

발암물질인 2-nitrofluorene와 clonidine은 사람지방줄기세포의 sirtuin mRNAs의 발현의 정도를 조절한다

김지연¹, 이채영², 권영호¹, 김호찬³, 김 현²

¹고신대학교 의과대학 정형외과학교실, ²고신대학교 의과대학 해부학교실, ³고신대학교 의과대학 정신과학교실

(2014년 12월 4일 접수, 2014년 12월 18일 수정접수, 2014년 12월 22일 게재승인, Published Online 30 December 2014)

간추림 : Sirtuin 단백질들은 주로 노화과정을 조절하는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 다양한 생물학적인 성장과정에 지속적으로 관여하는 것으로 알려져 있다. 이들은 암, 신경퇴행성질환 심혈관계 질환들 등, 노화와 관련된 질환들의 발생을 일차적으로 방어하는 것으로 알려져 있다. 또한 유전적인 안정성을 조절하는데 중요하기 때문에 암 발생을 조절하는데 매우 유용할 것으로 생각하고 있다. 이번 연구에서 분화가 안되어 있는 지방줄기세포에 암을 유발하는 비유전독성화합물인 clonidine과 유전독성화합물인 2-nitrofluorene를 발암물질을 투여하여 세포의 성장을 관찰하였고, 지방줄기세포에 일정시간 처리한 후 지방줄기세포에서 시간에 따른 sirtuin 유전자의 발현을 관찰하고 세포의 증식과 비교하였다.

독성화합물을 처리한 사람의 지방줄기세포에서 SIRT1, 2, 3, 그리고 7 mRNA의 발현은 48시간 이후 증가하였으며, SIRT의 종류에 따라 증가 시기는 차이가 났다. 독성화합물을 처리한 지방줄기세포에서 SIRT1, 2, 3, 그리고 7 mRNA의 발현은 처리 96시간이 지나면 처리 전 세포의 발현 수준으로 감소하였다.

이 연구를 통해 지방줄기세포는 유전독성화합물인 2-nitrofluorene의 투여는 지방줄기세포의 성장에 저해를 일으켰다. 발암물질을 투여한 후 시간에 따른 sirtuin1, 2, 3, 7 mRNA의 발현 변화는 유전독성 혹은 비유전독성 발암물질의 종류에 관계 없이 유사하게 관찰되었다. 즉 발암물질은 지방줄기세포에서 투여 초기에 sirtuin mRNA의 발현을 유도한다는 것을 알 수 있다. 이 연구 결과는 독성화합물에 의한 지방줄기세포의 성장 억제와 sirtuin의 세포 방어 기전에 대한 가능성을 제시한다.

찾아보기 낱말 : Sirtuin, 사람지방줄기세포, 2-nitrofluorene, clonidine

서 론

Sirtuins는 NAD⁺-의존성 효소그룹으로서 다양한 생물학적인 성장과정에 지속적으로 관여하는 것으로 알려져 있다[1]. Sirtuins는 노화작용을 조절할 뿐 아니라 대사의 항상성(metabolic homeostasis)의 유지에도 핵심적인 역할을 한다. 이 효소들은 암, 신경퇴행성질환 심혈관계 질환들 등, 노화와 관련된 질환들의 발생을 일차적으로 방어하는 것으로 알려져 있다[2].

SIRT2는 열량공급을 제한하여(calorie restriction) 배

양한 yeast의 생존을 연장하는데 필요한 단백질로서, silencing information regulator로 처음 서술된 후 포유류에서도 7가지의 상동단백질(homologs)이 발견되었다[3]. SIRT1의 경우 노화가 건강하게 이루어지도록 여러 노화 관련 질환을 방어하는 역할을 한다[4]. 포유류에서 sirtuin과 열량 제한 식이요법(이하 CR)의 효과 사이의 연관관계를 증명한 것은 SIRT3의 연구를 통해서였다. 또한 SIRT3는 CR을 통한 항산화작용에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[5]. 노화관련 질환들을 조절하는데 작용하는 SIRT3의 광범위한 역할이 ROS의 세포 농도와 관련이 있음을 보여 준다[6,7]. 즉, sirtuin은 세포의 대사 작용에 밀접하게 연관되어 있으며, 대사작용과 에너지 항상성을 조절하는데 중요한 역할을 하고 있다, 특히 낮은 에너지 공급상태에서 세포가 적응할 수 있도록 해주는 것으로 알려져 있다.

저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.
저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.
교신저자: 김현(고신대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편: drhkim@kosin.ac.kr

줄기세포는 무한증식 능력과 특정 기관 또는 조직을 형성하는 세포들로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있다. 그 기원에 따라 배아줄기세포(embryonic stem cell)와 성체줄기세포(adult stem cell)로 구분된다. 성체줄기세포는 다양한 세포로 분화할 수 있으며, 오래 생존할 수 있는 특성을 가지고 있어 노화되었거나 손상된 조직을 재생하거나 복구하는데 유익한 점이 있다. 그러나 지방줄기세포의 분화능력에 손상이 오거나 자가재생능력이 조절되지 않은 경우, 암 발생을 포함한 심각한 문제가 발생할 수 있는 문제점이 있다. 이와 반대로 지방줄기세포에 비해 배아줄기세포는 세포이식 시 생기는 면역거부 반응이나 윤리적인 문제와 같은 여러 가지 문제점을 가지고 있어 임상적 적용에 대한 한계를 가지고 있다[8]. 성체줄기세포는 배아줄기세포만큼 분화능력을 가지고 있지는 않지만, 응용이 가능한 자가재생능력을 가지고 있기 때문에 특정 조직의 세포로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있다[9]. 그러므로 성체줄기세포는 한 개체의 일생 동안 조직과 기관을 유지하고 재생하는데 관여하여, 정상조직의 항상성 유지, 조직 보수, 손상 후 상처회복, 그리고 외부 스트레스로부터 반응 등에 필수적이다[10,11].

SIRT1의 경우 세포 스트레스에 대한 반응을 조절하고 DNA 복구에 관여하는 것으로 알려져 있다[12,13]. 최근 SIRT1이 암 발생을 유도하는 결과도 많이 보고되고 있다. 특히 쥐의 신경모세포종(neuroblastoma) 모델에서 암 발생 촉진과 관련이 있으며, 유방암에서 암세포 억제 유전자를 비활성화함으로써 암 발생을 촉진하며, 간암에서도 SIRT1 유전자의 발현이 증가한다는 보고가 있다[14,15].

SIRT6는 암세포의 대사를 조절함으로써 암을 억제하며, 결손 시킨 경우 metabolic reprogramming이 급격하게 증가하여 암 생성을 증가시킨다[16]. SIRT6의 발현이 증가한 경우는 췌장암, 대장암의 발생이 억제된다[16]. 또한 SIRT6의 과발현을 통해 암세포의 apoptosis가 증가하게 된다[17]. 암의 발생에 있어 다른 sirtuin들의 역할도 알려지고 있다. SIRT2와 SIRT7 역시 암 발생을 억제하는 것으로 알려져 있다. SIRT2 결손 쥐에서 유방암과 간암의 발생이 증가했다[18,19]. 그러나 이러한 결과들에 대한 정확한 기전은 아직까지 명확하지 않다.

성체줄기세포의 일종인 지방줄기세포와 sirtuin과의 관계에 대한 보고는 아직 매우 적다. 대부분의 연구는 지방줄기세포의 분화와 sirtuin과의 역할에 대한 결과를 보고하는 데 국한되어 있으며, sirtuin은 암 발생에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다.

유전독성 발암물질은 DNA 손상 반응과 세포증식 자

극, 생존 신호체계의 활성화 등을 유도하는 것으로 알려져 있으며, 비유전독성 발암물질은 oxidative DNA 혹은 단백질 손상에 반응하며, 세포주기 전개와 재생에 대한 신호에 반응하는 것이 그 특징이다[19].

따라서 본 연구에서는 또한 지방줄기세포의 일종인 사람의 지방줄기세포에 유전성 발암물질인 2-nitrofluorene (2-NF), 비유전성 발암물질인 clonidine (CND)을 처리하여 세포의 성장 변화를 관찰하였다. 또한 발암물질에 의한 sirtuin mRNA의 발현의 변화를 관찰하고자 하였다. 즉 발암물질에 노출된 지방줄기세포가 sirtuin의 발현 유도를 통해 스스로를 방어하는 지에 관하여 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 지방줄기세포 추출 및 배양

사람의 지방줄기세포는 고신대학교 복음병원 의학연구윤리심의위원회(IRB)의 승인을 받아 여성 유방암 환자의 암 주위 정상 지방조직에서 추출하였다. 추출한 지방조직을 생리식염수를 이용하여 3번 씻은 후 배양접시 위에 놓고, 가위로 아주 잘게 자른 후, 0.1% collagenase를 사용하여 지방조직을 37°C 항온수조에서 40분 동안 효소분해 시켰다. 동일한 양의 DMEM-10% FBS 용액을 첨가한 후 260×g에서 7분 동안 원심 분리하여 하단부에 침전된 층을 수집하였다. 다시 DMEM-10% FBS에 용해시킨 후 260×g에서 7분 동안 원심 분리시킨 후 하단부 침전층을 수집하였다. 수집된 침전층을 70 μm 필터를 이용하여 세포찌꺼기를 제거한 후 10% FBS, 10 ng/mL EGF, 2 ng/mL bFGF, 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM/F12 배지 용액에서 5% CO₂로 충전된 37°C 배양기에서 배양하였다. 배양 1일 후 배양접시에 부유하는 세포들을 제거하고 배양접시에 부착해서 자라는 세포들만 선별하여 배양하였으며, 배양액은 2일에 한 번씩 교환해주고 배양접시의 약 80% 정도 자랐을 때 0.25% trypsin-EDTA를 사용하여 1:3 비율로 배양하였다.

2. 독성화합물

발암물질이 줄기세포와 암세포의 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 비유전 독성화합물과 유전독성화합물을 사용하였다. 유전독성화합물로는 2-nitrofluorene (2NF)을 사용하였고, 비유전적 독성화합물로는 clonidine (CND)를 사용하였다. 모든 독성화합물은 Sigma-Aldrich (USA)회사로부터 구입하였다.

3. 세포배양 및 독성화합물 처리

지방줄기세포는 6-well 배양접시에 2×10^4 cells/well의 밀도로 37°C에서 하룻밤 동안 안정화시킨다. 실험은 대조군 (CON), 유전독성화합물 처리군 (2NF), 비유전독성화합물 처리군 (CND)으로 구분하였으며, 2NF 처리군은 78 μ M, 2NF를 처리하였고, CND 처리군에는 600 μ M, CND를 24시간, 48시간, 72시간 및 96시간 처리하였다. 독성화합물의 처리 용량을 결정하기 위하여 Doktorova TY 등에 의한 carcinogen 비교 보고를 기준으로 2NF의 경우 39 μ M, 78 μ M, 117 μ M를 투여하였고, CND의 경우 300 μ M, 600 μ M, 1200 μ M를 투여하여 세포의 성장을 비교 관찰하여 결정하였다[19].

4. 세포성장 분석

세포의 성장을 분석하기 위하여 6-well plate을 이용하여 1×10^5 cells/well의 농도로 앞서 언급한 배양액과 동일한 배양 조건으로 세포를 배양하였다. 해당되는 조건에 따라 실험 24시간, 48시간, 72시간, 96시간에 세포를 0.4% trypsin-EDTA 용액을 이용하여 세포를 배양접시에서 분리하고, 0.4% trypsin blue solution을 이용하여 염색한 후 hematocytometer를 이용하여 세포의 수를 측정하였다.

5. RNA 추출 및 RT-PCR

비유전적 독성화합물과 유전적 독성화합물이 줄기세

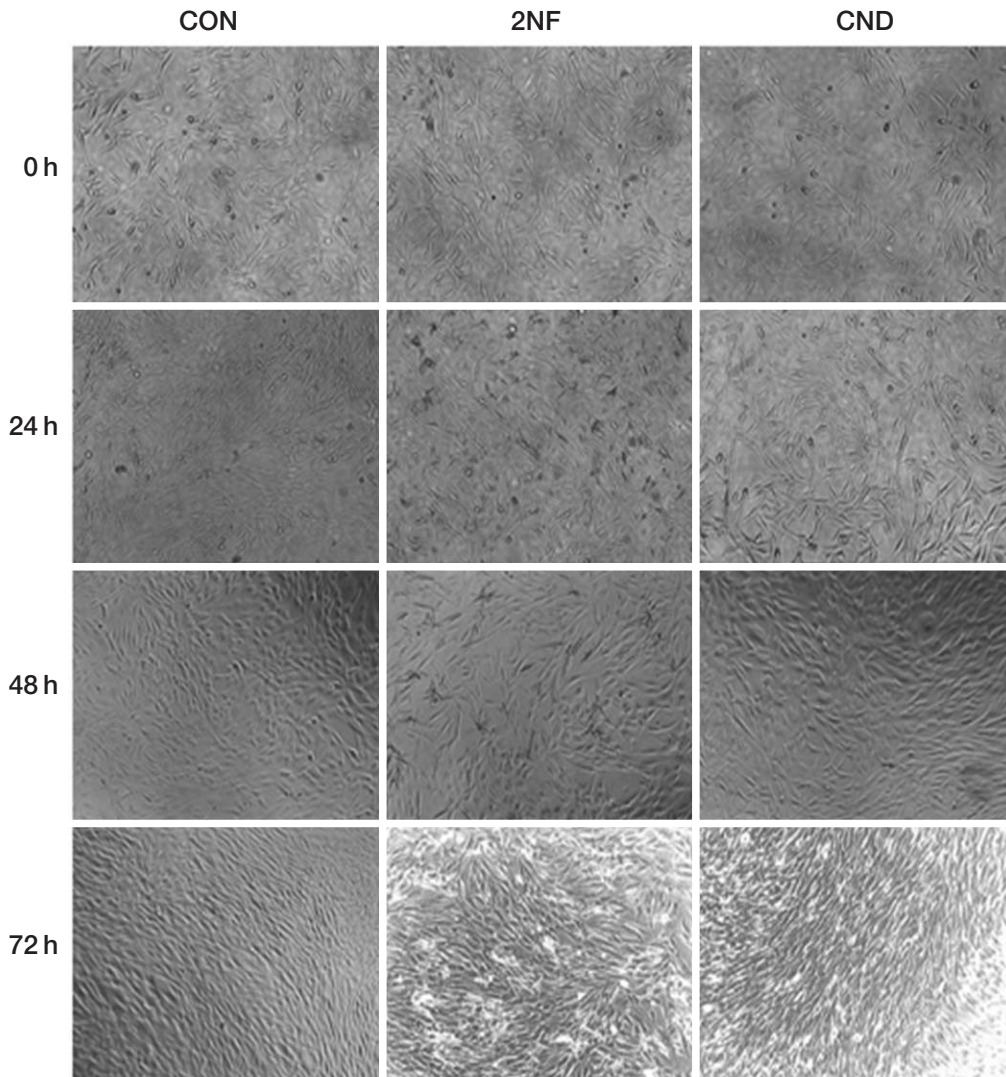


Fig. 1. Morphology of cultured human adipose tissue-derived stem cells (hADSCs) is changed by treatment with carcinogenic compound, 2NF (78 μ M) and CND (600 μ M) for 24 hours, 48 hours, and 72 hours ($\times 100$).

포에서 sirtuin mRNA의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 총 RNA (total RNA)를 TRIzol 용액 (Invitrogen, USA)을 이용하여 추출하였다. 추출된 RNA는 1.2% agarose gel 상에서 전기영동을 실시하였으며 ethidium bromide로 염색하여 총 RNA의 순도를 측정하였다.

총 RNA의 역전사는 Superscript III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, USA)를 사용하였다. 우선 3 µg의 총 RNA를 10 mM dNTP 1 µL, random primer 2 µL, DEPC water 4 µL와 섞은 후 65°C에서 5분 동안 반응시켰다. 10x RT buffer 2 µL, 25 µM MgCl₂ 4 µL, 0.1 M DTT 2 µL, RNaseOUT Rnase inhibitor 1 µL, 그리고 SuperScript III Reverse Transcriptase 1 µL의 혼합물을 반응액에 넣은 후 50°C에서 50분, 85°C에서 5분 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA 3 µL에 프라이머 혼합물 2 µL와 Platinum PCR SuperMix (Invitrogen, USA) 5 µL를 혼합한 후 94°C에서 5분 동안 반응시킨 후, 94°C에서 30초, 57°C에서 30초, 72°C에서 30초의 간격으로 27 cycle 반복 반응시켰다. 반복 반응 종료 후 72°C에서 7분 동안 반응시켰다.

PCR 반응을 위한 유전자 특이적 프라이머는 다음과 같다.

SIRT1; F-GAGCTTCTTGGAGACTGTGATG
R-CGCCTACTAATCTGCTCCTTTG
SIRT2; F-TCGCAGAGTCATCTGTTTGG
R-TCGCTCCAGGGTATCTATGT
SIRT3; F-GCTGTACCCTGGAACTACAA
R-CAACCACATGCAGCAAGAAC
SIRT7; F-ACTGCTTCAGAAAGGGAGAAG
R-CACTGCAGGTTCCACGATGTA
GAPDH; F-GGGTGTGAACCATGAGAAGTAT
R-AGTAGAGGCAGGGATGATGT

GAPDH는 control 표식자로 사용하였으며, PCR 생성물은 ethidium bromide를 포함하는 1.2% agarose gel 상에서 전기영동에 의해 분리하여 확인하였다. 전기영동 결과를 정성적으로 분석하기 위하여 Fluorchem HD2 (Alpha Innotech Co., USA)를 이용하여 촬영하고 density를 측정하여, 실험군 별로 발현양을 비교 분석하였다.

결 과

1. 2-nitrofluorene (2-NF)은 지방줄기세포의 증식을 억제한다.

비유전독성화합물과 유전독성화합물이 줄기세포의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 비유전발암화

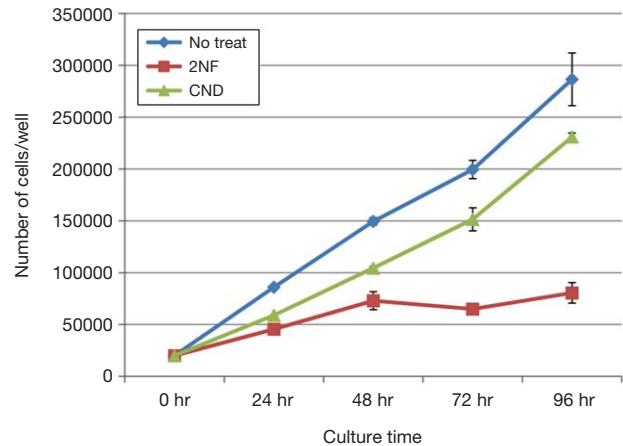


Fig. 2. Growth rates of hADSC are decreased prominently by treatment with 2NF (78 µM) for 24 hours, 48 hours, and 72 hours.

합물인 CND (600 µM)와 유전독성발암화합물인 2NF (78 µM)를 24시간, 48시간, 72시간 동안 지방줄기세포에 처리하여 세포의 성장을 관찰하였다.

지방줄기세포는 2NF와 CND를 처리한 후 24시간 내에 세포모양이 대조군에 비해 더 가늘고 길쭉한 형태로 급격히 변화하였다 (Fig. 1). 또한 대조군과 CND처리군은 48시간 배양 후에 배양접시에 약 80% 이상 100% 정도까지 증식했지만 2NF 처리군은 약 60% 정도 증식하였다. 각 배양접시의 세포수를 측정한 결과, 2NF 처리군은 72시간 배양하는 동안 대조군과 CND 처리군 보다 세포증식이 억제되었으며, CND 처리군은 역시 억제되었다 (Fig. 2).

2. 독성화합물에 의한 지방줄기세포에서 SIRT1 mRNA 발현 변화

암 유발 독성화합물이 지방줄기세포의 SIRT1 mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 유전독성화합물인 2NF (78 µM)와 비유전독성화합물인 CND (600 µM)를 24시간, 48시간, 72시간 및 96시간 동안 지방줄기세포에 처리한 후 SIRT1 mRNA의 발현 변화를 RT-PCR을 시행하여 조사하였다.

SIRT1 mRNA의 발현은 유전독성화합물인 2NF를 처리한 48시간 후부터 지방줄기세포에서 약간 증가하였으며, 72시간이 흐른 후 최대로 증가하였다. 96시간이 흘렀을 때 다시 24시간 처리 세포와 유사한 발현양을 보였다. CND 처리 후 SIRT1 mRNA의 발현 양상은 2NF를 처리한 경우와 유사하였으며, 48시간 후 증가하여 72시간 후에는 최대로 증가하였고 다시 급격하게 감소하였다 (Fig. 3).

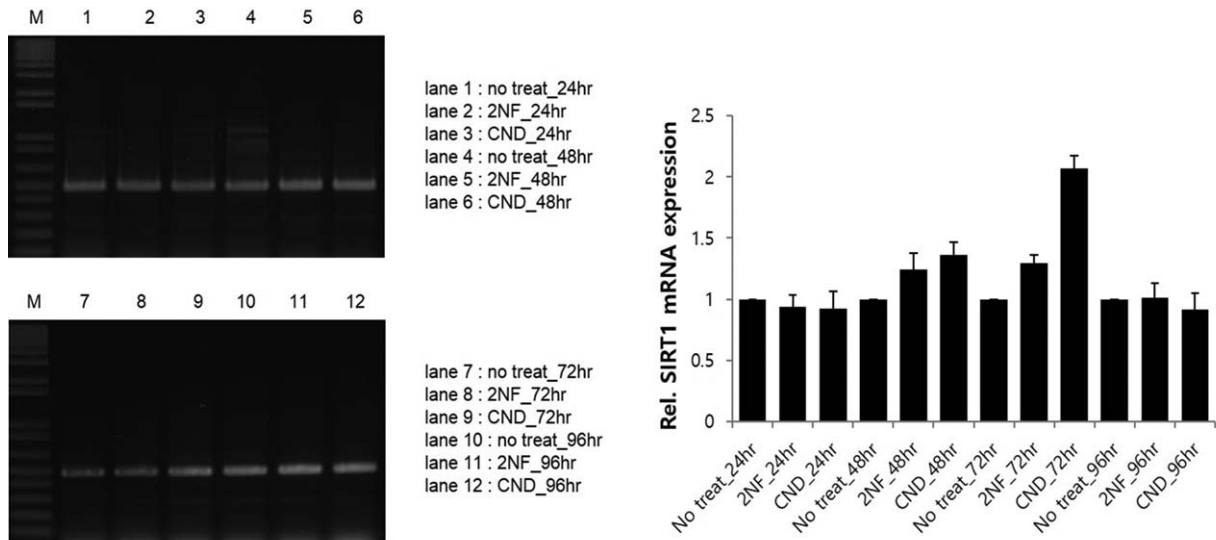


Fig. 3. Representative gel electrophoresis and analysis for determining sirtuin1 mRNA expression show increased levels in hADSC with treatment of carcinogenic compounds for 72 hours.

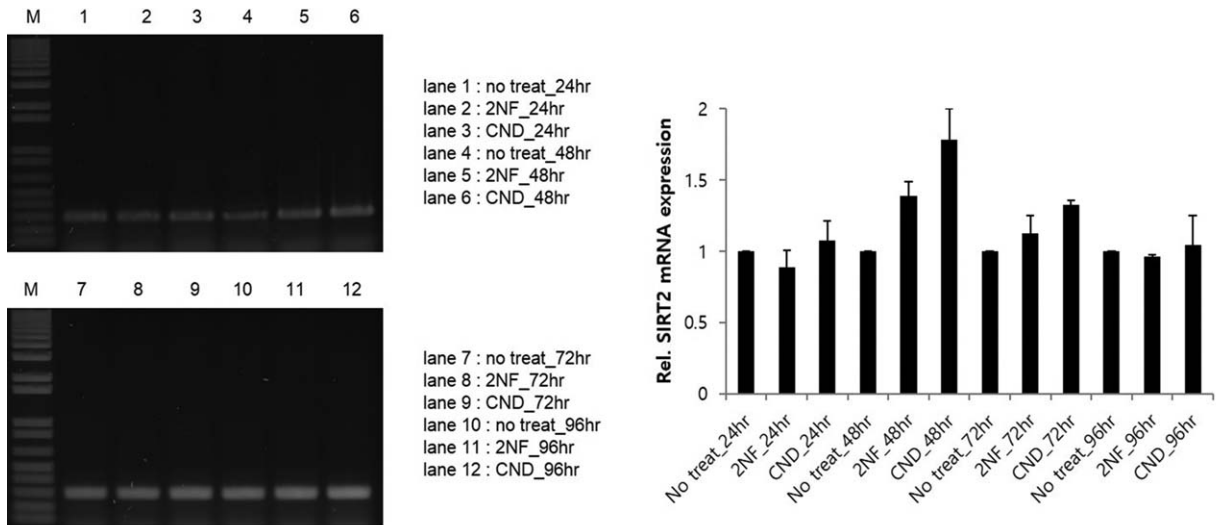


Fig. 4. Representative gel electrophoresis and analysis for determining sirtuin2 mRNA expression show increased levels in hADSC with treatment of 2NF and CND for 48 hours.

3. 독성화합물에 의한 지방줄기세포에서 SIRT2 mRNA 발현 변화

SIRT2 mRNA의 발현은 유전독성화합물인 2NF를 처리한 48시간 후 지방줄기세포에서 증가하였으나, 이후 다시 감소하여, 96시간이 후 다시 24시간 처리 세포와 유사한 발현량을 보였다. CND를 처리한 후 SIRT2 mRNA의 발현 양상은 2NF를 처리한 경우와 유사하게 48시간 후 증가하였으며, 그 이후 다시 정상 발현 수치로 감소하였다(Fig. 4).

4. 독성화합물에 의한 지방줄기세포에서 SIRT3 mRNA 발현 변화

독성화합물 처리 후 SIRT3 mRNA의 발현은 2NF를 처리한 48시간까지 변화가 없으나 72시간에 급격하게 증가하였다. 이후 다시 정상 수치로 감소하였다. CND를 처리한 후 SIRT3 mRNA의 발현은 72시간 후 급격하게 증가하였으며, 그 이후 다시 정상 발현 수치로 감소하였다(Fig. 5).

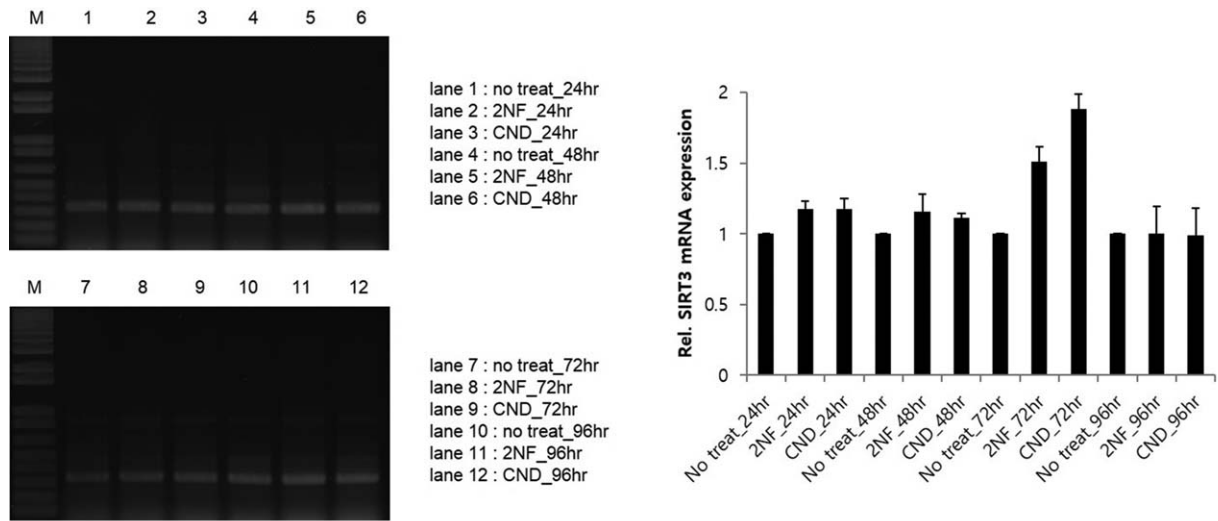


Fig. 5. Representative gel electrophoresis and analysis for determining sirtuin3 mRNA expression show increased levels in hADSC with treatment of 2NF and CND for 72 hours.

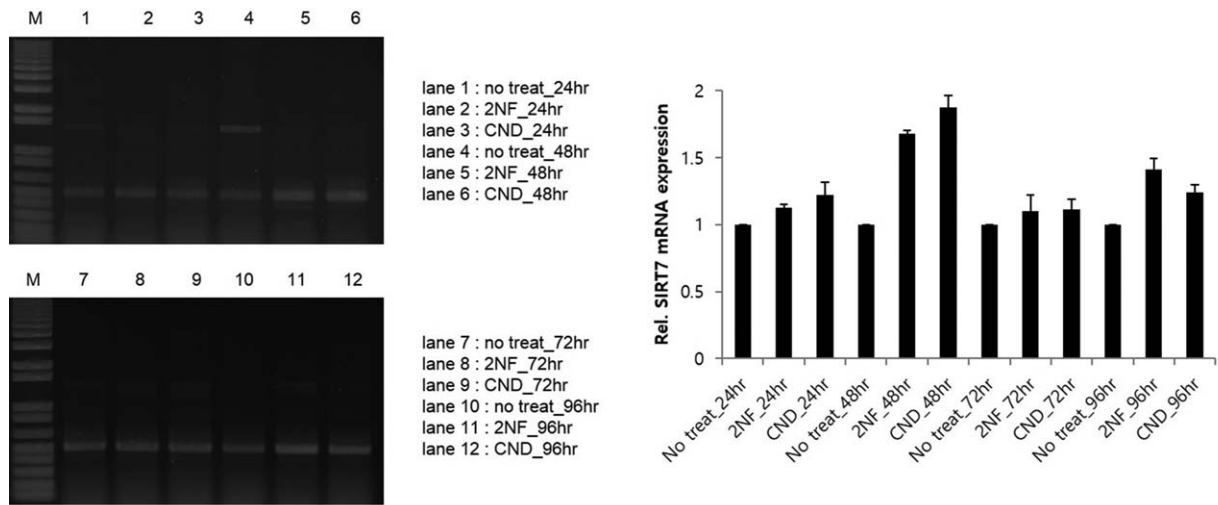


Fig. 6. Representative gel electrophoresis and analysis for determining sirtuin7 mRNA expression show increased levels in hADSC with treatment of 2NF and CND for 48 hours.

5. 독성화합물에 의한 지방줄기세포에서 SIRT7 mRNA 발현 변화

SIRT7 mRNA의 발현은 2NF를 처리한 후 48시간에 급격하게 증가하였으나, 72시간이 흐른 후 다시 정상 수치로 감소하였다. 비유전독성화합물인 CND 처리 후 시간의 경과에 따른 SIRT7 mRNA의 발현 양상은 2NF를 처리한 경우와 유사하게 48시간 후 급격하게 증가하였으며, 72시간 이후 다시 정상 발현 수치로 감소하였다 (Fig. 6).

SIRT7 mRNA 발현량은 독성화합물의 처리와 관계

없이 유사한 경향을 보였으며, 처리 후 전반적으로 증가하였다. 그러나 96시간에는 모든 세포에서 SIRT7 mRNA의 발현이 24시간 처리 세포와 유사한 경향을 보였다.

고 찰

많은 연구를 통해 sirtuin 단백질들이 많은 질환들, 즉 암, 염증, 대사이상, 심장비대증, 신경퇴화질환 등에서 핵심적인 조절인자로서 작용하는 것으로 생각하고 있으

나, 아직 알려지지 않은 부분이 많다.

Metabolic reprogramming의 과정이 암세포의 중요한 성질이다. 정상적인 상황에서 세포가 분화할 때 탄수화물의 산화를 통해 에너지를 얻게 되는데, 빠른 성장을 하는 암세포의 경우 glycolysis가 증가되는 것으로 알려져 있다. 이 과정을 통해 세포들이 성장에 필요한 분자들을 세포들이 생성하도록 하는 것으로 이해하고 있다. 이런 현상은 SIRT3가 ROS의 작용 감소를 통해 HIF-1 α 의 불안정성을 이끌어 내며, 대사 작용이 바뀌게 하는 역할을 하기 때문이다[20,21]. SIRT3가 과발현 되는 경우 이러한 대사 전환이 억제되며 이 결과를 통해 SIRT3가 암 발생, 특히 유방암 발생을 억제하는 것으로 생각하고 있다[22]. SIRT1의 경우 세포에 가해진 스트레스에 대한 반응을 조절하고, DNA 복구에 관여하는 것으로 알려져 있다[12]. 또한 HIF-1 α 과 작용하여 암 발생과 혈관형성을 억제한다[23].

정상세포로부터 암 발생은 DNA 손상과 그에 따른 돌연변이로부터 시작된다고 알려져 있다. 특히 유전적 독성화합물은 세포 내에서 DNA를 손상시켜서 돌연변이를 유발하는 물질들로서 암을 유발하기도 한다. 유전 독성물질들이 DNA 구조에 영향을 미쳐, 돌연변이를 유발하지만, 세포들은 이러한 돌연변이를 방지하기 위한 DNA 복구 기전 또는 세포사멸기전을 통해 돌연변이가 유전되는 것을 방지한다. 그러나 방어 작용이 항상 작동하는 것은 아니기 때문에, 일부 유전독성에 의한 돌연변이가 다음 세대로 전달될 수 있다. 축적된 돌연변이가 세포의 정상적인 분열 또는 분화 조절 기능에 이상을 유발하여, 궁극적으로 암 발생을 유발할 수 있다[24,25]. 그러나 유전독성과 발암성 사이의 연관성이 항상 일정한 것은 아니다. 더욱이 발암성은 세포분열을 증가시키거나 세포사멸을 억제시키는 비유전적 독성 기전에 의해서도 유발되었다[26,27].

이 연구에서는 지방줄기세포에 돌연변이를 유발하는 유전적 독성화합물인 2NF와 비유전적 독성화합물인 CND를 처리하여 돌연변이를 유도하였다. 이를 통해 줄기세포에서 sirtuin을 통한 방어 기전이 작동하는 지 조사하였다. 유전적 독성화합물과 비유전적 독성화합물이 지방줄기세포에서 SIRT mRNA 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과에서 두 종류의 독성화합물 모두 일정 시간이 지난 후 SIRT mRNA의 발현을 증가시켰다. 그러나 발현 변화의 시간은 sirtuin에 종류에 따라 조금씩 차이가 났다. 독성화합물의 종류에 따른 차이는 없었다. 이 결과는 유전독성에 관계 없이 독성화합물이 sirtuin의 발현을 유도하는 것으로 생각되며 따라서 독성화합물에 의한 sirtuin의 발현은 세포를 스스로 보호하기 위한 자가분비 (autocrine)의 일종으로 생각된다.

흥미롭게도 시간에 따른 sirtuin mRNA의 발현이 규칙적이라는 것이다. 독성화합물의 투여 초기에 sirtuin의 발현이 증가하였으며, 모든 sirtuin에 있어 독성화합물 처리 후 96시간이 되면 초기 발현 수치로 돌아갔다. 유전적 독성화합물과 비유전적 독성화합물은 모두 지방줄기세포에서 세포주기의 속도를 감소시키며, 지방줄기세포의 수가 감소하게 될 수 있다. 특히 유전적 독성화합물인 2NF가 유발한 DNA 손상에 대한 방어 작용의 일종으로 sirtuin이 관여하는 것으로 생각된다. 그러나 시간이 경과하고 지속적인 손상이 가해지면 세포의 사멸에 따라 sirtuin의 발현의 정도가 감소하는 것으로 생각한다.

많은 실험에서 Sirt1의 경우 proto-oncogene인 Myc-의존성 변이의 억제를 통해 암 발생을 억제하는 것으로 추측하고 있다[28]. 특히 sirt1의 발현이 증가하면 노화와 관련된 암의 발생을 감소시킨다고 알려져 있다[29].

최근의 sirtuin의 발현을 조절하는 분자생물학적인 기전이나 발현을 유발하는 자극이 무엇인지에 대해서는 많은 연구 결과가 보고되었으나, 아직 확실하지 않다. 앞으로 sirtuin의 발현이 세포의 죽음을 막는 것인지 세포의 성장을 유도하는 것인지에 관해서 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 7가지의 sirtuin 단백질 사이의 상호작용에 대해서도 많은 부분 밝혀내야 할 것이다. Sirtuin이 수명 연장에 미치는 핵심적인 역할이 여러 질환에 대한 방어기전을 통한 것인지, 아니면 더욱 근본적인 기전이 존재하는 것인지에 대한 연구가 필요하다.

참 고 문 헌

- Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012; 13:225-38.
- Sebastian C, Satterstrom FK, Haigis MC, Mostoslavsky R. From sirtuin biology to human diseases: an update. *J Biol Chem.* 2012; 287:42444-52.
- Kaeberlein M, McVey M, Guarente L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* 1999; 13:2570-80.
- Guarente L, Franklin H. Epstein Lecture: Sirtuins, aging, and medicine. *N Engl J Med.* 2011; 364:2235-44.
- Someya S, Yu W, Hallows WC, Xu J, Vann JM, Leeuwenburgh C, et al. Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. *Cell.* 2010; 143:802-12.

6. Qiu X, Brown K, Hirschev MD, Verdin E, Chen D. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell Metab.* 2010; 12:662-7.
7. Tao R, Coleman MC, Pennington JD, Ozden O, Park SH, Jiang H, et al. Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress. *Mol Cell.* 2010; 40:893-904.
8. Mackenzie IC. Stem cell properties and epithelial malignancies. *Eur J Cancer.* 2006; 42:1204-12.
9. Martinez-Climent JA, Andreu EJ, Prosper F. Somatic stem cells and the origin of cancer. *Clin Transl Oncol.* 2006; 8: 647-63.
10. Yamashita YM, Fuller MT. Asymmetric stem cell division and function of the niche in the *Drosophila* male germ line. *Int J Hematol.* 2005; 82:377-80.
11. Yamashita YM, Fuller MT, Jones DL. Signaling in stem cell niches: lessons from the *Drosophila* germline. *J Cell Sci.* 2005; 118:665-72.
12. Martinez-Pastor B, Mostoslavsky R. Sirtuins, metabolism, and cancer. *Front Pharmacol.* 2012; 3:22.
13. Chen J, Zhang B, Wong N, Lo AW, To KF, Chan AW, et al. Sirtuin 1 is upregulated in a subset of hepatocellular carcinomas where it is essential for telomere maintenance and tumor cell growth. *Cancer Res.* 2011; 71:4138-49.
14. Choi HN, Bae JS, Jamiyandorj U, Noh SJ, Park HS, Jang KY, et al. Expression and role of SIRT1 in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* 2011; 26:503-10.
15. Sebastian C, Zwaans BM, Silberman DM, Gymrek M, Goren A, Zhong L, et al. The histone deacetylase SIRT6 is a tumor suppressor that controls cancer metabolism. *Cell.* 2012; 151:1185-99.
16. Van Meter M, Mao Z, Gorbunova V, Seluanov A. SIRT6 overexpression induces massive apoptosis in cancer cells but not in normal cells. *Cell Cycle.* 2011; 10:3153-8.
17. Kim HS, Vassilopoulos A, Wang RH, Lahusen T, Xiao Z, Xu X, et al. SIRT2 maintains genome integrity and suppresses tumorigenesis through regulating APC/C activity. *Cancer Cell.* 2011; 20:487-99.
18. Barber MF, Michishita-Kioi E, Xi Y, Tasselli L, Kioi M, Moqtaderi Z, et al. SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation. *Nature.* 2012; 487:114-8.
19. Doktorova TY, Ellinger-Ziegelbauer H, Vinken M, Vanhaecke T, van Delft J, Kleinjans J, et al. Comparison of genotoxicant-modified transcriptomic responses in conventional and epigenetically stabilized primary rat hepatocytes with in vivo rat liver data. *Arch Toxicol.* 2012; 86:1703-15.
20. Finley LW, Carracedo A, Lee J, Souza A, Egia A, Zhang J, et al. SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1alpha destabilization. *Cancer Cell.* 2011; 19:416-28.
21. Bell EL, Emerling BM, Ricoult SJ, Guarente L. Sirt3 suppresses hypoxia inducible factor 1alpha and tumor growth by inhibiting mitochondrial ROS production. *Oncogene.* 2011; 30:2986-96.
22. Kim HS, Patel K, Muldoon-Jacobs K, Bisht KS, Aykin-Burns N, Pennington JD, et al. SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer Cell.* 2010; 17:41-52.
23. Das C, Lucia MS, Hansen KC, Tyler JK. CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56. *Nature.* 2009; 459:113-7.
24. Dearfield KL, Thybaud V, Cimino MC, Custer L, Czich A, Harvey JS, et al. Follow-up actions from positive results of in vitro genetic toxicity testing. *Environ Mol Mutagen.* 2011; 52:177-204.
25. Rothfuss A, Honma M, Czich A, Aardema MJ, Burlinson B, Galloway S, et al. Improvement of in vivo genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing. *Mutat Res.* 2011; 723:108-20.
26. Hernandez LG, van Steeg H, Luijten M, van Benthem J. Mechanisms of non-genotoxic carcinogens and importance of a weight of evidence approach. *Mutat Res.* 2009; 682: 94-109.
27. Cohen SM, Arnold LL. Chemical carcinogenesis. *Toxicol Sci.* 2011; 120 Suppl 1:S76-92.
28. Yuan J, Minter-Dykhouse K, Lou Z. A c-Myc-SIRT1 feedback loop regulates cell growth and transformation. *J Cell Biol.* 2009; 185:203-11.
29. Herranz D, Munoz-Martin M, Canamero M, Mulero F, Martinez-Pastor B, Fernandez-Capetillo O, et al. Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat Commun.* 2010; 1:3.

Carcinogenic Compounds, 2-nitrofluorene and Clonidine Can Modulate the Level of Sirtuin mRNAs Expression in Human Adipose Tissue-derived Stem Cells

Jiyoun Lee¹, Chae-yeong Lee², Youngho Kwon¹, Hochan Kim³, Hyun Kim²

¹Department of Orthopedic Surgery, ²Department of Anatomy

³Department of Psychiatry, College of Medicine, Kosin University

Abstract : Sirtuins (SIRT) are involved in multiple cellular processes. And they are involved in cellular pathways related aging, cancer, and a variety of cellular functions including cell cycle, DNA repair and proliferation. Also they modulate life span. Stem cells have the ability to self-renew for unlimited proliferation and differentiate into various cell types. It has been a little known that the mutation of undifferentiated stem cells in tissue may result in the development of cancer cells by genotoxic carcinogens. Therefore, this study investigated whether some carcinogenic compounds can modulate the expression of sirtuin mRNA on human adipose-derived stem cells.

Adipose-derived stem cells (ADSC) were exposed to genotoxic carcinogenic compound (2-nitrofluorene, 2NF) and non-genotoxic carcinogenic compound (clonidine, CND) for 24 hours, 48 hours, 72 hours and 96 hours. The expression of SIRT1 mRNA increased on 72 hours. Expressions of SIRT2 and SIRT7 mRNA increased robustly on 48 hours. But all of SIRTs decreased to a level before a treatment of genotoxic compound on adipose-derived stem cells.

These results demonstrated that a treatment of genotoxic compound induced the expression of SIRT mRNA only in the short time. But their level returned to untreated cells on 96 hours. They suggest that the possibility that the sirtuins can retard the carcinogenesis of adipose derived stem cells.

Keywords : Sirtuin, Human adipose derived stem cells, 2-nitrofluorene, Clonidine