

Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ Coactivator-1 α 에 의한 인슐린유전자와 CXCL10 유전자의 발현 조절

경북대학교 의과대학 내과학교실¹, 경북대학교 유전공학², 계명대학교 의과대학 감염내과³

장원구^{1,2}, 이인규¹, 김은정¹, 류성렬³, 김보완¹, 김정국¹

Transcriptional Regulation of Insulin and CXCL10 Gene by Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ Coactivator-1 α

Won Gu Jang^{1,2}, In-Kyu Lee¹, Eun Jung Kim¹, Seong Yeol Ryu³, Bo-Wan Kim¹, Jung-Guk Kim¹

Department of Internal Medicine¹, Kyungpook National University School of Medicine;

Department of Genetic Engineering², Kyungpook National University; and

Department of Infectious Diseases³, Keimyung University School of Medicine

Abstract

Background: Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α), which act as a coactivator of nuclear receptors and several other transcription factors. This study was performed to evaluate the expressional regulation of insulin and inflammatory response genes by PGC-1 α .

Methods: Transient transfection assays were performed to measure the promoter activity of the insulin and CXCL10 gene. The insulin gene expression levels in INS-1 cells were determined by Northern blot analysis. Differentially expressed genes by PGC-1 α overexpression in HASMCs were confirmed using DNA microarray, real-time PCR and Northern blot analysis.

Results: Insulin promoter activity and mRNA levels were suppressed by GR and Ad-PGC-1 α . Northern blot analysis of the INS-1 cells revealed that infection with Ad-PGC-1 α markedly reduced the amount of insulin mRNA and treatment of Dex enhanced this effect in an additive manner. The PGC-1 α -specific siRNA decreased insulin expression that was induced by Dex in the GR-expressing INS-1 cells was nearly restored by this siRNA treatment. We found that when vascular smooth muscle cells (VSMCs) overexpressed PGC-1 α , immune or inflammatory response genes were highly expressed. For example, promoter activity and mRNA level of CXCL10 gene were increased by PGC-1 α .

Conclusion: PGC-1 α overexpression inhibited insulin promoter activity in INS-1 cells and enhanced expressions of inflammatory response genes (CXCL10, CXCL11, TNF α) in VSMCs. (*J Kor Diabetes Assoc* 31:326~335, 2007)

Key Words: CXCL10, GR, Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α), vascular smooth muscle cells (VSMCs)

서 론

인슐린은 표적세포의 당 대사에 중요한 역할을 하며 췌장 베타세포에서의 인슐린유전자의 발현 이상과 분비 이상은 당뇨병을 유발시키는 결정적인 요인이 된다¹⁾. 인체 인슐린유전

자는 11번 염색체(11p15.5)에 위치하고 있으며 췌장 베타세포 내에 존재하는 다양한 전사조절인자들에 의하여 전사활성이 조절된다. 현재까지 알려진 인체 인슐린유전자의 프로모터(promoter)의 활성은 주로 -340/-90 bp 부위 내에서 조절된다^{1,2)}. 인체 인슐린유전자의 전사활성을 증가시키는데 관여하는

대표적인 전사인자로는 pancreatic duodenal homeobox factor 1 (PDX-1)³⁻⁵, beta-cell E-box trans-activator 2 (BETA2)⁶, v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A (MafA)⁷⁻⁹ 등이며 이들이 결합하는 부위는 각각 A3 (-201/-196 bp), E1 (-100/-91 bp) 그리고 C1 (-126/-101 bp)이다. 하지만 반대로 인체 인슐린유전자의 프로모터 활성을 감소시키는 기작에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 다만 사람 인슐린유전자의 프로모터 부위 중 -280/-260 bp 부위가 negative regulatory element (NRE)로 보고된 것을 비롯¹⁰ 소수의 연구가 발표되어 있다.

동맥경화증은 다양한 병인으로 인하여 혈관 내피세포의 손상을 시작으로 면역과 염증반응이 유발되어 결국 혈관이 탄력을 잃어 혈관의 기능을 유지하지 못하는 증상으로 정의된다. 동맥경화증의 발병은 고콜레스테롤혈증(hypercholesterolemia), 특히 혈중 저밀도 지단백질(low-density lipoprotein, LDL) 농도의 증가와 밀접한 상관관계가 있으며^{11,12} 당뇨병, 비만, 고혈압, 고지혈증 등과 같은 대사증후군 등이 동맥경화를 촉진하는 위험인자로 알려져 있다. 이러한 위험인자들은 세포 내 산화스트레스를 증가시켜 혈관 내피세포 손상과 면역세포의 활성을 유발하고 염증과 혈관기능의 장애를 초래한다. 이것은 혈소판의 침착과 응집을 유도해서 여러 가지 염증성 사이토카인, 혈관수축물질, prostaglandin, platelet derived growth factor (PDGF) 등의 분비가 유발되고 손상 부위로 혈관 평활근세포의 이주와 증식이 일어난다^{13,14}. 이들 cytokine 중에서 분자량이 적은 단백질을 chemokine (chemotactic cytokines)으로 명명하고 있다. 이들은 주로 백혈구의 운동을 촉진하고 혈액에서 조직으로 백혈구의 이동을 조절하는 기능을 가지고 있으며 N-말단 부위의 cysteine 배열에 따라 4가지 그룹(CXC-, CC-, C-, CX₃C-)으로 나누어진다¹⁵. 현재까지 동맥경화증과 매우 밀접한 관련성이 있는 것으로 보고된 chemokine은 CX₃C (fractalkine)과 CCL2 (MCP-1)이 대표적이다^{16,17}. 그 외에도 CXCL family 중 CXCR3를 통하여 세포 내로 신호를 전달하는 CXCL9, CXCL10, CXCL11 등이 동맥경화증과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다^{18,19}.

Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 (PGC-1)은 핵수용체 peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ)에 대한 co-activator로 처음 발견되었으나²⁰, 현재는 peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α)²¹, glucocorticoid receptor (GR)²², retinoid X receptor α (RXR α)²³, estrogen receptor (ER)²⁴, liver X receptor (LXR)²⁵을 포함하는 많은 다른 핵수용체의 보조 활성인자로 알려져 있다. 인간에서 PGC-1 α 는 간, 심장, 골격근, 지방세포에서 주로 발현되고 지방세포의 분화, 산화대사, 에너지항상성, 당 대사 등에 중요한 역할을 한다.

Dexamethasone (Dex) 등의 glucocorticoid는 표적 유전

자의 프로모터상에 존재하는 GRE에 결합하거나 다른 전사인자와의 결합을 통하여 표적 유전자의 전사활성을 증가 혹은 억제시키게 된다²⁶⁻²⁸. 일반적으로 알려진 GRE의 염기서열은 5'-GGTACAnnnTGTTCT-3'이다²⁹⁻³¹. 이들은 불완전한 palindrome 서열을 형성하고 있으나, 완전한 palindrome 서열에도 결합하는 것으로 밝혀졌다³². 또한 표적유전자의 프로모터 부위에 존재하는 GRE에 따라 4가지 패턴으로 구분하고 있는데, 이 중 3가지는 표적유전자의 프로모터 활성을 증가시키는 역할을 하고 나머지 하나는 반대로 표적유전자의 전사활성을 억제 시키는 작용을 하며 negative GRE (nGRE)로 불려진다. 그리고 nGRE에 GR이 결합하는 경우에는 c-Jun이나 c-Fos 등과 상호작용을 한다고 알려져 있다³³.

당뇨병에서 인슐린유전자의 발현 조절은 매우 중요하다. 더불어 지금까지 잘 알려지지 않은 인슐린유전자의 발현 억제 기작이 실제로 당뇨병을 유발하는 기전뿐만 아니고 동반되는 합병증의 유발에도 같은 기전으로 작용한다면 이는 당뇨병 및 동반되는 합병증의 치료를 동시에 치료할 수 있는 기전을 이해하고 그와 관련된 치료표적을 찾는 데 매우 중요하다고 사료된다. 동맥경화증은 대표적인 당뇨병 합병증의 하나로써 이해되고 있는데, 당뇨병의 발병과 연관된 PGC-1 α 또한 동맥경화증의 발병과도 연관되어 있을 가능성이 크다고 사료된다. 하지만 아직까지 혈관 평활근세포에서 PGC-1 α 에 대한 연구는 거의 없는 상태이다. 따라서 본 연구에서는 전사활성보조인자인 PGC-1 α 에 의한 인슐린유전자의 발현 억제기작과 함께 혈관 평활근세포 내에서의 PGC-1 α 과발현을 통한 DNA microarray 분석을 통하여 PGC-1 α 에 의하여 조절받는 유전자의 profile을 살펴보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 세포배양

사람의 혈관 평활근세포는 경북대학교병원, 계명대학교병원의 장기 기증 본부를 통하여 기증 받은 인체 대동맥에서 혈관 평활근세포를 일차 배양하여 실험에 사용하였다. 혈관 평활근세포는 이를 20% fetal bovine serum을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's 배양액(DMEM)에서 일차 배양한다. 이 과정을 세부적으로 기술하면, 대동맥을 PBS로 5-6회 세척하고 난 후, external connective tissue와 혈관 내피세포를 제거하고 수술용 가위를 이용하여 남은 혈관 평활근세포를 약 3 mm²의 작은 조각으로 자른다. 그 후, 100 mm 세포배양접시에 5 mm 간격으로 조직을 놓은 후, 10 mM의 sodium pyruvate와 20% fetal bovine serum, 그리고 100 U/mL penicillin과 100 mg/mL streptomycin이 포함된 DMEM 배양액(4 g/L glucose)에서 세포가 자라나올 때까지 37°C 배양기(95% air와 5% CO₂)에서 배양한다. 여기서

얻은 세포는 배양액 [10 mM sodium pyruvate, 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin과 100 mg/mL streptomycin이 포함된 DMEM low glucose (1 g/L)]으로 배양하고, 조직은 새로운 배양접시에 옮겨 위의 과정을 반복한다. 총 3회에 걸쳐 세포를 자라나오게 하고 5~7번까지 계대 배양한 것을 실험에 사용하였다. 쥐의 췌장 베타세포주인 INS-1 세포는 RPMI 1640 배양액에 11.1 mM glucose, 10 mM HEPES, 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 50 μ M, β -mercaptoethanol, 100 U/mL penicillin 그리고 100 μ g/mL streptomycin을 추가하여 배양하였다. 그리고 실험에 사용한 세포는 계대번호가 22에서 27 사이의 것을 사용하였다. 인체 간세포주인 HepG2 세포는 DMEM 배양액에 10% FBS와 100 U/mL penicillin 그리고 100 μ g/mL streptomycin을 추가하여 배양하였다.

2. Transfection 및 Luciferase 활성 측정

본 연구에 사용된 두 가지 프로모터 즉, 인체 CXCL10 프로모터와 인체 인슐린유전자 프로모터 construct (phINS-362Luc (-362/+27 bp))는 각각 Dr. Richard M. Ransohoff³⁴⁾와 Dr. Kazuya Yamagata³⁵⁾에게 제공받아 실험에 사용하였다. 각 유전자의 프로모터 활성을 조사하기 위한 transfection은 실험 하루 전에 세포를 12-well에 분주 후 다음날 70~80% 정도 수준으로 차도록 준비하였다. Transfection은 Lipofectamin 2000 시약을 이용하여 수행하였고 transfection의 효율을 보장하기 위하여 0.1 μ g의 pCMV- β Gal plasmid를 co-transfection 하였다. Luciferase 활성 측정을 위하여 세포를 PBS로 두 번 세척하고 100 μ L의 reporter lysis buffer를 이용하여 세포를 분해한 후 시험관에 모았다. 4 $^{\circ}$ C, 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 후 상등액을 모아 프로모터 활성을 측정하였다. β -galactosidase 활성은 ELISA reader를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하여 luciferase 활성 수치를 보정하는데 사용하였다.

3. Realtime RT-PCR

cDNA는 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit를 이용하여 합성하였다. 반응은 12 μ L의 부피 안에 5 μ g의 total RNA, 0.2 μ g/ μ L oligo (dT)를 혼합하여 70 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 방치시킨 후, 5X reaction buffer, 10 mM dNTP, 20 U의 RNase inhibitor를 추가시켜 37 $^{\circ}$ C에 5분 동안 반응시킨다. 그리고 20 U의 M-MuLV reverse transcriptase를 추가하고 최종 부피를 20 μ L로 하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 70 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 방치시킴으로써 반응을 정지시킨다. Realtime RT-PCR은 ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington, UK)과 SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Warrington, UK)를 이용하여 수행하였다. 본 연구에 사용된

primer는 PGC-1 α 5'-CCCGATCACCATATTCCAGGT-3' (sense) and 5'-ATGTGTGCGGTGTCTGTAGTGG-3' (antisense); GAPDH: 5'-ATCTTCTTGTGCAGTGCCAGC-3' (sense) and 5'-GAAGGCAGCCCTGGTAACC-3' (antisense); TNF α : 5'-CAATTGTTTGCTTGCCTCCC-3' (sense) and 5'-CCTGGTTTGCAGTACATGCT-3' (antisense); CXCL10: 5'-AGAACCGTACGCTGTACCTGCA-3' (sense) and 5'-CGTGGACAAAATTGGCTTGC-3' (antisense); CXCL11: 5'-CCTTGGCTGTGATATTGTGTGC-3' (sense) and 5'-GCCACTTTCACTGCTTTTACCC-3' (antisense). PCR 반응은 2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK) 10 μ L, 10 pmol primer 0.4 μ L과 합성된 cDNA를 10배 희석한 것을 4 μ L를 넣고, 멸균 증류수를 첨가하여 총 20 μ L가 되게 하였다. 반응조건은 50 $^{\circ}$ C에서 2분, 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 후 95 $^{\circ}$ C에서 15초, 60 $^{\circ}$ C에서 1분씩 40회 증폭하였다. Realtime RT-PCR의 결과는 역치 주기 (CT, threshold cycle)를 얻은 다음 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 방법을 이용하여 분석하였다³⁶⁾. 증폭이 끝난 PCR 산물의 해리곡선(dissociation curve) 분석을 시행하여 증폭 산물의 융해 온도를 확인하여 유전자 증폭시 단일 산물이 증폭됨을 확인하였다.

4. Northern blot 분석

Northern blot에 사용되는 probe는 random primer labeling kit (Amersham, Arlington Heights, IL)를 이용하여 α -³²P]dCTP로 표지된 DNA를 사용한다. 먼저 DNA를 방사선 표지반응을 시킨 다음, 반응시킨 probe를 NAP-5 column (Pharmacia, Uppsala, Sweden)으로 방사선 표지된 probe만 추출한다. 그런 다음, RNA 10 μ g를 1% formaldehyde-agarose gel에 전기영동한 후, nylon membrane으로 RNA를 transfer시킨다. RNA가 transfer된 membrane은 UV cross-linker를 사용하여 RNA를 membrane에 고정하고, 이렇게 준비된 membrane은 α -³²P]dCTP로 표지된 cDNA probe가 들어있는 Express HybTM solution으로 65 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 hybridization시킨다. Hybridization이 끝나면, wash solution I (0.2X SSC, 0.2% SDS)로 42 $^{\circ}$ C에서 5분씩 2번 세척해 준 다음, wash solution II (0.2X SSC, 0.1% SDS)으로 42 $^{\circ}$ C에서 5분간 세척해준다. 세척이 끝난 membrane은 -70 $^{\circ}$ C에서 24~48시간 동안 X-ray 필름에 노출시킨다. Loading difference는 18S rRNA로 normalization시킨다.

결 과

1. PGC-1 α 에 의한 인체 인슐린유전자의 전사활성 억제

인슐린 비발현 세포주인 HepG2 세포와 인슐린 발현 세포주인 INS-1 세포에서 adenoviral PGC-1 α (Ad-PGC-1 α)

를 처리하여 luciferase 활성을 측정하였다. 그 결과 HepG2와 INS-1 세포에서 PGC-1 α 에 의하여 인슐린 프로모터 활성이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 1A). 또한 이러한 감소 현상은 dexamethasone (Dex) 처리에 의하여 더욱 감소됨을 확인하였다(Fig. 1B). 이것은 PGC-1 α 과 GR이 독립적 혹은 상호의존적으로 인슐린유전자의 발현 억제에 있어 상승효과를 가질 수 있음을 의미한다.

2. PGC-1 α 의 과발현에 의한 인슐린유전자의 발현 변화

인슐린유전자의 발현에 있어서 PGC-1 α 가 영향을 미치는

것이 endogeneous한 인슐린의 발현에도 동일한 효과를 보이는지 파악하기 위하여 adenoviral-PGC-1 α (실험군)과 Null virus (대조군)를 INS-1 세포에 처리하고 인슐린유전자의 발현 수준을 조사하였다. 또한 이러한 저해 기작에 GR이 전사조절인자로써 작용하는지 파악하기 위하여 GR 발현벡터를 co-transfection하고 Dex를 처리한 결과와 비교 분석하였다(Fig. 2A, B). 그 결과 Fig. 1을 통해서 보여준 인체 인슐린유전자의 프로모터 활성도와 동일한 패턴으로 PGC-1 α 과발현에 의해 인슐린유전자의 발현이 감소하였으며, 이러한 효과는 GR을 co-transfection시키고 Dex를 처리하였을

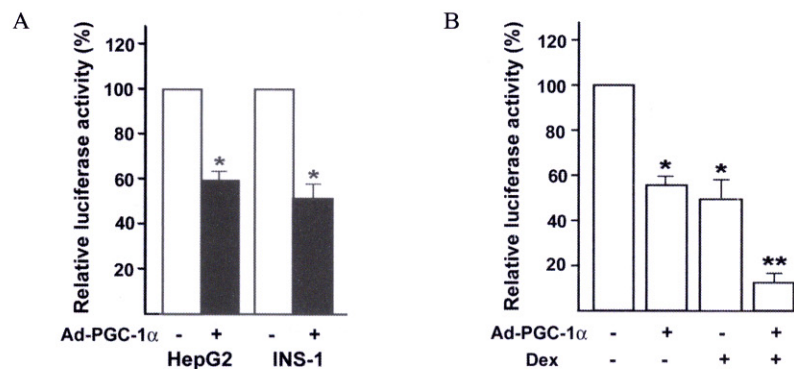


Fig. 1. Insulin gene promoter is inhibited by PGC-1 α INS-1 and HepG2 cells were infected 50 MOI of adenoviral PGC-1 α 2 h later, the cells were co-transfected with pCMV- β Gal together with 600 ng of the human insulin promoter reporter phINS-362Luc (A), plus the GR (300 ng) expression plasmids (B). 4 h later, the cells in B were incubated with 10% FBS for 12 h and then serum-starved for 6 h. Subsequently, the cells were treated with 500 nM Dex for 24 h. Luciferase activity was then assayed and the luciferase results were normalized with respect to the transfection efficiency, which was assessed by β -galactosidase assays of co-transfected pCMV- β Gal vector. The results are presented as relative luciferase activities. Values are presented as means \pm SEM of 3 independent experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01 vs basal values.

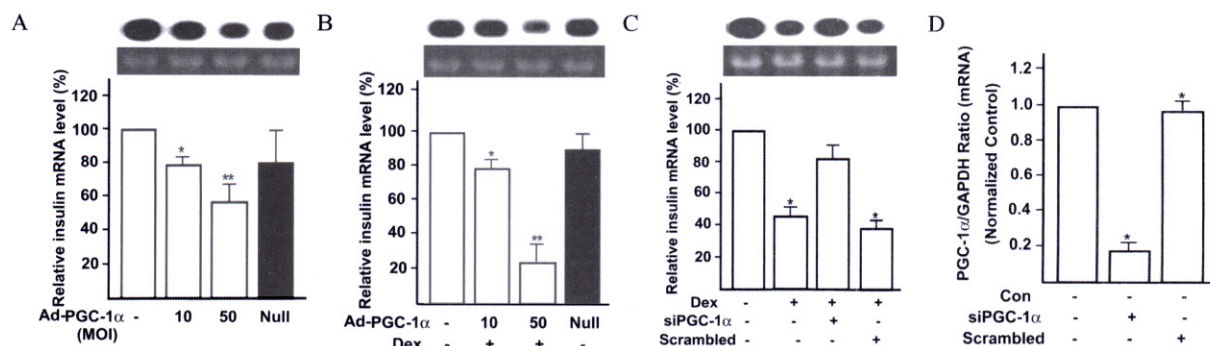


Fig. 2. Effect of the GR and PGC-1 α on the insulin gene expression in INS-1 cell. INS-1 cells were cultured with 11.1 mM glucose and co-transfected GR expression vector and then treated for 24 h with 0, 10 or 50 MOI of adenoviral PGC-1 α with (B) or without (A) Dex. Alternatively, the INS-1 cells were transfected with siRNA specific for PGC-1 α and then treated with Dex (C). As a negative control, the cells were transfected with non-specific (scrambled) siRNA (C). In (D), we evaluated the effect of the siRNAs on endogenous PGC-1 α expression using realtime RT-PCR. In A-C cases, the total RNAs of the cell lysates were subjected to Northern blot analysis (10 μ g per lane) to evaluate the expression of the insulin and RNA quantity was normalized by 18S rRNA. Fig. D, The expression levels of PGC-1 α were quantified relative to GAPDH expression. The values shown are means \pm SEM of three independent experiments. * P < 0.05 and ** P < 0.01 vs basal values.

때 인슐린유전자의 발현이 더욱 감소하는 것을 확인하였다. 다음으로 이러한 인슐린유전자의 발현 감소가 PGC-1 α 를 통한다는 것을 증명하기 위하여 PGC-1 α siRNA를 이용하여 endogenous한 PGC-1 α 의 발현을 저해 시킨 후, 인슐린유전자의 발현 감소 효과가 사라지는 것을 확인하였다(Fig. 2C, D). 이상의 결과는 인슐린유전자의 발현 조절에서 GR과 PGC-1 α 가 매우 중요한 인자라는 사실을 확인할 수 있었다.

3. 동맥경화증과 PGC-1 α

동맥경화증의 진행에 중요한 역할을 하는 혈관 평활근세포를 이용하여 PGC-1 α 가 동맥경화증과 상관관계가 있는지를 유전자의 발현 수준에서 검증하고자 하였다. 이를 위하여 PGC-1 α 과발현 조건과 동맥경화증을 유도할 수 있는 조건에서 DNA microarray를 수행하여 이들의 유전자 발현 조절 패턴을 분석하고자 하였다.

1) 혈관 평활근세포에서 PGC-1 α 과발현에 의한 유전자 발현 패턴 분석

현재까지 PGC-1 α 의 기능이 잘 알려져 있지 않았던 혈관 평활근세포를 이용하여 PGC-1 α 에 의하여 조절받는 유전자들의 분석함으로써 동맥경화증에서 PGC-1 α 의 역할을 분석하고자 하였다. adenoviral PGC-1 α 를 100 MOI 처리하여 24시간 후에 RNA를 분리하여 DNA microarray를 이용하여 분석한 후, 3배 이상의 발현의 차이를 보이는 유전자 중 면역과 염증반응에 관련된 유전자들을 정리 하였다(Table 1). PGC-1 α 에 의하여 발현이 크게 증가하는 유전자의 대부분은 면역과 염증반응과 관련된 것을 볼 수 있다. 이 중 CXCL10, CXCL11 및 TNFSF10 유전자는 크게 발현이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이를 유전자를 realtime RT-PCR 방법을 통하여 다시 한 번 분석하여 DNA microarray 결과를 재검증 하였다(Fig. 3).

2) PGC-1 α 에 의한 CXCL10 유전자의 발현 변화

PGC-1 α 에 의하여 발현의 차이를 보이는 유전자 중

Table 1. Regulatory gene profiles related immune of inflammatory response pathway by PGC-1 α overexpression in VSMCs

Pathway	Gene	Accession No.	Fold
immune or inflammatory response	TNF (ligand) superfamily, member 13b	AF134715	7.42
	TNF (ligand) superfamily, member 10	NM_003810	14.7
	toll-like receptor 3	NM_003265	7.96
	interferon, alpha-inducible protein 27	NM_005532	3.47
	interferon-induced protein 35	BC001356	4.19
	bone marrow stromal cell antigen 2	NM_004335	6.38
	CD274 antigen	AF233516	8.4
	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	BE888744	3.3
	apolipoprotein L, 3	NM_014349	4.84
	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	U59286.1	13.6
	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	NM_001565	8.99

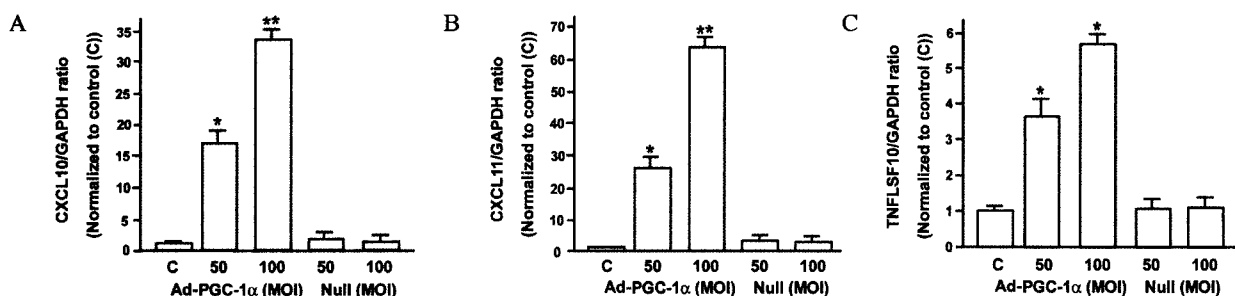


Fig. 3. Expression levels of TNFSF10, CXCL10 and CXCL11 gene by PGC-1 α overexpression in VSMCs. VSMCs were treated 50 or 100 MOI of ad-PGC-1 α or Null virus for 24 h, after which their total RNAs were harvested and subjected to realtime RT-PCR to determine TNFSF10 (A), CXCL10 (B) and CXCL11 (C) expression. The expression levels were quantified relative to GAPDH expression. The data (n = 9) are expressed as means. The TNFSF10/GAPDH, CXCL10/GAPDH and CXCL11/GAPDH values were normalized relative to the control (C). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared to the control.

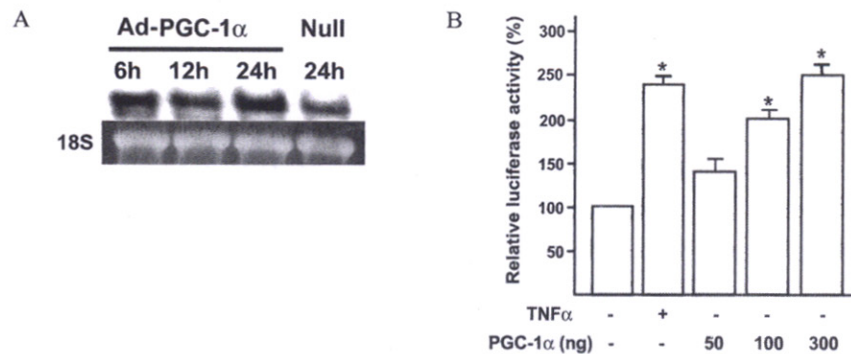


Fig. 4. Messenger RNA level and promoter activity are increased by PGC-1 α overexpression in VSMCs. A, Vascular smooth muscle cells (VSMCs) were treated with 100 MOI of adenoviral PGC-1 α for 6, 12 or 24 h. The total RNAs of the cell lysates were subjected to Northern blot analysis (10 μ g per lane) to evaluate the expression of the insulin and RNA quantity was normalized by 18S rRNA; B, VSMCs were co-transfected with pCMV- β Gal together with 600 ng of the CXCL10-Luc reporter, plus the PGC-1 α expression plasmids (50, 100 or 300 ng of PGC-1 α). 4 hours later, the cells were incubated with DMEM-Low medium contained 0.5% FBS for 24 h. 10 ng/mL of TNF α treatment as a positive control. Luciferase activity was then assayed and the luciferase results were normalized with respect to the transfection efficiency, which was assessed by β -galactosidase assays of co-transfected pCMV- β Gal vector. The results are presented as relative luciferase activities. Values are presented as means \pm SEM of 3 independent experiments. * $P < 0.05$ vs basal values.

CXCL10의 발현 변화에 대하여 구체적으로 살펴보았다. 먼저 DNA microarray를 통하여 확인한 결과를 Northern blot으로 분석해 본 결과, PGC-1 α 처리 후 24시간째, CXCL10의 mRNA level이 가장 높게 나타나는 것으로 나타났다 (Fig. 4A). 또한 혈관 평활근세포에서 CXCL10 유전자의 프로모터 construct를 이용하여 transient transfection을 실시하였다. 그 결과 PGC-1 α 농도에 의존적으로 CXCL10 유전자의 프로모터 활성이 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 4B). 이것은 PGC-1 α 의 과발현이 유전자의 전사활성을 증가시킴으로써 CXCL10 유전자의 발현을 증가시킴을 의미한다. 그리고 CXCL 10 유전자의 발현의 증가는 혈관 평활근세포의 이주 및 증식을 증가시켜 동맥경화증의 유도에 간접적으로 영향을 미치는 것으로 사료된다.

고 찰

현재까지 밝혀진 대표적인 인슐린유전자의 발현 조절인자들은 췌장 베타세포에 주로 존재하는 PDX-1 및 BETA2/NeuroD, MafA 등이다^{1-3,5,6,8,9}). 하지만 인슐린의 발현을 저해하는 기작에 대한 연구는 소수에 불과하다. 대표적으로는 forskolin이 cAMP를 증가시켜서 인슐린의 발현을 저해하는 것³⁷), suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3)에 의한 인슐린의 발현 감소가 보고되어 있다³⁸). 또한 Glucocorticoid가 췌장 베타세포에서 인슐린의 발현 및 분비를 감소시킬 수 있다고 보고되어 있다³⁹⁻⁴²). 일반적으로 glucocorticoid는 핵수용체의 일종인 glucocorticoid

receptor (GR)을 통하여 표적유전자의 전사활성을 조절하게 되며 GR은 표적유전자의 프로모터에 존재하는 GR 특이적인 cis-acting element 즉, glucocorticoid response element (GRE)에 결합함으로써 chromatin remodeling이나 다른 전사인자들과의 상호작용을 통하여 전사활성을 조절하게 된다^{43,44}). 대부분 GR과 GRE의 결합은 표적유전자의 전사활성을 증가시키지만, 반대로 감소시키는 경우도 있다. 그것을 negative GRE (nGRE)라고 하는데 일반적으로 알려진 GRE 염기서열과 비슷한 형태를 띠고 있다⁴⁵). GR은 PGC-1 α 와 단백질 수준에서 상호결합하며 이러한 결합은 GR의 기능을 증가시킨다고 하였다²²). 하지만 인슐린유전자에 대한 연구결과는 전무한 상태이므로 본 연구를 통하여 PGC-1 α 가 인슐린의 프로모터 활성을 억제하는 기작을 살펴보고자 하였다. 본 연구에서는 PGC-1 α 를 과발현 시킨 경우에 인슐린 발현이 억제됨을 확인하였다. 그리고 인슐린 비발현 세포주인 HepG2에서도 동일한 효과를 보이는 것으로 보아서 실제로 인슐린의 전사억제 기작은 간세포에서도 유사하게 작동할 수 있음을 알 수 있다. 이 후는 인슐린 발현 세포주인 INS-1 세포를 이용하여 인슐린유전자의 프로모터 활성조절에 GR이 관여하는지 살펴보았다. 그 결과 glucocorticoid가 GR을 통하여 인슐린의 프로모터 활성을 감소시키고 PGC-1 α 가 이러한 효과를 더욱 증가시키는 것을 확인하였다. 또한 PGC-1 α 의 siRNA를 사용하여 이러한 효과가 사라짐을 확인하였다. 이러한 결과는 인슐린유전자의 발현 조절에 PGC-1 α 및 GR이 중요한 역할을 수행함을 알 수 있다.

당뇨병은 당 대사의 장애로 인한 질환이지만 혈당의 지속

적 상승은 다양한 합병증을 야기할 수 있다. 특히 동맥경화증으로 대표되는 혈관 질환은 대표적인 당뇨합병증이다. 본 연구에서는 당 대사와 밀접한 관련성을 가진 PGC-1 α 가 혈관 세포에서는 어떻게 작용하는지 조사해 보기로 하였다. 동맥경화증의 진행에 중요하게 작용하는 혈관 평활근세포를 이용해서 PGC-1 α 유전자를 과발현 시킨 후, DNA microarray를 이용하여 발현의 차이를 보이는 유전자를 선별하였다. 그 결과, 면역과 염증반응에 관련된 유전자의 발현이 큰 폭으로 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이것은 PGC-1 α 유전자의 발현이 동맥경화증에 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료되었다. 그 중 CXCL10, CXCL11 및 TNF α 등의 chemokine의 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었는데 이들은 CXCR3라고 불리워지는 수용체를 통하여 세포내로 신호를 전달한다. CXCR3 유전자의 발현 증가는 혈관 평활근세포의 증식과 이주를 증가시킴으로써 동맥경화증을 야기할 수 있다^{18,19}. 본 연구에서는 좀 더 구체적으로 PGC-1 α 가 CXCL10의 프로모터 활성을 증가시킬 수 있는지 조사한 결과, PGC-1 α 농도 의존적으로 프로모터 활성이 증가하는 것을 확인하였다. 일반적으로 PGC-1 α 는 다양한 핵수용체와 상호작용을 통하여 표적 유전자의 전사 활성을 조절하는 것으로 알려져 있다. 하지만 PGC-1 α 이 어떤 핵수용체와의 상호작용을 통하여 CXCL10의 전사 활성을 조절하는지에 대한 연구는 추후로 진행해야 할 사항이다. 그러나 저자들이 최근에 발표한 논문 및 혈관 내피세포의 역할을 발표한 타 연구자의 논문^{46,47}을 보면 PGC-1 α 가 동맥경화증에 미치는 영향에 대한 효과를 단정하기는 힘들다. 그러므로 추후 혈관세포에서 PGC-1 α 의 세포 내 역할 및 신호 전달 체계에 대한 자세한 연구는 지속적으로 필요하다고 사료된다.

요 약

연구배경: 인슐린의 발현 조절은 당 대사에 있어서 매우 중요하고 당뇨병의 발병과도 밀접한 연관성을 가진다. 동맥경화증은 대표적인 대사성 혈관 질환일 뿐만 아니라 대표적인 당뇨합병증이기도 하다. PGC-1 α 는 전사활성 보조인자로서 다양한 핵수용체와 결합하여 표적유전자를 조절한다. 특히, 당 대사 및 에너지 형성과 항상성에 관련된 유전자들의 발현에 보조인자 역할을 하고 있다. 본 연구에서는 PGC-1 α 에 의한 인슐린의 전사활성 조절 기작을 규명하고 혈관 평활근세포를 이용하여 PGC-1 α 가 동맥경화증과 관련된 인자들의 발현을 조절할 수 있는지 조사하였다.

방법: 쥐 배타세포주인 INS-1 세포를 이용하여 PGC-1 α 재조합 아데노바이러스를 감염시킨 후 인슐린의 프로모터 활성 및 mRNA 수준을 조사하였다. 또한 GR을 cotransfection하여 GR의 보조인자로 PGC-1 α 가 작용하여 인슐린의 전사

활성을 조절할 수 있는지 조사하였다. 혈관 평활근세포에서도 PGC-1 α 재조합 아데노바이러스를 감염시켜 과발현 시킨 후, 발현의 차이를 보이는 유전자의 패턴을 조사하였다. 그 후, 발현의 차이를 보인 몇몇 유전자를 선별하여 realtime RT-PCR 방법으로 다시 한 번 발현 변화를 확인하였으며, 특정 유전자에 대한 프로모터 활성과 mRNA 수준도 같이 조사하였다.

결과: 인슐린 비발현 세포주인 HepG2세포와 인슐린 발현 세포주인 INS-1 세포에서 PGC-1 α 과발현에 의하여 인슐린 유전자의 프로모터 활성이 감소되는 것을 확인하였으며, GR을 cotransfection한 결과 인슐린 유전자의 프로모터 활성이 더욱 감소되는 것을 확인하였다. 또한 세포 내에 존재하는 인슐린의 mRNA 수준도 PGC-1 α 와 GR에 의하여 감소하는 것을 확인하였다. 혈관 평활근세포에서 PGC-1 α 의 과발현은 면역 및 염증반응과 관련된 유전자의 발현을 증가시키는 것으로 확인되었으며, 특히 TNF α , CXCL10, CXCL11 등의 chemokine의 발현 증가가 두드러진 특징이었다. 이들 유전자들의 발현 패턴을 realtime RT-PCR을 통하여 재확인 하였으며, PGC-1 α 는 CXCL10 유전자의 프로모터활성을 증가시킴을 확인하였다.

결론: PGC-1 α 는 GR과의 상호작용을 통하여 인슐린의 전사활성을 억제하는 역할을 하며, 이것은 인체 인슐린유전자뿐만 아니라 쥐의 인슐린유전자의 경우에도 같은 경향을 보인다. 따라서 PGC-1 α 에 의한 인슐린의 발현 감소는 기아 상태 및 당뇨병 상태에서 PGC-1 α 유전자의 발현이 증가되는 기존의 보고와도 잘 들어맞는다. 혈관 평활근세포에서 PGC-1 α 에 CXCL10 등을 비롯한 chemokine유전자의 발현 증가는 PGC-1 α 가 동맥경화증과 관련이 있음을 의미한다. 하지만, 이러한 chemokine유전자의 발현 증가가 동맥경화증에서 어떤 역할을 할 것인지는 추후로 자세한 연구가 이루어져야 될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2006년도 당뇨병 연구비(설원연구비)로 지원된 과제임.

참 고 문 헌

1. Melloul D, Marshak S, Cerasi E: Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* 45:309-26, 2002
2. Whelan J, Cordle SR, Henderson E, Weil PA, Stein R: Identification of a pancreatic beta-cell insulin gene transcription factor that binds to and appears to activate cell-type-specific expression: its possible

- relationship to other cellular factors that bind to a common insulin gene sequence. *Mol Cell Biol* 10: 1564-72, 1990
3. Ohlsson H, Karlsson K, Edlund T: *IPF1*, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *EMBO J* 12:4251-59, 1993
 4. Peshavaria M, Gamer L, Henderson E, Teitelman G, Wright CV, Stein R: *XIHbox 8*, an endoderm-specific *Xenopus* homeodomain protein, is closely related to a mammalian insulin gene transcription factor. *Mol Endocrinol* 8:806-16, 1994
 5. Petersen HV, Serup P, Leonard J, Michelsen BK, Madsen OD: Transcriptional regulation of the human insulin gene is dependent on the homeodomain protein *STF1/IPF1* acting through the CT boxes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10465-69, 1994
 6. Naya FJ, Stellrecht CM, Tsai MJ: Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev* 9: 1009-19, 1995
 7. Olbrot M, Rud J, Moss LG, Sharma A: Identification of beta-cell-specific insulin gene transcription factor *RIPE3b1* as mammalian *MafA*. *Proc Nat Acad Sci USA* 99:6737-42, 2002
 8. Kataoka K, Han SI, Shioda S, Hirai M, Nishizawa M, Madsen OD: *MafA* is a glucose-regulated and pancreatic beta-cell-specific transcriptional activator for the insulin gene. *J Biol Chem* 277:49903-10, 2002
 9. Matsuoka TA, Zhao L, Artner I, Jarrett HW, Friedman D, Means A, Stein R: Members of the large *Maf* transcription family regulate insulin gene transcription in islet beta cells. *Mol Cell Biol* 23: 6049-62, 2003
 10. Boam DS, Clark AR, Docherty K: Positive and negative regulation of the human insulin gene by multiple trans-acting factors. *J Biol Chem* 265:8285-89, 1990
 11. Holme I, Solberg LA, Weissfeld L, Helgeland A, Hjermann I, Leren P, Strong JP, Williams OD: Coronary risk factors and their pathway of action through coronary raised lesions, coronary stenoses and coronary death. Multivariate statistical analysis of an autopsy series: the Oslo Study. *Am J Cardiol* 55:40-7, 1985
 12. Martin MJ, Hulley SB, Browner WS, Kuller LH, Wentworth D: Serum cholesterol, blood pressure, and mortality: implications from a cohort of 361,662 men. *Lancet* 2:933-6, 1986
 13. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801-8, 1993
 14. Coleman KR, Braden GA, Willingham MC, Sane DC: *Vitaxin*, a humanized monoclonal antibody to the vitronectin receptor (α 5 β 3), reduces neointimal hyperplasia and total vessel area after balloon injury in hypercholesterolemic rabbits. *Circ Res* 84:1268-76, 1999
 15. Rollins BJ: Chemokines. *Blood* 90:909-28, 1997
 16. Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, Nagano Y, Yoshie O, Imai T: Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:34-40, 2004
 17. Schecter AD, Berman AB, Taubman MB: Chemokine receptors in vascular smooth muscle. *Microcirculation* 10:265-72, 2003
 18. Wang X, Yue TL, Ohlstein EH, Sung CP, Feuerstein GZ: Interferon-inducible protein-10 involves vascular smooth muscle cell migration, proliferation, and inflammatory response. *J Biol Chem* 271:24286-93, 1996
 19. Brightling CE, Ammit AJ, Kaur D, Black JL, Wardlaw AJ, Hughes JM, Bradding P: The CXCL10/CXCR3 axis mediates human lung mast cell migration to asthmatic airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 171:1103-8, 2005
 20. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM: A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92:829-39, 1998
 21. Vega RB, Huss JM, Kelly DP: The coactivator PGC-1 cooperates with Peroxisome proliferator-activated receptor α in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol* 20:1868-76, 2000
 22. Knutti D, Kaul A, Kralli A: A tissue-specific coactivator of steroid receptors, identified in a functional genetic screen. *Mol Cell Biol* 20:2411-22, 2000
 23. Delerive P, Wu Y, Burris TP, Chin WW, Suen CS: PGC-1 functions as a transcriptional coactivator for the retinoid X receptors. *J Biol Chem* 277:3913-7, 2002
 24. Tcherepanova I, Puigserver P, Norris JD, Spiegelman BM, McDonnell DP: Modulation of estrogen receptor

- alpha transcriptional activity by the coactivator PGC-1. *J Biol Chem* 275:16302-8, 2000
25. Oberkofler H, Schraml E, Kremler F, Patsch W: Potentiation of liver X receptor transcriptional activity by peroxisome proliferators activated receptor coactivator-1a. *Biochem J* 371:89-96, 2003
26. Denis M, Gustafsson JA, Wikstrom AC: Interaction of the Mr=90,000 heat shock protein with the steroid-binding domain of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 263:18520-3, 1988
27. Wrange O, Okret S, Radojic M, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA: Characterization of the purified activated glucocorticoid receptor from rat liver cytosol. *J Biol Chem* 259:4534-41, 1984
28. Bresnick EH, Dalman FC, Pratt WB: Direct stoichiometric evidence that the untransformed Mr 300,000,9S, glucocorticoid receptor is a core unit derived from a larger heteromeric complex. *Biochemistry* 29:520-27, 1990
29. Scheidereit C, Geisse S, Westphal HM, Beato M: The glucocorticoid receptor binds to defined nucleotide sequences near the promoter of mouse mammary tumour virus. *Nature* 304:749-52, 1983
30. Beato M: Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56:335-43, 1989
31. Funder JW: Mineralocorticoids, glucocorticoids, receptors and response elements. *Science* 259:1132-3, 1993
32. Scott DK, Stromstedt PE, Wang JC, Granner DK: Further characterization of the glucocorticoid response unit in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. The role of the glucocorticoid receptor-binding sites. *Mol Endocrinol* 12:482-91, 1998
33. Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, Cato AC, Gebel S, Ponta H, Herrlich P: Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62:1189-204, 1990
34. Majumder S, Zhou LZ, Chaturvedi P, Babcock G, Aras S, Ransohoff RM: p48/STAT-1alpha-containing complexes play a predominant role in induction of IFN-gamma-inducible protein, 10 kDa (IP-10) by IFN-gamma alone or in synergy with TNF-alpha. *J Immunol* 161:4736-44, 1998
35. Okita K, Yang Q, Yamagata K, Hangenfeldt KA, Miyagawa J, Kajimoto Y, Nakajima H, Namba M, Wollheim CB, Hanafusa T, Matsuzawa Y: Human insulin gene is a target gene of hepatocyte nuclear factor-1alpha (HNF-1alpha) and HNF-1beta. *Biochem Biophys Res Commun* 24:566-9, 1999
36. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)}. *Methods* 25:402-8, 2001
37. Ding WQ, Dong M, Ninova D, Holicky EL, Stegall MD, Miller LJ: Forskolin suppresses insulin gene transcription in islet beta-cells through a protein kinase A-independent pathway. *Cell Signal* 15:27-33, 2003
38. Laubner K, Kieffer TJ, Lam NT, Niu X, Jakob F, Seufert J: Inhibition of preproinsulin gene expression by leptin induction of suppressor of cytokine signaling 3 in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 54:3410-17, 2005
39. Olefsky JM, Johnson J, Liu F, Jen P, Reaven GM: The effects of acute and chronic dexamethasone administration on insulin binding to isolated rat hepatocytes and adipocytes. *Metabolism* 24:517-27, 1975
40. Pierluissi J, Navas F, Ashcroft SJ: Effect of adrenal steroids on insulin release from cultured rat islets of Langerhans. *Diabetologia* 29:119-21, 1986
41. Olefsky JM, Kimmerling G: Effects of glucocorticoids on carbohydrate metabolism. *Am J Med Sci* 271:20-1, 1976
42. Schacke H, Docke WD, Asadullah K: Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther* 96:23-43, 2002
43. Fryer CJ, Nordeen SK, Archer TK: Antiprogesterins mediate differential effects on glucocorticoid receptor remodeling of chromatin structure. *J Biol Chem* 273:1175-83, 1998
44. List HJ, Lozano C, Lu J, Danielsen M, Wellstein A, Riegel AT: Comparison of chromatin remodeling and transcriptional activation of the mouse mammary tumor virus promoter by the androgen and glucocorticoid receptor. *Exp Cell Res* 250:414-22, 1999
45. Schoneveld OJ, Gaemers IC, Lamers WH: Mechanisms of glucocorticoid signaling. *Biochim Biophys Acta* 1680:114-28, 2004
46. Kim HJ, Park KG, Yoo EK, Kim YH, Kim YN, Kim HS, Kim HT, Kim YH, Park JY, Lee KU, Jang WG, Kim JG, Kim BW, Lee IK: Effects of PGC-1a on TNF-alpha induced MCP-1 and VCAM-1 expression and

NF- κ B activation in human aortic smooth muscle and endothelial cells. Antioxidants & Redox Signaling 9: 301-7, 2007

47. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W,

Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM: *Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. Cell 127: 397-408, 2006*