Volume 6, Number 1, April, 2003

Peroxisome proliferator-activated receptor γ 활성을 통한 성인 중간엽 줄기 세포의 지방 세포 분화 촉진

연세대학교 BK21 의과학사업단
연세대학교 의과대학 정형외과학교실[1]

김은정 · 김수향 · 김윤희[1] · 김성재 · 한수봉[1] · 이진우[1]

= Abstract =

Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Activation Promotes Adipogenesis in Human Mesenchymal Stem Cells

Eun Jung Kim, M.S., Su-Hyang Kim, M.S., Yun Hee Kim, M.S.[1], Sung-Jae Kim, M.D., Soo Bong Hahn, M.D.[1], Jin Woo Lee, M.D.[1]

Brain Korea 21 project for medical science, Yonsei University
Department of Orthopaedic Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea[1]

Purpose: In this study, we determined that the troglitazones could induce uniform adipogenesis of human mesenchymal stem cells (MSCs) within a short time in a dose- and a time-dependent manners.

Materials and Methods: Human MSCs were isolated from bone marrow and cultured in basal or adipogenic medium in the presence of 0~50 μM troglitazone for 5 days. Then we performed flow cytometry, RT-PCR and western blot analysis.

Results: In FACS assay, troglitazone induced adipocyte differentiation in a dose-dependent manner. At concentration of 25 μM troglitazone in adipogenic medium, over 50% of the cells differentiated into adipocytes at day 5. This was accompanied by increased mRNA levels for the adipocyte gene markers (LPL, aP2 and PPAR γ) in RT-PCR. In western blot analysis, we found that ERK phosphorylation was inhibited in the early stage of adipogenesis.

Conclusion: Through the addition of troglitazone as a PPAR γ agonist, we could get the uniform adipogenic differentiation within a short time. Thus, troglitazone directly regulates differentiation of human MSCs into adipocytes; induced PPAR γ expression may play a key regulatory role in this process. And we suggest a role for ERK as a regulatory switch for these differentiation pathways.

※ **통신저자: 이 진 우**
서울시 서대문구 신촌동 134번지
연세대학교 의과대학 정형외과학 교실
TEL: 02) 361-5640 FAX: 02) 363-1139 E-mail: ljwos@yumc.yonsei.ac.kr

* 본 연구는 21세기 프론티어 연구개발 사업인 세포응용연구사업단의 연구비 지원 (과제번호 성체 제 14과제)에 의해 수행되었음.

Key Words: Mesenchymal stem cell, Adipocyte, Peroxisome proliferator-activated receptor γ, Troglitazone, Mitogen activated protein kinase

서 론

골수 내에 존재하는 줄기 세포는 크게 조혈 줄기 세포(hematopoietic stem cell)와 중간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cell)로 나눌 수 있는데[7,11], 조혈 줄기 세포는 여러 가지 혈구 세포를 생산하는 세포인 반면에, 중간엽 줄기 세포는 자가 재생뿐만 아니라 다양한 결체 조직으로의 분화가 가능하여 골아 세포, 연골 세포, 지방 세포, 근육 세포, 신경 세포 등을 만들 수 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 특성을 가진 중간엽 줄기 세포의 지방 세포로의 유도 방법은 배양액에 dexamethasone[9], indomethacin, isobutyl-methylxanthin(IBMX), insulin, glucocorticoids와 같은 화학물질 혹은 cytokine과 같은 성장 인자들의 첨가나[8], 세포 내 신호전달에 관계하는 인자 조절[4,12] 등이 있다. 하지만, 이러한 방법들은 균일하게 지방 세포로 분화 시킬 수 없거나, 분화 시간이 오래 걸린다는 단점이 있다.

Troglitazone은 insulin sensitivity를 증가시키는 당뇨병 치료제로 알려져 있지만[1], 여러 보고에 의하면 troglitazone은 사람과 설치류에서 파골 세포 형성을 억제하는 문제[1], 장기간 투여 시간 독성을 일으키는 문제[3]를 가지고 있다. 체외 배양에서 troglitazone은 3T3-L1과 같은 지방 전구 세포를 지방 세포로 분화 시키는데 중요한 작용을 한다는 것이 보고되었고[6], 최근에는 이러한 troglitazone이 지방 세포의 가장 중요한 표지자이자 지방 세포 전사 인자인 peroxisome proliferator-activated receptor γ(PPAR γ)의 ligand로 작용한다는 것이 밝혀졌다[5]. 하지만 이러한 인자들이 중간엽 줄기 세포를 지방 세포로 분화 시키는데 어떻게 작용하는지에 대한 정확한 기전은 아직 밝혀져 있지 않고, 특히 성인의 골수로부터 채취한 중간엽 줄기 세포에서의 troglitazone의 역할은 잘 알려져 있지 않다.

중간엽 줄기 세포의 지방 세포로의 분화 시에는 mitogen-activated protein kinase(MAP Kinase) 경로를 통한 신호 전달이 중요한 역할을 한다고 하며, MAP Kinase 종류인 extracellular signal-regulated protein kinase(ERK)와 c-Jun N-terminal kinase(JNK), p38-reactivating kinase(p38)의 활성과 억제를 통해서 여러 세포로의 분화 조절이 가능하다고 알려져 있다[4]. Jaiswal[4]의 보고에 의하면, 중간엽 줄기 세포가 골아 세포로 분화될 때 ERK, p38이 인산화 되고, 이들의 억제제를 투여하게 되면 지방 세포로 분화가 된다고 하여 신호 전달 인자의 조절을 통한 세포 분화의 가능성을 시사하였다.

따라서 본 실험에서는 중간엽 줄기 세포를 단시간에 효율적으로 지방 세포로 분화 시키기 위하여 지방 세포 표지자 PPAR-γ의 항진제로 알려진 troglitazone을 첨가하여, 지방 세포로의 분화에 사용되는 troglitazone의 적정 농도와 분화 시간을 결정하고, 이러한 분화 과정에 있어서 나타나는 신호전달 기전을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 성인 중간엽 줄기 세포의 일차 배양

성인 공여자의 장골로 부터 얻은 골수 조직으로부터 Percoll gradient methods를 이용하여 성인 중간엽 줄기 세포들을 수집, 여기에 기본 배양액(10% 우태 혈청과 1% antibiotic-antimycotic 용액이 첨가된 Dulbeccos modified eagles medium-low glucose(DMEM-LG))을 첨가하여 일차 배양을 시킨 뒤 75 cm^2 culture flask에 90% 이상이 차게 되면 계대 배양시켰다. 계대 배양 21일 후 골수로부터 추출한 세포가 중간엽 줄기 세포인지를 확인하기 위하여 유세포 분석을 시행하였다. 유세포 분석 방법은 EDTA를 첨가하여 떼어낸 세포들을 5×10^5 cells/ml의 농도로 Phosphate-Buffered Saline에 부유하고 중간엽 줄기 세포에 양성과 음성을 보이는 각각의 항체(endoglin(CD105), the hyarluronic acid receptor(CD44), β1 integrin(CD29),

the early hematopoietic progenitor cell marker(CD34), the monocyte/macrophage marker(CD14), the leukocyte common antigen(CD45))(Ancell corporation, Bayport, MN, USA)를 첨가하여 45분간 실온에서 반응시켰다. 대조군으로 anti-mouse monoclonal(Ancell corporation) 항체를 5×10^5 cells/ml 농도의 세포에 더하여 45분간 실온에서 반응시켰다. 반응시킨 세포들은 FACScan(Becton Dickinson Instrument, San Jose, CA, USA) 상에서 분석하였다.

2. 항진제를 이용한 지방 세포 분화 촉진능 분석

기본 배양액 혹은 지방 세포 분화 배양액(10% 우태 혈청, 1% antibiotic-antimycotic 용액, 0.5 mM isobutyl-methylxanthin, 1 μM dexamethasone, 5 μg/ml insulin, 200 μM indomethasin을 첨가한 DMEM-LG)에 각각 0 μM, 5 μM, 10 μM, 25 μM, 50 μM의 troglitazone(Parke-Davis, Ann Arbor, NJ, USA)을 첨가하여 중간엽 줄기 세포에 넣어 5일간 배양하였다. 배양 후 지방 세포 표지자인 CD36(Beckman coulter, Marseille Cedex, France)을 이용한 유세포 분석, 역전사-중합효소 연쇄반응을 이용하여 지방 세포로의 분화 정도를 확인하여 troglitazone의 적정 농도를 정한 뒤, 정해진 농도로 14일간 배양하였다.

역전사-중합효소 연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction: RT-PCR)은 분화 시킨 세포로부터 RNase mini kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 사용하여 cDNA 합성에 사용될 total RNA를 분리한 후, 분광광도계를 사용하여 260 nm와 280 nm에서의 흡광도를 측정, 유출액 내의 total RNA를 정량한 뒤, total RNA 1 μg을 Omniscript kit(QIAGEN)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 각각 합성된 cDNA 2 μl에 10 pM의 sense primer와 10 pM의 antisense primer를 첨가한 후 Taq DNA polymerase kit(QIAGEN)의 정해진 용액과 섞어 최종 부피가 50 μl가 되게 하여 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 지방 세포 표지자인 lipoprotein lipase(LPL), fatty acids binding protein 2(aP2), PPAR-γ는 Genbank를 통해 염기 서열을 찾아내어 primer를 제작, 각각의 중합효소 연쇄반응 조건을 잡았다. 반응이 끝나면 반응액 중 10 μl를 취하여 1.5%(w/v) agarose gel 전기영동을 시행하여 확인하였다.

3. 중간엽 줄기 세포의 지방 세포로의 분화 시 신호 전달 양상

25 μM troglitazone이 첨가된 지방 세포 배양액에서 분화 시킨 세포를 lysis buffer(0.5% deoxycholic acid, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 50 mM Tris-Cl)를 함유한 25 mM Tris-HCl(pH 7.4)에 부유시켜 polytron homogenizer를 사용하여 세포 균질액을 만든 뒤, Bradford 방법[10)]으로 단백질 정량을 실시하였다.

세포 추출액을 12%의 polyacrylamide gel(polyacrylamide: bis-acrylamide =29:1)을 사용하여 130 V에서 2 시간동안 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 Western Blotter로 3시간동안 350 mA의 전류를 흘려 단백질들을 gel로부터 nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA)으로 옮긴 다음 nitrocellulose filter를 5% 무지방 우유를 함유한 1X TBST(100 mM Tris(pH 7.5), 1.5 M NaCl, 0.5% Tween-20) 용액으로 1시간동안 blocking하였다. Nitrocellulose membrane에 일차 항체를 실온에서 3시간 동안 부착시킨 다음 1X TBST로 세척한 뒤 이차 항체를 첨가하여 실온에서 한 시간 동안 부착시켰다. 이 후 ECL western blotting detection kit(Amersham Pharmacia)을 사용하여 제조 회사의 지침에 따라 membrane에 용액을 부어주었으며, plastic film으로 덮어준 뒤 x-ray 필름을 사용하여 현상하였다. Western blot에 사용한 일차항체는 p-ERK, ERK, p-JNK, JNK, p-p38, p38(Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA)이었으며 희석비율은 1:3500 이었고, 이차 항체인 anti-mouse monoclonal

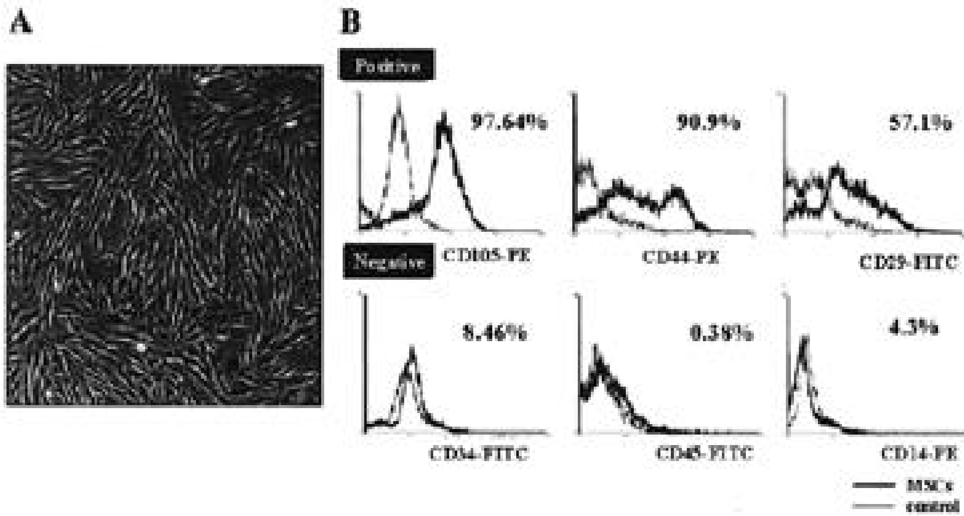

Fig. 1. Morphology and flowcytometric characterization of mesenchymal stem cells isolated from bone marrow. The MSCs formed an adherent layer with a typical fibroblastic morphology at 7 days after primary culture (X100). In flowcytometry, MSCs were stained positively with CD105 (97.64 %), CD44 (57.1 %), CD29 (90.9 %) and stained negatively with CD34 (8.46 %), CD45 (0.38 %), CD14 (4.3 %), so we can determined that the cells which were isolated from bone marrow were mesenchymal stem cells.

antibody, anti-rabbit monoclonal antibody(Santa Cruz)와 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)의 희석 비율은 1:5000이었다. Western blotting을 통해 얻은 결과를 TINA program(Raytest Isotopenmessgeraete, Straubenhardt, Germany)을 이용하여 각각의 강도비를 계산하였다.

결 과

1. 성인 중간엽 줄기 세포의 일차배양

성인 공여자의 장골로 부터 얻은 골수 조직으로부터 Percoll gradient methods를 이용하여 중간엽 줄기 세포들을 수집한 뒤 기본 배양액을 첨가하여 75 cm^2 flask에 세포들을 일차 배양시켰다. 성인 중간엽 줄기 세포는 일차 배양한 시기로부터 약 7일정도 지나면 flask에 붙기 시작하며, 세포의 모양은 섬유모세포와 유사한 길쭉한 형태로 관찰되었다.

유세포 분석 결과, 중간엽 줄기 세포의 양성 표지자로 알려진 CD105, CD44, CD29에서 각각 97.64%, 57.1%, 90.9%가 염색이 되었고, 음성 표지자로 알려진 CD34, CD45, CD14에서는 각각 8.46%, 0.38%, 4.3%가 염색이 되어 성인의 골수 조직으로부터 분리해 낸 세포가 중간엽 줄기 세포임을 확인하였다(Fig 1).

2. 항진제를 이용한 지방 세포 분화 촉진능 분석

기본 배양액과 지방 세포 분화 배양액에 0 μM, 5 μM, 10 μM, 25 μM, 50 μM의 troglitazone을 각각 첨가하여 5일간 배양한 후 유세포 분석, 역전사-중합효소 연쇄반응을 실시하여 항진제를 이용하였을 때 지방 세포 분화 촉진능을 확인하였다.

유세포 분석 결과, troglitazone의 농도가 증가할수록 지방 세포 표지자인 CD36의 염색이 증가하였고, 기본 배양액 보다는 지방 세포 분화 배양액에 troglitazone을 첨가하였을 때 더 많은 세포들이 지방 세포로 분화됨을 확인할 수 있었다. 특히 지방 세포 분화 배양액에 25 μM의 troglitazone을 첨가하여 5일간 배양하였을 때 지방 세포로의 분화가 50% 이상이 되었고, 50 μM의 troglitazone을 첨가하였을 때는 배양 배지에 상

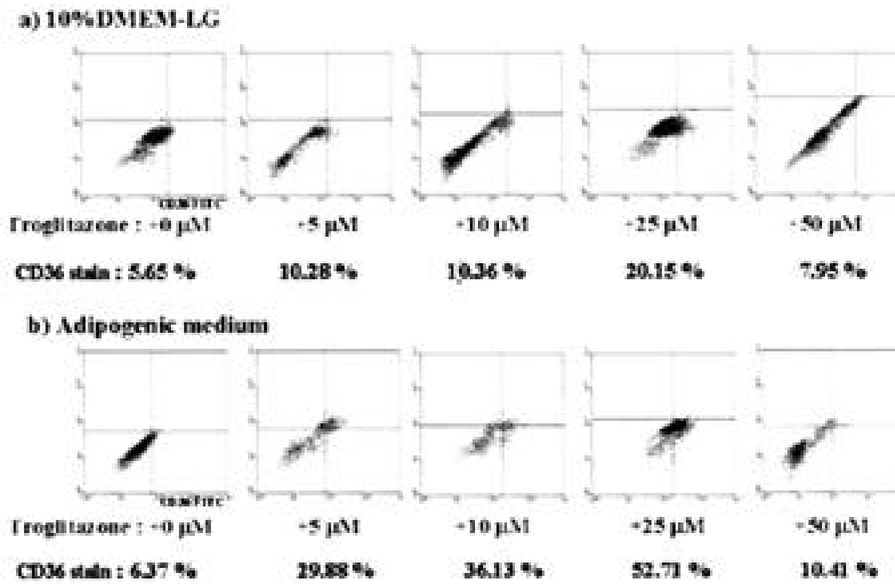

Fig. 2. Flow cytometry analysis of human MSCs adipogenesis in response to troglitazone compounds. Confluent, quiescent cultures of MSCs were induced with the 0~50 μM troglitazone compounds in 10% DMEM-LG or adipogenic mediums for 5 days. Then, the cells were stained with the CD36, adipocyte specific marker, and monitored by FACScan. In FACS assay, troglitazone induced adipocyte differentiation in a dose-dependent manner. At concentration of 25 (M troglitazone in adipogenic medium, over 50 % of the cells differentiated into adipocytes at day 5.

관없이 CD36의 염색도가 10% 이하로 줄었으며 세포의 괴사가 일어났다(Fig 2).

역전사-중합효소 연쇄반응을 실시한 결과 배양 배지에 상관없이 troglitazone의 농도가 0 μM에서 25 μM로 증가할수록 지방 세포 발현 유전자인 LPL, aP2, PPAR-γ의 발현이 증가하였고, 50 μM의 troglitazone을 첨가하였을 때는 배양 배지에 상관없이 발현 유전자들의 양이 줄어들었다. 특히 troglitazone 농도나 배지의 변화에 따라 지방 세포 발현 유전자인 LPL, aP2는 거의 변화가 없는 반면에 PPAR-γ는 농도에 비례하여 그 양이 증가함을 알 수 있어서, troglitazone은 여러 지방 세포에서 발현하는 유전자 중 PPAR-γ와 밀접한 관련이 있음을 확인할 수 있었다(Fig 3). 25 μM의 troglitazone을 지방 세포 분화 배양액에 넣어 0, 3, 7, 14일간 배양한 뒤, 역전사-중합효소 연쇄반응을 실시한 결과 지방 세포 발현 유전자인 LPL, aP2는 분화 초기 3일 내에 발현양이 포화되어 시간에 따른 변화가 거의 없는 반면에 PPAR-γ는 시간에 비례하여 그 양이 증가함을 확인할 수 있었다(Fig 4).

3. Western blot 분석을 이용한 신호 전달 기전 확인

중간엽 줄기 세포로부터 지방 세포로 분화 시켰을 때 단백질 상에서의 신호 전달 인자 변화 양상을 확인하기 위한 western blot 분석 결과, ERK와 p-ERK, p38만이 단백질 상에서 표현되고, p-p38, JNK, p-JNK는 발현하지 않았다. 특히 p-ERK는 분화하지 않은 중간엽 줄기 세포에서는 발현 되었으나, 지방 세포로 분화가 시작되면서 발현되지 않다가 지방 세포로의 분화 12시간 이후부터 다시 발현하기 시작하여 이후 지방 세포로의 분화 기간동안 계속 발현하는 것을 확인할 수 있었다. ERK와 p38의 발현 양상은 시간에 관계없이 변화가 없었다(Fig 5).

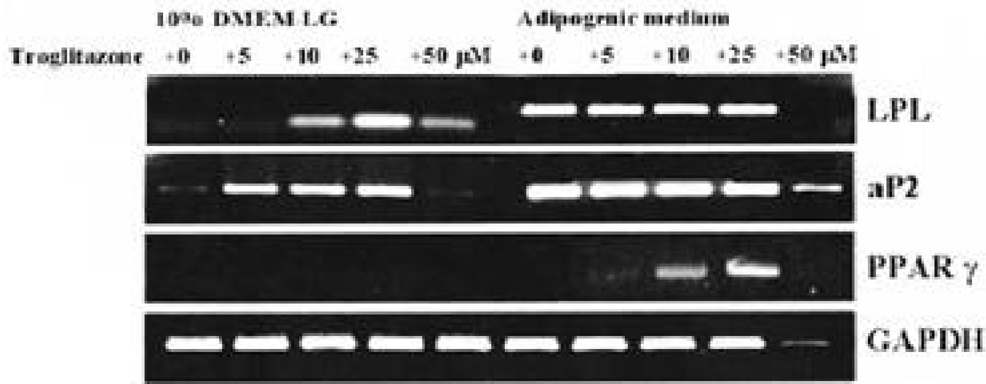

Fig. 3. Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of human MSCs adipogenesis in response to troglitazone compounds. Confluent, quiescent cultures of MSCs were induced with the 0~50 μM troglitazone compounds in 10% DMEM-LG or adipogenic mediums for 5 days. Equal aliquots of total RNA were reverse transcribed and amplified with oligonucleotide primers specific for lipoprotein lipase (LPL), fatty acids binding protein 2(aP2), peroxisome proliferator-activated receptor γ(PPAR-γ). Based on quantification relative to the GAPDH, PPAR(mRNA induction was achieved maximum at concentration of 25 (M troglitazone in adipogenic medium.

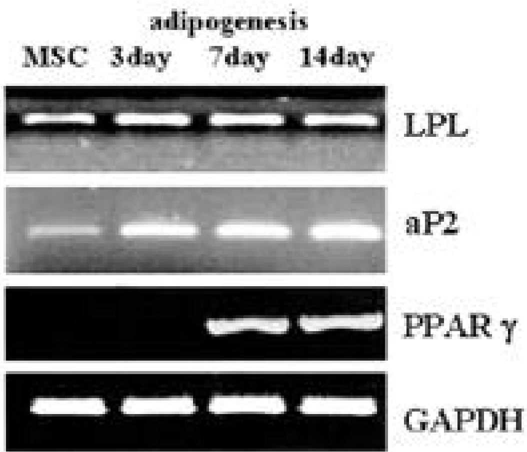

Fig. 4. Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of adipogenic human MSCs. Confluent, quiescent cultures of MSCs were induced with the 25 μM troglitazone compounds in adipogenic mediums for 14 days. Equal aliquots of total RNA were reverse transcribed and amplified with oligonucleotide primers specific for lipoprotein lipase (LPL), fatty acids binding protein 2(aP2), peroxisome proliferator-activated receptor γ(PPAR-γ). Based on quantification relative to the GAPDH, PPAR(mRNA induction was achieved saturation at day 7. The LPL and aP2 mRNA expression did not change.

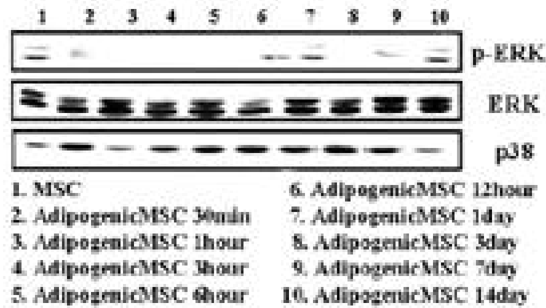

Fig. 5. Western blot analysis of adipogenic human MSCs. To characterize the molecular mechanisms that regulate adipogenic differentiation, we examined the contribution of MAP kinase family members, ERK, JNK, and p38. Treatment of these stem cells with adipogenic supplements with 25 (M troglitazone resulted in a decreased phase of p-ERK activation from 30 minutes to 12 hour that coincided with differentiation. JNK and p38 does not expressed in western blot analysis. Based on our finding of the inverse regulation of adipogenesis by MAPK in human MSCs, we suggest a role for ERK as a regulatory switch for these differentiation pathways.

고 찰

중간엽 줄기 세포를 지방 세포로 단시간에 다량으로 분화 시키기 위한 방법 중의 하나는 지방 세포 단계에서 가장 중요한 전사 인자인 PPAR-γ의 발현을 촉진시키는 것이다[13]. 중간엽 줄기 세포가 지방 세포로 분화 되는 기전은 세포 외부의 여러 자극이나 항진제들이 세포 내부로 ligand 형태로 들어가게 되면 세포 내 핵막에 존재하는 PPAR-γ와 결합하게 되고 이것은 다시 retinoid x receptor(RXR) heterodimerization이 일어나게 되면서 target gene의 PPAR response elements(PPREs)를 자극하게 되어 지방 세포로의 분화를 촉진 시킨다고 알려져 있다[2]. 따라서 본 연구에서는 중간엽 줄기 세포를 지방 세포로 분화 시키는 이전의 많은 방법들과 차별되게 PPAR-γ의 항진제인 troglitazone을 이용하여 성인의 중간엽 줄기 세포를 지방 세포로 분화 시켰다.

실험 결과, troglitazone을 중간엽 줄기 세포에 첨가하면 지방 세포 분화 유도 배지 만을 첨가한 군에 비하여 지방 세포로의 분화가 가속화 됨을 확인할 수 있었다. 특히 역전사 중합 효소 반응 결과에서 보면, troglitazone 농도 변화에 여러 지방 세포 표지자인 LPL, aP2 등은 거의 변화가 없는 반면에 PPAR-γ는 농도에 비례함을 알 수 있어서, troglitazone은 여러 지방 세포에서 발현하는 유전자 중 PPAR-γ와 밀접한 관련이 있음을 확인할 수 있었다(Fig 3). 일반 배지에 troglitazone을 첨가하여 지방세포로의 분화를 유도할 때 PPAR-γ가 LPL과 aP2 발현에도 불구하고 발현되지 않은 것은 PPAR-γ는 지방세포 분화기간에서 중기 이후에 발현하기 때문이다. 이것은 일반 배지 상태에서는 preadipocyte로는 분화하지만 그이후의 분화는 어렵다는 것을 확인할 수 있다. 하지만 이러한 troglitazone은 체외 배양 시 중간엽 줄기 세포의 지방 세포화를 촉진시키는 장점 이외에도[6], 몇몇 보고에 의하면 사람과 설치류에서 파골 세포 형성을 억제하는 문제, 장기간 투여시 간 독성을 일으키는 문제[3]를 가지고 있다. 이러한 결과를 보건데, 골 조직 대사에 있어서 troglitazone이 미치는 영향에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것이다.

중간엽 줄기 세포의 지방 세포로의 분화 과정에서의 신호전달 기전을 western blot 분석을 통하여 확인한 결과에서는, p-ERK, ERK, p38만이 발현되고 p-JNK, JNK, p-p38은 발현하지 않았다. 특히 p-ERK의 경우에는 지방 세포 분화 초기 12시간까지는 억제되었다가 다시 발현함을 알 수 있어서 ERK가 지방 세포 분화에 직접적으로 관여함을 알 수 있었다. 즉, 줄기 세포로부터 지방 세포로의 분화 초기 ERK의 인산화 억제가 필수적이지만, 12시간 이후 ERK의 인산화는 지방 세포 분화에 커다란 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있었다. 또한 Troglitazone에 의해 PPAR-γ의 활성이 초기 지방세포 분화에서 ERK의 활성을 조절한다는 것을 증명하기 위해 troglitazone이 없는 배양액에서의 ERK활성 실험을 진행중이다.

중간엽 줄기 세포의 한 단계 위의 기원으로 알려져 있는 배아 줄기 세포와 중간엽 줄기 세포와의 지방 세포로의 분화 기전은 공통점이 있는 동시에 차이점도 보이고 있다. 즉, 두 세포 다 MAP kinase를 통하여 신호가 전달된다는 것은 공통점이지만, 배아 줄기 세포에서는 troglitazone의 영향을 전혀 받지않고, retinoic acid를 통하여 지방 세포 분화가 가속화되는 차이가 있다[2]. Jaiswal[4]의 보고에 의하면, 중간엽 줄기 세포에서는 MAP kinase의 일종인 ERK의 인산화가 지방 세포로의 분화를 억제한다고 한 반면에, Bost[2]의 보고에 의하면 retinoic acid의 첨가로 인한 배아 줄기 세포의 지방 세포로의 분화 시, ERK가 인산화 된다고 보고하여 중간엽 줄기 세포와 배아 줄기 세포의 지방 세포로의 분화와 ERK의 인산화 관계는 반대로 나타나는 것을 알 수 있다. 따라서 중간엽 줄기 세포와 이 세포의 기원인 배아 줄기 세포는 지방 세포 분화 시기에 따라 영향을 받는 항진제도 다르고, 신호 전달 인자인 ERK의 영향도 다르지만, 두 세포 다 지방 세포로의 분화 초기에 ERK의 영향을 받는다는 것을 알 수 있어, 이러한 중간엽 줄기 세포나 배아 줄기 세포의 지방 세포 분화에서의 항진제, 신호 전달 기전이 미치는 영향에 대한 연구가 더 진

행되어야 할 것이다.

결 론

본 연구에서 중간엽 줄기 세포는 troglitazone의 농도와 배양 시간에 비례하여 지방 세포로 분화함을 확인할 수 있었다. 특히 지방 세포 발현 유전자 중 PPAR-γ가 troglitazone 농도와 시간에 따라 발현양이 크게 증가됨을 알 수 있어, troglitazone은 사람의 중간엽 줄기 세포를 지방 세포로 분화 시 첨가하면 시간을 단축시킬 수 있고, 특히 PPAR-γ를 활성화 시키는 효과적인 물질로써 유용할 것으로 사료된다. 또한 troglitazone에 의한 PPAR-γ의 활성은 초기 ERK 활성의 억제를 유도하지만 이후에는 큰 역할을 하지 못함을 알 수 있어서 초기 ERK 인산화 억제가 중간엽 줄기 세포의 지방 세포로의 분화에 중요한 역할을 함을 알 수 있었다.

REFERENCES

1) **Beresford JN, Gallagher JA, Poser JW and Russell RG**: Production of osteocalcin by human bone cells in vitro. Effects of 1,25$(OH)_2D_3$, 24,25$(OH)_2D_3$, parathyroid hormone and glucocorticoids. *Metab Bone Dis Rel Res*, 5:229-234, 1984.
2) **Bost F, Caron L, Marchetti I et al.**: Retinoic acid activation of the ERK pathway is required for embryonic stem cell commitment into the adipocyte lineage. *Biochem J*, 361:621-627, 2002.
3) **Gaal LV and Scheen AJ**: Are all glitazones the same?. *Diabetes Metab Res Rev*, 18:S1-S4, 2002.
4) **Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, Mbalaviele G, Marshak DR and Pittenger MF**: Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 275:9645-9652, 2000.
5) **Lydia T, Danielle G, Laurence S, Hidekuni I, Ez ZA and Paul AG**: Thiazolidinediones and fatty acids convert myogenic cells into adipose-like cells. *J Biol Chem*, 270:28183-28187, 1995.
6) **Mbalaviele G, Jaiswal R, Pittenger MF et al.**: Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-γpathway inhibits osteoclast differentiation. *J Biol Chem*, 275:14388-14393, 2000.
7) **Minguell JJ, Erices A and Conget P**: Mesenchymal Stem Cells. *Exp Biol Med*, 226:507-520, 2001.
8) **Nuttall ME and Gimble JM**: Is there therapeutic opportunity either prevent or treat osteopenic disorders by inhibiting marrow adipogenesis? *Bone*, 27:177-184, 2000.
9) **Parhami F, Jackson SM, Tintut Y, Balucan JP, Territo M and Demer LL**: Atherogenic diet and minimally oxidized low density lipoprotein inhibit osteogenic and promote adipogenic differentiation of marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*, 14:2067-2078, 1999.
10) **Persson L, Bergstrom J, Gustafsson A and Asman B**: Tobacco smoking and gingival neutrophil activity in young adults. *J Clin Periodont*, 26:9-13, 1999.
11) **Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al.**: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284:143-146, 1999.
12) **Schiller PC, Dippolito G and Brambilla R**: Inhibition of Gap-Junctional communication induces the transdifferentiation of osteoblasts to an adipocytic phenotype. *J Biol Chem*, 276:14133-14138, 2001.
13) **Tontonoz P, Hu E and Spiegelman BM**: Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR-γ2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, 79:1147-1156, 1994.