established and commonly utilized *in vitro* model for adipocytes differentiation and function. However, the distributions and roles of P2Y subtypes are still unknown in the preadipocyte. In this study we identified the distributions and roles of P2Y subtypes in preadipocyte using  $\text{Ca}^{2+}$  imaging and realtime-PCR.

ATP ( $\text{EC}_{50}=224\pm 0.06 \mu\text{M}$ ,  $n=9$ ) increased the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in a concentration-dependent manner. ATP increased  $\text{Ca}^{2+}$  in absence and/or

presence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . Suramin, non-selective P2Y blocker, largely blocked the ATP-induced  $\text{Ca}^{2+}$  response. U73122, a PLC inhibitor, completely inhibited  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization in 3T3-L1 cells. The mRNA expression by realtime-PCR of P2Y subtypes was  $\text{P2Y}_2:\text{P2Y}_5:\text{P2Y}_6=3.13:38.97:1$ . Functional P2Y receptor, particular in  $\text{P2Y}_5$  mediates an increase in intracellular cAMP at high concentration of ATP in 3T3-L1 cells. The relative expression of P2Y subtypes was markedly changed particular in differentiated adipocytes attaining a newly  $\text{G}_0/\text{G}_1$  gene.

In conclusion, we showed that  $\text{P2Y}_5$  receptor is a dominant purinergic receptor in preadipocytes, and multiple P2Y receptors could involve in differentiation and migration via regulating of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and cAMP level.

---

Key Words : preadipocyte,  $\text{Ca}^{2+}$ , cAMP,  $\text{P2Y}_5$