

## 사람에서 Wnt 신호계의 활성화에 의한 지방세포 분화 억제와 당대사 이상과의 연관성

한양대학교 의과대학 내과학교실, 외과학교실\*, 충북 보은 한양병원\*\*, 한양대학교 자연과학대 생명과학부\*\*\*

한 호 · 김희수\*\* · 권성준\* · 김철근\*\*\* · 최웅환†

### The Relation between Inhibition of Adipocyte Differentiation by Activation of Wnt Signaling and Impaired Glucose Metabolism in Human

Ho Han, Hee Sue Kim\*\*, Sung Joon Kwon\*, Chul Geun Kim\*\*\*, Woong Hwan Choi†

Department of Internal Medicine, Department of General Surgery College of Medicine\*, Hanyang University; Hanyang Hospital Boen North Chungcheong Province\*\*; and The Department of Life Science and the Research Institute of Natural Sciences College of Natural Science\*\*\*, Hanyang University

#### 요 약

**목적:** 비만은 인슐린 저항성을 유발하는 중요한 인자이지만, 한국인에서 제2형 당뇨병이 있는 65%의 환자들은 BMI 기준을 25 kg/m<sup>2</sup>로 낮추더라도 비만하지 않다. 인슐린의 표적 세포 중 하나인 지방세포는 분화할수록 지방이 축적되고 당을 흡수하는 능력이 증가한다. 인간에서 Wnt10b에 의해 매개되는 Wnt signaling의 활성화는 지방세포 전구세포의 분열과 증식을 유발하지만 분화를 억제하는 것으로 알려져 있어 연구자는 인간에서 Wnt signaling의 활성화 정도와 지방세포 분화 정도 그리고 당 대사와의 연관성을 알아보고자 하였다.

**방법:** 한양대병원 일반외과에서 선택적인 복부 수술을 시행한 21명의 환자들에서 내장 지방조직을 채취하였다. 이 환자들을 공복 혈당을 기준으로 정상군과 비정상 당 대사군 (공복혈당 장애와 제2형 당뇨병)으로 나누어 정량적 중합효소반응을 통해 Wnt10b,  $\beta$ -catenin, Cyclin D1 (G1/S 세포주기 조절자), 지방세포 분화의 전사인자와 성숙한 지방세포 특이적 유전자의 발현 정도 차이를 관찰하였다.

**결과:** 양 군 간에 내장 지방량의 차이를 보정하기 위해 V/S비 (visceral/subcutaneous fat ratio)의 중앙값인 0.85를 기준으로 나누어 정상군과 비정상 당 대사군의 유전자 발현량의 차이를 비교하였다. 높은 내장 지방량을 가진 환자들 중 비정상 당대사 군에서 PPAR $\gamma$ 에 의해 그 발현이 조절되는 지방형성에 관여하는 유전자인 aP2의 발현이 증가하였으나, 발현을 위해 PPAR $\gamma$ 뿐만이 아니라 C/EBP $\alpha$ 도 필요로 하는 인슐린 감수성을 개선하는 유전자인 adiponectin과 GLUT4의 발현은 유의하게 감소하였다. 높은 내장 지방량을 가진 환자들 중 비정상 당대사 군에서 Wnt10b와 Wnt signaling에 의해 활성화되는 Cyclin D1의 발현이 유의하게 증가하였다.

**결론:** 인간의 내장 지방세포에서 Wnt signaling의 활성화는 지방세포 형성과정에서 PPAR $\gamma$ 에 의한 C/EBP $\alpha$ 의 활성화를 선택적으로 억제함으로써 인슐린 감수성에 관여하는 adiponectin과 GLUT4의 발현을 억제하는 것으로 생각된다.

**중심단어:** Wnt 신호계, 지방세포 분화, 인슐린 감수성, Cyclin D1

## 서 론

비만은 지방 조직이 과다하게 축적된 상태로 여러 선진국에서 주요한 보건 문제이며, 최근에는 개발도상국에서도 빠르게 문제시 되고 있다.<sup>1)</sup> 지방세포 형성의 주요 과정은 지방전구세포의 분열과 이러한 세포들의 지방세포로의 분화로 구성된다.<sup>2)</sup> 미분화된 섬유모세포 모양의 지방전구세포가 성숙한 지방세포로 분화되는 과정은 지방전구세포의 분열이 정지된 상태에서 발생한다. 지방세포는 분화될수록 지방축적 능력이 증가하고, 포도당을 흡수하는 인슐린 감수성을 갖게 되며, 수많은 생물학적 활성이 있는 분자들을 발현하고 분비한다.<sup>3)</sup> 그러므로 지방세포가 분화하는데 장애가 발생하면 지방조직에서 포도당 섭취능력이 감소하게 된다.

지방세포가 분화하는 과정에서, 초기에 발생하는 변화는 섬유모세포 모양의 지방전구세포가 형태적으로 둥글어지고, C/EBP $\beta$ 와 C/EBP $\delta$ 같은 전사요소들이 일시적으로 유도되는 것이다.<sup>4,5)</sup> 이러한 초기 변화들에 뒤이어 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 가 출현하여, 지방세포의 특성을 반영하는 대부분의 모든 유전자들이 자체적으로 발현하게 한다. 이런 인자들은 서로 조화를 이루어 지방세포 형성의 전체 과정을 조율해서 성숙한 지방세포를 형성하게 된다.<sup>6)</sup>

최근의 연구에 따르면 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호계는 중간엽 전구세포의 운명을 결정하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다.<sup>7,8)</sup> 흥미롭게도, Wnt 신호계는 지방전구세포의 성장과 분열을 촉진하지만, 성숙한 지방세포로의 분화를 억제한다.<sup>9,10)</sup> 실제로, Wnt1 또는 Wnt10를 지속적으로 과잉 발현시켰을 때 3T3-L1 지방전구세포의 분화를 억제하였다.<sup>11,12)</sup> 이런 결과를 통해 지방전구세포가 지방세포로 분화하기 위해서는 Wnt 신호계가 억제되어야 한다는 사실을 유추해 볼 수 있다. PPAR $\gamma$ 와 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호계 사이에는 상호 억제 작용이 발생하여, 지방세포형성을 유도하는 자극이 없는 경우 Wnt1과 Wnt10이 Wnt의 표적이 되는 cyclin D1과 c-myc을 활성화시키고 동시에 PPAR $\gamma$ 를 억제시켜서 preadipocyte의 성장과 분열을 촉진한다. cyclin D1과 c-myc은 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 에 결합해서 이러한 효과를 용이하게 한다.<sup>13-15)</sup> troglitazone과 같은 지방세포형성을 자극하는 물질이 있을 때, PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 가 유도되고 Wnt1과 Wnt10는 감소하게 된다.

Wnt 신호계의 활성화가 지방세포 분화억제와 당대사장애 사이의 연관성을 알아보기 위해서, 저자들은 정상대당능을 가진 환자들과 당대사장애 환자들 사이에 지방세포발생에 영향을 미치는 전사인자, 지방세포 특이적 유전자, Wnt 신호계에 관여하는 유전자 그리고 G1/S 세포주기 조절자의 발현차이를 정량적 중합효소연쇄반응을 통해서 비교하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 연구대상

한양대학병원에서 선택적인 복부수술을 시행한 21명의 40세 이상의 남녀 환자들이 본 연구에 포함되었다. 감염이나 전이된 악성 종양 등 진행성 질환이 있거나, 스테로이드나 면역억제제와 같은 약물 복용력이 있는 환자, 신장이나 간 기능에 이상이 있는 환자들은 제외하였다. 환자들은 수술 전 금식하였고, 지방 조직은 수술 중 그물막 지방부위 (omental fat deposits)에서 채취하였다. 채취된 지방조직은 액체질소 속에서 재빨리 냉동시켰다. 모든 환자들은 공복 혈청 포도당 농도에 따라 정상 대당능 환자들 (n = 12)과 당대사장애 환자들 (n = 9)로 나누어 졌다. 공복혈당장애는 미국당뇨병학회 기준에 따라 환자의 공복 혈청 포도당 농도가 110 mg/dL 이상일 때 정의되었다.

### 2. 신체계측과 생화학적 지표들의 측정

키와 체중은 가벼운 옷을 입은 상태에서 측정하였다. 체질량지수 (BMI)는 체중을 키의 제곱으로 나누어 계산하였다 (kg/m<sup>2</sup>). 허리둘레는 환자가 서있는 상태에서 배꼽부위에서 호기 말에 측정하였다. 혈압은 아침에 최소한 10분 이상 휴식한 상태에서 측정하였다. 12시간 금식한 상태에서 아침에 정맥혈을 채혈하였고, 채취된 혈액은 4℃에서 20분 동안 원심 분리해서 혈청을 분리하여 검사 시행 전 영하 20℃에 보관하였다. 혈청 포도당은 hexokinase 법 (advia 1650, Bayer, USA)을 이용해 측정하였고, 혈청 콜레스테롤과 중성 지방은 효소법 (advia 1650, Bayer, USA)을 이용해 측정하였다. 고밀도 콜레스테롤은 촉매 제거법 (advia 1650, Bayer, USA)으로 측정하였고, 저밀도 콜레스테롤은 다음과 같은 계산식을 이용해 계산하였다: 총 콜레스테롤(mg/dL) - 고밀도 콜레스테롤 (mg/dL) - 중성지방 / 5.<sup>16)</sup> 유리 지방산과 공복 인슐린 농도는 각각 효소법 (ACS-ACOD method)과 RIA법 (gamma counter, Hewlett packard, USA)으로 측정하였다. 인슐린 저항성의 측정 방법인 HOMA-IR은 다음과 같은 공식으로 계산하였다: 공복 혈청 인슐린 (mU/L) × 공복 혈청 포도당 (mmol/L) / 22.5.<sup>17)</sup>

### 3. 내장 지방과 피하 지방의 측정

내장 지방과 피하 지방의 면적을 구하기 위해서, 제 4요추와 5요추 사이에서 복부 단층 촬영 (somatom sensation 16, Siemens, Germany)을 시행하였다. 환자들은 양 팔을 머리 위로 한 상태에서 똑바로 누워서 단층 촬영을 시행하였다. 총 지방 면적은 복부 스캔상 -190에서 -30사이의 Hounsfield unit을 보이는 부위를 계산하여 총 지방 면적을 측정하였다. 내장 지방면적은 복강을 둘러싸는 근육 내에 있는 부위에 선을 그어 측정하였다. 피하 지방면적은 전체

지방면적에서 내장 지방면적을 뺀 값으로 정의하였다. 복강 내 지방 축적의 상대적 지표로서 피하 지방에 대한 복강 내 내장 지방의 비 (visceral to subcutaneous ratio; V/S ratio) 를 계산하였다.

#### 4. RNA의 추출

영하 60℃의 얼려진 지방조직은 막자 사발 속에서 갈아서, 50~100 mg의 조직에 1 mL의 Trizol 용액 (Life technologies, USA)을 첨가하였다. 균일화된 지방조직은 실온에서 5분 동안 배양한 후 Trizol 용액 1 mL당 0.2 mL의 chloroform을 첨가한 후 4℃에서 15분 동안 12,000 × g로 원심 분리하였다. 상층부의 액상 부위를 새로운 튜브에 옮겨 담은 후 0.5 mL의 isopropyl alcohol을 첨가하고 실온에서 15분간 배양한 후 4℃에서 10분간 12,000 × g로 다시 원심 분리하였다. RNA는 원심 분리 후 튜브의 바닥에 겔 모양을 형성하였다.

#### 5. 정량적 중합효소 연쇄반응

내장 지방조직에서 지방세포 분화에 관여하는 전사인자 (C/EBP $\delta$ , C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$ ), 초기 지방세포 특이적 유전자 (lipoprotein lipase; LPL), 후기 지방세포 특이적 유전자 (aP2, adiponectin, and GLUT4), Wnt 신호계에 관여하는 유전자 (Wnt 10b,  $\beta$ -catenin) 그리고 G1/S 세포주기 조절자 (cyclin D1)의 발현 정도를 정량적 중합효소 연쇄반응을 이용해 측정하였다. 각각의 유전자들의 염기 서열은 Table 1과 같다. 정량적 중합효소 연쇄반응은 384-well plate에서 3회 시행하였다. 각 환자들의 추출된 RNA에 2X SYBR Green Master Mix (Qiagen) 10  $\mu$ L와 각각의 유전자들과 HPRT의 10pM pM forward and reverse primers를 0.8  $\mu$ L씩 첨가하여 각각 20  $\mu$ L 반응이 이루어졌으며 95℃에서 10분 배양 후 30초간 40 cycle을 돌린 다음 60℃에서 30초 72℃에서

30초 동안 반응을 일으켰다. 대조 유전자인 HPRT의 primer는 5'-GCTGGTGAAAAAGGACCCCA-3' (forward primer), 5'-AGCTCTACTAAGC AGAT GGC-3' (reverse primer)이다. 384-well plate에서 정량적 중합효소 연쇄반응은 각각의 유전자와 HPRT의 cDNA를 연속적으로 희석하여 (1, 1/2, 그리고 1/8) 상대적 표준 곡선을 구하였다. 정량적 중합효소연쇄반응의 cycle수는 공식에 의해 유전자의 양 (ng)으로 환산하였다. 정량적 중합효소연쇄반응은 Applied Biosystems Prism 7900 Sequence Detection System (applied biosystems)에 의해 수행되었다.

#### 6. 통계적 분석

결과 수치는 평균  $\pm$  표준 편차로 표시되었다. 자료의 분석은 SPSS 통계 프로그램 (version 12.0, SPSS Inc, Chicago, IL)을 이용해 분석하였다. 내장 지방량이 당대사 이상에 미치는 영향을 보정하기 위해서, 모든 환자들은 V/S 비의 중앙값인 0.85를 기준으로 해서 저내장지방군 (V/S ratio < 0.85) 과 고내장지방군 (V/S ratio  $\geq$  0.85)으로 분류하였다. 양 군 간의 차이는 독립 t-검정과 비모수 검정 (Mann-Whitney U test)를 이용해 평가하였다. Wnt 10b와 Cyclin D1의 연관성은 Pearson correlation analysis를 이용해 평가하였다. 양 군 간의 차이는 P값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

### 결 과

#### 1. 대상의 특성

정상 내당능 환자들 (n = 12)과 당대사장애 환자들 (n = 9) 간에 신체 계측학적 그리고 생화학적 지표를 비교하였다. 연령, 체질량 지수 (kg/m<sup>2</sup>) 그리고 허리둘레는 양 군 간에

**Table 1.** Sequences of the primer set used for quantitative real-time PCR

Primers	Foward	Reverse	Tm (°C)	Product size (bP)
C/EBP	ACTCAGCAACGACCCATAC	GCTCCTATGTCCCAAGAAAC	56	125
LPL	CCTACAAAGTCTTCCATTACC	AGTTCTCCAATATCTACCTCTG	56	195
PPAR $\gamma$	ACAGACAAATCACCATTCTGT	CCCATCTTTATTCATCAAGGAG	56	290
C/EBP $\alpha$	CCTCAGCCTTGTGTTGTAAGT	GAGGCCAGATACAAGTGTTG	56	126
aP2	GTGTCCTGGTTACATGTGCA	AACTCTCGTGGAAGTGACAC	56	116
Adiponectin	TCCTCCTCACTTCCATTCTG	GGACCAATAAGACCTGGATCTC	56	288
GLUT4	CCTCCTTCCTCATTTGGTATC	CCAAGGATGAGCATTTTCATA	56	123
Wnt10b	GGATTTCCTGGATTCCAGGG	TTGTGGGTATCAATGAAGATGG	56	233
$\beta$ -catenin	CTGATAAAGGCTACTGTTGG	CAACTATTTCTTCCATGCGG	56	195
CyclinD1	CCTCTAAGATGAAGGAGACCA	AAATGAACCTTCACATCTGTGGC	56	260

**Table 2.** Anthropometric and biochemical characteristics of the patients with NGT and impaired glucose metabolism

	NGT (n = 12)	IFG + Type 2 DM (n = 9)
Age (yrs)	56.58 ± 10.1	60.0 ± 13.7
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.6 ± 2.8	25.5 ± 3.5
WC (cm)	85.4 ± 8.1	88.8 ± 6.3
HOMA-IR	1.6 ± 0.4	2.5 ± 0.9*
Cholesterol (mg/dL)	138.8 ± 17.2	175.1 ± 75.0
HDL-cholesterol (mg/dL)	22.2 ± 3.1	26.2 ± 12.1
TG (mg/dL)	93.4 ± 28.0	123.6 ± 40.0
LDL-cholesterol (mg/dL)	97.9 ± 15.1	124.2 ± 40.0
FFA (μEq/L)	1374.2 ± 350.8	1829.9 ± 592.8*
VFA (cm <sup>2</sup> )	118.3 ± 64.9	140.4 ± 40.7
SFA (cm <sup>2</sup> )	129.3 ± 41.4	166.5 ± 60.9
V/S ratio	0.93 ± 0.4	0.98 ± 0.5

Values are the mean ± SD.

NGT, Normal glucose tolerance; IFG, Impaired fasting glucose; BMI, Body mass index; WC, Waist circumference; VFA, Visceral fat area; SFA, Subcutaneous fat area; V/S ratio, The ratio of visceral fat to subcutaneous fat area.

HOMA-IR = fasting plasma insulin (μU/mL) × fasting plasma glucose (mg/dL) / 405.

\*  $P < 0.05$ .

의미 있는 차이가 관찰되지 않았다. 내장 지방면적과 피하 지방면적은 정상 내당능 환자와 당대사장애 환자들 사이에 유의한 차이가 발견되지 않았다. 여러 생화학적 지표 중, 유리지방산과 HOMA-IR이 정상 내당능 환자에 비해 당대사장애 환자들에서 유의하게 높았다 (Table 2).

## 2. 유전자 발현의 정량적 분석

지방세포 분화, 지방축적, 인슐린 감수성, Wnt 신호계, 그리고 세포주기 조절에 관여하는 유전자의 발현 양을 동일한 내장지방 분포를 보이는 환자들끼리 비교하였다.

### 1) 지방세포 분화와 관계되는 유전자

C/EBP $\delta$ 는 동일한 정도의 내장지방 분포를 보이는 환자들에서 정상 내당능을 보이는 환자와 당대사장애 환자 사이에 내장지방조직에서 의미 있는 유전자발현의 차이가 관찰되지 않았다 (Fig. 1A).

지방세포의 형태 및 생화학적 분화과정을 활성화하는데 공동으로 관여하는 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 내장지방 조직 내의 발현 정도는 동일한 정도의 내장 지방 분포를 보이는 정상 내당능 환자와 공복혈당장애와 제2형 당뇨병 환자들에서 유의한 차이가 없었다 (Fig. 1B, 1C).

### 2) 지방세포 특이적 유전자

지단백분해효소 (lipoprotein lipase)의 mRNA 발현 정도

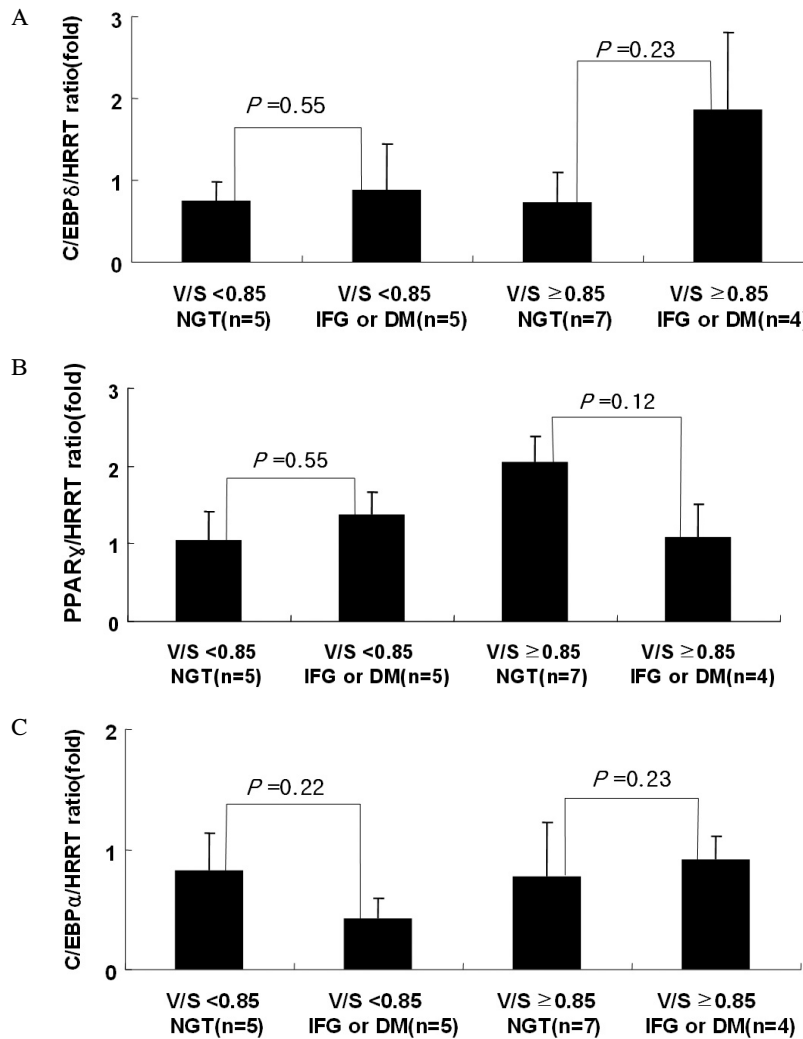
는 정상 내당능 환자와 당대사 장애 환자들 간에 유의한 차이가 관찰되지 않았다 (Fig. 2A).

지방축적에 관여하는 유전자 (aP2; 지방세포 특이적 지방산 결합 단백질)과 인슐린 감수성에 관여하는 유전자들 (adiponectin과 GLUT4)를 포함하는 3개의 후기 지방세포 특이적 유전자의 발현양 차이를 조사하였다. PPAR $\gamma$ 의 직접적인 표적 유전자로 알려진 aP2의 유전자 발현은 정상 내당능 환자와 당대사장애 환자들 사이에 유의한 차이가 없었다 (Fig. 2B). 그러나 adiponectin과 GLUT4의 발현은 높은 내장지방 분포를 보이는 (V/S ratio  $\geq 0.85$ ) 당대사장애 환자들에서 유의한 감소를 보였다 (Fig. 2C, 2D).

### 3) Wnt 신호계와 세포 주기조절에 관여하는 유전자들

Wnt10b와 Wnt 신호계의 신호전달에 관여하는  $\beta$ -catenin의 발현양을 조사하였다. Wnt10b의 유전자 발현은 높은 내장 지방을 가진 환자들 중 당대사장애 환자에서 높은 경향을 보였다 ( $P = 0.06$ ) (Fig. 3A).  $\beta$ -catenin의 발현양은 정상 내당능 환자와 당대사 장애 환자들 사이에 의미 있는 차이가 관찰되지 않았다 (Fig. 3B).

유전자 발현은 높은 내장지방분포를 보이는 환자들 중에서 정상 내당능을 환자들에 비해 당대사장애 환자들에서 의미 있게 높았다 (Fig. 3C). Wnt10b와 cyclin D1 사이에는 매우 강한 양의 상관관계가 관찰되었다 ( $r = 0.78$ ,  $P < 0.001$ ) (Fig. 4).



**Fig. 1.** Expression of genes related to adipocyte differentiation. A, RNA was extracted from human visceral adipose tissue and mRNA levels of C/EBPδ, expressed early during adipocyte differentiation together with C/EBPβ were determined with real-time quantitative PCR analysis. Real-time quantitative PCR was performed in triplicate. The data were normalized to HPRT gene. Expression of C/EBPδ in human visceral adipose tissue was not significantly different between NGT and IFG or type 2 DM with the same level of visceral adiposity. B & C, Tissue expression level of PPARγ and C/EBPα, controlling terminal adipogenic program, was not significantly different between NGT patients and patients with IFG and type 2 DM with the same level of visceral adiposity. Data are presented as the mean ± SE.

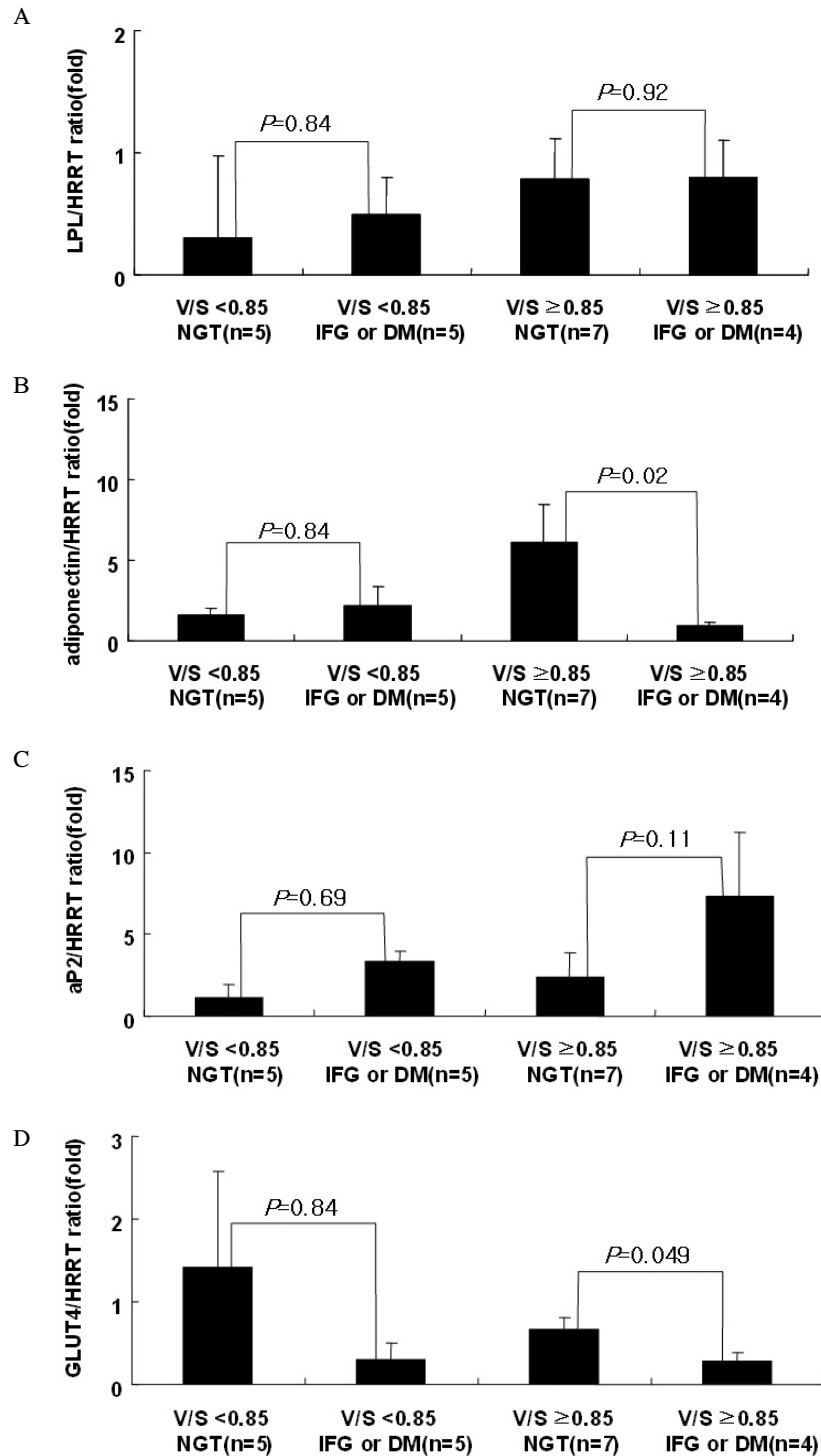
V/S ratio, Visceral to subcutaneous fat area; NGT, Normal glucose tolerance; IFG, Impaired glucose tolerance; DM, Type 2 diabetes mellitus.

## 고 찰

비만하다고 해서 반드시 제2형 당뇨병이 발생하는 것이 아니고, 상당수의 비만한 사람들이 정상 내당능을 유지할 수 있다. 비만한 사람에서 제2형 당뇨병의 발생 여부에 대한 원인은 아직까지 밝혀진 바가 별로 없다. 신체 내의 지방 분포의 차이가 중요한 역할을 한다는 증거가 많다. 복부 피하 지방 보다는 내장 지방이 인슐린 저항성과 독립적으로 연관되어 있다.<sup>18,19)</sup> 심지어, 체중 감량 또는 수술적 제거를 통해 내장 지방을 감소시켰을 때 인슐린 감수성이 증가하였

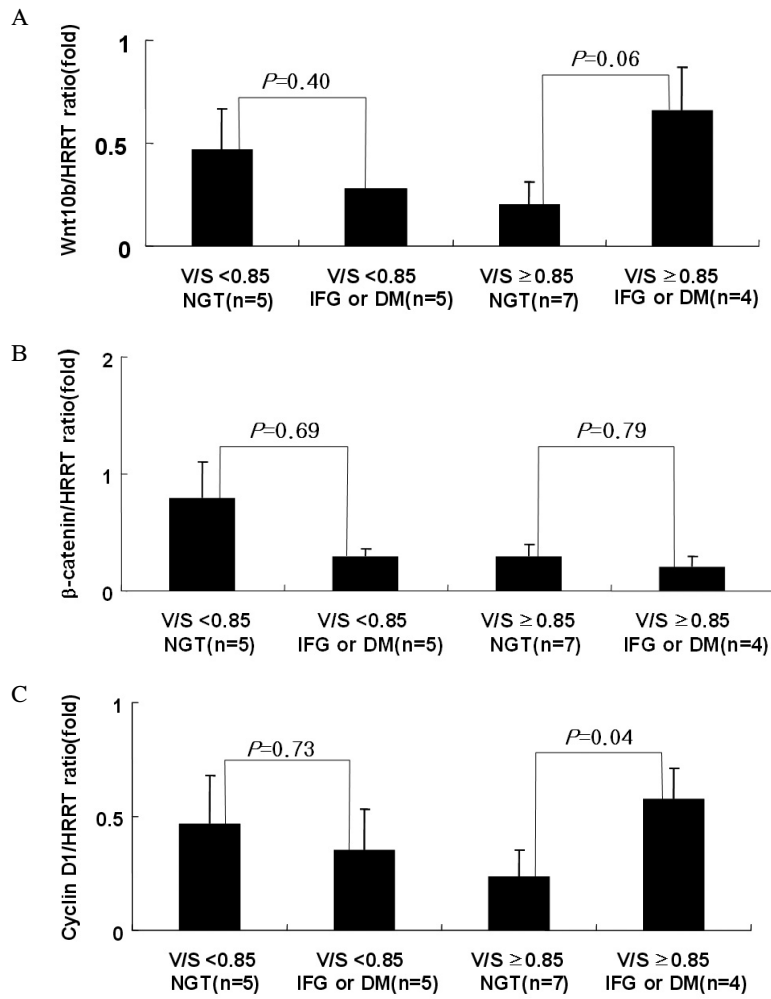
다.<sup>20,21)</sup> 하지만, 체지방의 분포만으로 비만한 사람들 사이에 제2형 당뇨병이 발생하는 경향의 차이를 설명할 수는 없다.

이 연구에서, 인슐린 감수성에 관여하고 PPARγ뿐만이 아니라 C/EBPα를 절대적으로 필요로 하는 adiponectin과 GLUT4는<sup>22)</sup> 높은 내장지방 분포를 보이는 당대사장애 환자들에서 정상 내당능을 보이는 환자들에 비해 유의하게 감소하였다. 그러나 지방세포 분화의 초기 표지자인 동시에 지방세포 축적에 중요한 역할을 하는 지단백분해효소 (lipoprotein lipase)와<sup>23)</sup> 지방축적에 관여하는 aP2의 유전자 발현의 차이는 관찰되지 않았다. 지방전구세포가 성숙한 지방세포로

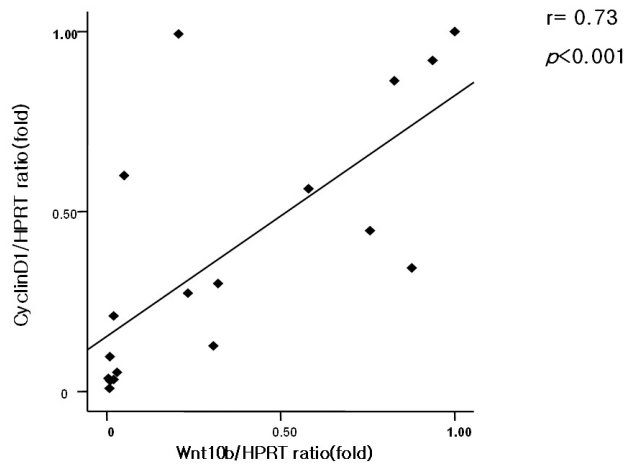


**Fig. 2.** Expression of adipocyte specific genes. A, Expression of lipoprotein lipase (LPL), playing a central role in lipid accumulation, was determined through real-time quantitative PCR analysis. Gene expression of LPL was not significantly different between NGT and IFG or type 2 DM patients with the same level of visceral adiposity. B, Expression of aP2 (adipocyte selective fatty acid binding protein), whose expression can be induced by PPAR $\gamma$  without C/EBP $\alpha$ , was not significantly different between NGT and IFG or type 2 DM patients with the same level of visceral adiposity. C & D, Expression of adiponectin and GLUT4, related to insulin sensitivity, was significantly decreased in IFG and type 2 DM patients with high visceral adiposity (V/S ratio  $\geq 0.85$ ). Data are presented as the mean  $\pm$  SE.

V/S ratio, Visceral to subcutaneous fat area; NGT, Normal glucose tolerance; IFG, Impaired glucose tolerance; DM, Type 2 diabetes mellitus.



**Fig. 3.** Expression of genes related to Wnt signaling and cell-cycle regulation. A, Expression of Wnt10b, which functions as a promoter of preadipocyte growth and proliferation, was examined through real-time quantitative PCR analysis. Although it fails to reach statistical significance, expression of Wnt10b tends to be higher in IFG or type 2 DM patients compared to NGT counterparts with high visceral adiposity. B, Expression of  $\beta$ -catenin, an effective component of Wnt signaling was not significantly different between NGT patients and patients with impaired glucose metabolism. C, Cyclin D1, a major target gene of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling was highly expressed in IFG or type 2 DM patients compared to NGT patients with high visceral adiposity. Data are presented as the mean  $\pm$  SE. V/S ratio, Visceral to subcutaneous fat area; NGT, Normal glucose tolerance; IFG, Impaired glucose tolerance; DM, Type 2 diabetes mellitus.



**Fig. 4.** Relationship between gene expression of Cyclin D1 and Wnt10b. According to pearson correlation analysis, a very strong relation between Wnt 10b and Cyclin D1 was noted.  $r = 0.73$ ,  $P < 0.001$ .

분화하면 지방축적에 관여하는 유전자의 발현이 활성화되고 인슐린 감수성이 유도된다.<sup>24)</sup> 지방세포주를 대상으로 한 연구에서 지방세포의 분화를 유발하였을 때 C/EBP $\beta$ 와 C/EBP $\delta$ 의 발현이 급격히 유도된다.<sup>25)</sup> 그 다음날에 이들 단백질은 최고치에 이르고 감소하기 시작하며, 이와 동시에 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 가 상승한다. C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 는 성숙한 지방세포의 특성을 나타내는 유전자의 변화를 유도하고 세포의 생존기간 동안 지속적으로 상승되어 있다.<sup>4,6)</sup>

여러 연구들에서 PPAR $\gamma$ 가 생체 내와 생체 외에서 지방세포 분화에 절대적으로 필요하고 PPAR $\gamma$ 가 없는 세포들에서 C/EBP $\alpha$ 의 발현이 감소되었다.<sup>26,27)</sup> 이와 마찬가지로 C/EBP $\alpha$ 가 없는 섬유모세포에서 지방세포형성 기능이 감소하고 PPAR $\gamma$ 의 발현이 감소하였다.<sup>28)</sup> 중요한 것은, PPAR $\gamma$ 를 C/EBP $\alpha$  -/- 섬유모세포에 역전사 바이러스 벡터를 이용해서 첨가시켰을 때 지방을 축적하는 능력이 회복되었다.<sup>28)</sup> 그러나 GLUT4, adiponectin, 그리고 IRS-1와 같은 여러 중요한 지방세포 형성 유전자와 단백질의 유도에 C/EBP $\alpha$ 가 필요하기 때문에, 이들 세포들은 전형적으로 인슐린에 반응하고 호르몬을 분비하는 세포가 되지 못했다.<sup>29,30)</sup> 이 연구에서, C/EBP $\alpha$ 에 의해 주로 조절되는 유전자들인 GLUT4와 adiponectin의 발현은 당대사 장애 환자들에서 정상 내당능 환자들에 비해 감소하였지만, PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 유전자 발현의 차이는 관찰되지 않았다.

지방세포 형성의 과정에서, Wnt10b 신호계는 지방전구세포에서 활성화되고 지방세포로 분화함에 따라 감소하는 것으로 알려졌다.<sup>11)</sup> Wnt 신호계의 주요 구성 요소는 다재다능한 단백질인  $\beta$ -catenin으로 여러 세포들의 성장과 분화 과정에서 여러 기능을 수행한다.<sup>31)</sup>  $\beta$ -catenin은 Lef/Tcf 전사인자들을 활성화시켜 Wnt 신호계의 신호 전달에 관여한다. Wnt 신호전달이 없는 경우, 골격 단백질, Axin, GSK3 $\beta$  그리고 APC 단백질을 포함하고 있는 세포질에서  $\beta$ -catenin이 분해된다.<sup>32)</sup> 최근의 연구에 따르면, PPAR $\gamma$ 에 의한  $\beta$ -catenin의 분해는 GSK3 $\beta$ 에 의한  $\beta$ -catenin의 serine 37 부위의 인산화에 의해서 발생하는 것으로 알려졌는데, 그 이유는 그 부위가 serine대신 alanine으로 치환된 경우에 PPAR $\gamma$ 의 작용에 저항성을 보였기 때문이다.<sup>32)</sup> PPAR $\gamma$ 에 의한 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호계의 억제가 지방전구세포의 성숙한 지방세포로의 완전한 분화에 필수적인 것으로 생각된다.

이 연구에서 높은 내장지방 분포를 보이는 당대사장애 환자들에서 정상 내당능을 보이는 환자들에 비해 Wnt10b의 발현이 높은 경향을 보였다 ( $P = 0.06$ ). Wnt10b의 유전자 발현이 증가하면 지방전구세포의 증식이 활성화되고 지방세포 분화가 억제된다. 3T3-L1 지방전구세포에서 지방세포형성 초기 단계에 Wnt 신호계를 활성화시키면 안정화된  $\beta$ -catenin의 핵 내로의 이동을 용이하게 하여 Wnt의 표적 유전자의 발현을 유도하여 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 발현을 모두

억제한다.<sup>9,11,12)</sup> Liu 등은 GSK3 $\beta$ 에 의한 분해에 저항성을 보이는  $\beta$ -catenin의 돌연변이형은 지방세포분화 말기에 유전자 발현을 억제시킴으로써 PPAR $\gamma$ 의 활성을 억제시킨다고 하였다.<sup>32)</sup>  $\beta$ -catenin은 aP2와 같은 다른 유전자에 대한 영향이 적은 반면에 adiponectin과 C/EBP $\alpha$ 를 주로 억제하였다. Park 등의 연구에 따르면, 생쥐의 섬유모세포의 분화 과정에서 aP2의 발현은 C/EBP $\alpha$ 가 없이도 유도되었으나, adiponectin의 발현은 PPAR $\gamma$ 뿐만 아니라 C/EBP $\alpha$ 를 필요로 하였다.<sup>22)</sup>

cyclin D1은  $\beta$ -catenin/LEF-1 복합체의 직접적인 표적이고 cyclin D1의 promoter는 LEF-1 결합부위를 포함한다.<sup>33)</sup> cyclin D1은 또한 cyclin D1과 PPAR $\gamma$ 사이의 직접적 상호작용을 포함하는 기전을 통해 리간드에 의해 유도되는 PPAR $\gamma$ 의 기능을 억제한다.<sup>15)</sup> 이 연구에서 높은 내장지방 분포를 보이는 당대사장애 환자들에서 정상 내당능을 보이는 환자들에 비해 cyclin D1의 발현이 의미 있게 증가하였다. 이는 Wnt10b의 결과와 비교적 일치한다. Wnt10b의 발현은 cyclin D1의 발현과 매우 강한 연관성을 보였다는( $r = 0.78$ ,  $P < 0.01$ ) 점에서, Cyclin D1이 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호계의 표적 유전자라는 사실을 본 연구를 통해 확인할 수 있다.

interleukin (IL)-6와 TNF $\alpha$ 는 인슐린 저항성과 제2형 당뇨병의 발생과 연관성이 있는 주요한 염증성 사이토카인으로 알려져 있다.<sup>34)</sup> 최근 연구에 따르면, 이들 두 사이토카인은 지방세포를 증식기 상태로 유지하면서, 지방세포의 분화를 억제하는데 관여하는 것으로 알려졌다.<sup>35)</sup> C/EBP $\beta$ 와 C/EBP $\delta$  유전자의 활성화로 정의되는 지방세포 분화 유도의 초기단계는 IL-6 또는 TNF $\alpha$ 에 의해 변화하지 않았다. IL-6의 경우 PPAR $\gamma$ 의 정상적인 유도를 허용하는 반면에, C/EBP $\alpha$ 의 결합과 활성이 현저히 감소하였다. 그러나 TNF $\alpha$ 는 IL-6와 다르게 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 활성화를 완전히 차단하였다. 주목할만한 것은, 지방세포를 미분화 상태로 유지시키는 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호계는 interleukin (IL)-6 또는 TNF $\alpha$ 의 존재 하에서 분화과정 동안에 활성화된다는 것이다.<sup>35)</sup>

이 연구는 표본수가 적고, 생체 외 실험을 통해 Wnt 신호계의 활성화에 따른 지방세포의 분화 및 전사 인자 그리고 지방 세포 특이적 유전자의 변화를 확인하지 못했다는 한계점이 있다. 또한 단백질 수준에서 발현 정도의 차이를 보는 western blot을 시행하지 못해서 전사 이후 단계에서의 변화를 알아보지 못했다. 이러한 한계에도 불구하고 저자들은 이 연구를 통해 다음과 같은 결론을 내리게 되었다. Wnt/ $\beta$ -catenin 신호계는 PPAR $\gamma$ 뿐만 아니라 C/EBP $\alpha$ 를 필요로 하는 adiponectin과 GLUT4와 같은 인슐린 감수성에 관여하는 유전자들을 선택적으로 억제하고, aP2와 같은 다른 유전자의 발현에는 별다른 영향을 미치지 않았다. 따라서, Wnt/ $\beta$ -catenin 신호계가 지방세포 유전자 발현에 미치는



선택적 억제 작용은 PPAR $\gamma$ 에 의한 C/EBP $\alpha$ 의 활성 억제 또는 C/EBP $\alpha$ 의 그 결합부위와 결합을 억제함을 통해 발생할 것이다. 이 연구에서, C/EBP $\alpha$ 의 유전자 발현이 정상 내당능 환자와 당대사장애 환자들 사이에 의미 있는 차이를 보이지 않았기 때문에, C/EBP $\alpha$ 의 그 결합부위와의 결합 억제가 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호계가 지방세포의 유전자 발현에 대한 선택적 억제의 가장 가능성 있는 기전으로 생각된다. C/EBP $\alpha$ 는 PPAR $\gamma$ 와 함께 지방세포 분화를 조절하는 역할을 하고, 지방세포에서 인슐린 감수성을 조절하기 때문에, C/EBP $\alpha$ 는 궁극적으로 thiazolidinedione의 항당뇨병 작용의 매우 중요한 간접적인 표적이 될 것이다.

## ABSTRACT

### The Relation between Inhibition of Adipocyte Differentiation by Activation of Wnt Signaling and Impaired Glucose Metabolism in Human

**Objectives:** The differentiation of preadipocyte to mature adipocyte includes activation of adipogenic gene expression and induction of insulin sensitivity. Wnt signaling, primarily mediated by Wnt10b in human, functions as a promoter of preadipocyte growth and proliferation, although it also functions as a potent inhibitor of adipogenesis. Therefore, this study was undertaken to determine the effect of Wnt signaling on the degree of adipocyte differentiation and glucose metabolism.

**Methods:** Adipose tissue was obtained during surgery from omental fat deposits in twenty one patients who underwent elective abdominal surgery at Hanyang University Hospital. All patients were divided into NGT patients (n = 12) and patients with impaired glucose metabolism (n = 9) based on the level of the fasting plasma glucose. Tissue expression level of transcription factors for adipocyte differentiation, early and late adipocyte-specific genes, and genes for Wnt signaling and CyclinD1 were investigated in NGT patients and patients with impaired glucose metabolism through real-time quantitative PCR analysis.

**Results:** To control for the effect of visceral adiposity on the development of impaired glucose metabolism, all patients were subdivided into low and high visceral adiposity according to the median value of V/S ratio (0.85). Among adipocyte-specific genes, expression of genes for insulin sensitivity, such as adiponectin and

GLUT4 was reduced in patients with impaired glucose metabolism than NGT patients. Gene expression of Wnt10b and CyclinD1 was significantly higher in patients with impaired glucose metabolism than NGT counterparts.

**Conclusions:** The major role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in human adipose tissue seems to selectively inhibit genes for insulin sensitivity such as adiponectin and GLUT4, which require C/EBP $\alpha$  as well as PPAR $\gamma$ .

**Key words:** Wnt signaling, Adipocyte differentiation, Insulin sensitivity, Cyclin D1

## 참 고 문 헌

1. Popkin BM, Doak CM. The obesity epidemic is a worldwide phenomenon. *Nutr Rev* 1998;56:106-14.
2. Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev* 2001;2:239-54.
3. Morrison RF, Farmer SR. Insights into the transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Cell Biochem* 1999;Suppl 32-33:59-67.
4. MacDougald OA, Lane MD. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem* 1995;64:345-73.
5. Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 1998;273:30057-60.
6. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 2000;14:1293-307.
7. Goodwin AM, D'Amore PA. Wnt signaling in the vasculature. *Angiogenesis* 2002;5:1-9.
8. Cossu G, Borello U. Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals. *EMBO J* 1999;18:6867-72.
9. Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, et al. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 2000;289:950-3.
10. Mulholland DJ, Dedhar S, Coetzee GA, Nelson CC. Interaction of nuclear receptors with the Wnt/ $\beta$ -catenin/Tcf signaling axis: Wnt you like to know? *Endocr Rev* 2005;26:898-915.
11. Bennett CN, Ross SE, Longo KA, Bajnok L, Hemati N, Johnson KW, et al. Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J Biol Chem* 2002;277:30998

- 1004.
12. Moldes M, Zuo Y, Morrison RF, Silva D, Park BH, Liu J, et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma suppresses Wnt/beta-catenin signalling during adipogenesis. *Biochem J* 2003;376:607-13.
13. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, et al. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:5522-7.
14. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999;398:422-6.
15. Wang C, Pattabiraman N, Zhou JN, Fu M, Sakamaki T, Albanese C, et al. Cyclin D1 repression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and transactivation. *Mol Cell Biol* 2003;23: 6159-73.
16. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density Lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
17. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-9.
18. Ribeiro-Filho FF, Faria AN, Kohlmann NE, Zanella MT, Ferreira SR. Two-hour insulin determination improves the ability of abdominal fat measurement to identify risk for the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2003;26:1725-30.
19. Carr DB, Utzschneider KM, Hull RL, Kodama K, Retzlaff BM, Brunzell JD, et al. Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome. *Diabetes* 2004;53:2087-94.
20. Gabriely I, Ma XH, Yang XM, Atzmon G, Rajala MW, Berg AH, et al. Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-mediated process? *Diabetes* 2002; 51:2951-8.
21. Barzilai N, She L, Liu BQ, Vuguin P, Cohen P, Wang J, et al. Surgical removal of visceral fat reverses hepatic insulin resistance. *Diabetes* 1999;48: 94-8.
22. Park BH, Qiang L, Farmer SR. Phosphorylation of C/EBPbeta at a consensus extracellular signal -regulated kinase/glycogen synthase kinase 3 site is required for the induction of adiponectin gene expression during the differentiation of mouse fibroblasts into adipocytes. *Mol Cell Biol* 2004;24: 8671-80.
23. Cornelius P, MacDougald OA, Lane MD. Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr* 1994;14: 99-129.
24. Spiegelman BM, Flier JS. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell* 1996;87:377-89.
25. Yeh WC, Cao Z, Classon M, McKnight SL. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev* 1995;9:168-81.
26. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, et al. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 1999;4:585-95.
27. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, et al. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 1999;4:611-7.
28. Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, et al. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell* 1999 ;3:151-8.
29. El-Jack AK, Hamm JK, Pilch PF, Farmer SR. Reconstitution of insulin-sensitive glucose transport in fibroblasts requires expression of both PPARgamma and C/EBPalpha. *J Biol Chem* 1999;274:7946-51.
30. Peifer M, Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science* 2000;287:1606-9.
31. Willert K, Nusse R. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev* 1998;8:95-102.
32. Liu J, Farmer SR. Regulating the balance between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and beta-catenin signaling during adipogenesis. A glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation -defective mutant of beta-catenin inhibits expression of a subset of adipogenic genes. *J Biol Chem* 2004; 279:45020-7.
33. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, et al. The cyclin D1 gene is

- a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96:5522-7.
34. Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. Diabetologia 1997;40: 1286-92.
35. Gustafson B, Smith U. Cytokines promote Wnt signaling and inflammation and impair the normal differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes. J Biol Chem 2006;281:9507-16.