

석사학위논문

3T3-L1 지방세포의 분화에 미치는
Hesperetin의 영향



제주대학교 대학원

생명과학과

진영준

2003년 12월

3T3-L1 지방세포의 분화에 미치는 Hesperetin의 영향

지도교수 : 김 세 재

진 영 준

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함



진영준의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ 印

위 원 _____ 印

위 원 _____ 印

제주대학교 대학원

2003년 12월

The Effect of Hesperetin on 3T3-L1
Preadipocyte Differentiation

Young-June Jin
(Supervised by Professor Se-Jae Kim)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE

Department of Life Science
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2003. 12

ABSTRACT

Hesperetin belongs to the class of flavonoids, called flavanones, which are abundant in Citrus fruits. Hesperetin is derived from the hydrolysis of its aglycone, hesperidin. It has been reported that hesperetin has a pharmacological effects such as anti cancer activity, lipid-lowering efficacy. In this study, The effects of hesperetin on the lipid accumulation and PPAR- γ expression were investigated during adipocyte differentiation. Also, the effect of hesperetin on the ERK activation in proliferating preadipocyte were analyzed. We observed as follows ; 1) Hesperetin inhibited dose-dependently activation of phospho-ERK 1 and 2 in stimulated 3T3-L1 with insulin. 2) Hesperetin reduced significantly the PPAR- γ expression during adipogenesis of 3T3-L1 preadipocyte. 3) The accumulations of triacylglyceride in hesperetin-treated cells was to be decreased as comparing with those in no treated-cells. 4) Hesperetin inhibited dose-dependently cell proliferation of 3T3-L1 preadipocyte. These results suggest that hesperetin inhibit the differentiation of 3T3-L1 preadipocyte.

Key word: Flavonoid, Hesperetin, 3T3-L1, Adipogenesis, MAPK signaling pathway. PPAR- γ

목 차

ABSTRACT	i
목 차	ii
LIST OF TABLES	iii
LIST OF FIGURE	iv
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 세포 배양	
2. Cell differentiation	
3. MTT assay	
4. Immunoblotting assay	
5. Oil Red O staining	
6. RNA 분리 및 RT-PCR	
III. 결 과	9
1. 3T3-L1 지방세포 증식에 미치는 hesperetin의 영향.	
2. ERK 1/2 활성화에 미치는 hesperetin의 영향.	
3. 지방세포 분화과정에서 중성지방 형성에 미치는 hesperetin의 영향.	
4. 지방세포 분화과정에서 PPAR- γ 발현에 미치는 hesperetin의 영향.	
IV. 고 찰	18
V. 인 용 문 헌	21
VI. 적 요	27

LIST OF TABLE

Table 1. Nucleotide sequences of primers used in this study 8



LIST OF FIGURES

Figure 1. Chemical structure of flavonoid	3
Figure 2. 3T3-L1 preadipocyte differentiation and activation of PPAR- γ	4
Figure 3. Effect of hesperetin on 3T3-L1 preadipocyte proliferation	11
Figure 4. Photomicrographs of hesperetin-treated 3T3-L1 preadipocyte ..	12
Figure 5. Effect of hesperetin on ERK 1/2 activity of 3T3-L1 preadipocyte in a time-dependent manner	13
Figure 6. Effect of hesperetin on ERK 1/2 activity of 3T3-L1 preadipocyte in a dose-dependent manner	14
Figure 7. Oil Red O staining of triacylglycerol in 3T3-L1 preadipocyte differentiation	15
Figure 8. Effect of hesperetin on PPAR- γ expression during 3T3-L1 preadipocyte differentiation using RT-PCR	16
Figure 9. Effect of hesepretin on PPAR- γ expression during 3T3-L1 preadipocyte differentiation using immunoblotting	17

I. 서론

식물의 열매, 야채, 견과류, 잎, 꽃, 나무껍질 등에 함유되어 있는 플라보노이드는 flavanone, flavone, flavonol, isoflavone, catechin 등과 같은 polyphenolic 화합물 (Mouly *et al.*, 1994 ; Rouseff *et al.*, 1987)로, 세포 성장조절, 세포사멸 효과(Kuo., 1996), 항산화 효과(Robak J *et al.*, 1988), estrogenic 효과(Miksicek *et al.*, 1993), 그리고 antiestrogenic(Le bail *et al.*, 1998 ; Molteni *et al.*, 1995) 등과 같은 생리활성을 갖는다. 플라보노이드 구조는 2-phenyl-benzo 혹은 flavan nucleus로 구성되어 있고, nucleus는 oxygen-containing pyrane ring으로 연결된 두개의 benzene 고리로 이루어져 있다(Silalahi., 2002, Figure 1.A). Genistein, hesperidin, hesperetin, naringin, naringenin등은 대표적인 플라보노이드로써 혈중 콜레스테롤의 농도를 감소시키는 약리작용을 가진다고 보고 된 바 있다(Monforte *et al.*, 1995 ; Bok *et al.*, 1999 ; Lichtenstein., 1998).

백색지방조직 (white adipose tissue)은 고등동물에 중요한 에너지원이지만 과잉 생성되면 비만이 되어 type 2당뇨병(non-insulin-dependent diabetes mellitus)과 고혈압, 동맥경화 같은 심장질환의 주요 요인이 된다(Must *et al.*, 1999). 비만과 type 2 당뇨병 연구에 널리 사용되고 있는 3T3-L1 전지방세포(preadipocyte)는 Confluence 상태에 이르면, 세포 분열을 정지하고 mitotic clonal expansion을 형성하여 지방 조직 분화에 필요한 유전자 발현이 유도된다(Figure 2.A). 3T3-L1 전지방세포는 우태 아혈청(Fetal Bovine Serum)이 있는 조건에서는 자연적인 분화가 일어나지만, insulin, dexamethasone, isobutylmethylxanthine을 처리하면 지방세포 분화가 현저하게 촉진 된다(MacDougald *et al.*, 1995 ; Gregoire *et al.*, 1998 ; Cowherd *et al.*, 1999).

Insulin은 신진대사에 중요한 호르몬으로, 생체 내에서 지방 조직을 축적시키는 역할을 한다(Zhang *et al.*, 1996). Insulin은 insulin 수용체에 의해 매개되는 Ras-MAPK (Mitogen-activated protein kinase) 신호전달 경로를 거쳐 전지방세포를 지방세포로 분화되도록 작용한다(Smith *et al.*, 1988). 세포신호 전달 과정에서 p44/p42 extracellular signal-regulated kinase(ERK1/2)는 extracellular signal-regulated kinase kinase(MEK1)에 의해 threonine 과 tyrosine 잔기가 인산화 되어 활성화되며, 활성화된 ERK1/2는 하루 전사인자들의 활성을 조절함으로써 세포 증식, 세포 분화, anti-apoptosis에 관여한다고 알려져 있다(Ceresa *et al.*, 1998 ; Avruch.,

1998 ; Downward., 1994). 지방세포 분화과정에서는 활성화된 ERK가 peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR- γ)의 발현을 활성화시켜 지방분화를 유도한다(Zhang *et al.*, 1996 ; Camp *et al.*, 1997 ; Prusty *et al.*, 2002). PPAR- γ 는 retinoic acid-like receptor(RXR)와 이합체(heterodimer)를 형성하여 표적유전자의 peroxisome proliferator response elements(PPRE)에 결합함으로써 해당유전자의 전사를 촉진시킨다(Tontonoz *et al.*, 1994 ; Houseknecht *et al.*, 2002 ; Figure 2.B). 지질대사와 밀접하게 관련되는 phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), lipoprotein lipase (LPL), fatty acid binding protein (aP2), uncoupling protein 1 (UCP1) 등은 PPAR- γ 에 의해 전사가 조절된다고 알려져 있다(Tontonoz *et al.*, 1994, 1995 ; Schoonjans., 1996 ; Ross *et al.*, 1990 ; Sears *et al.*, 1996).

Hesperidin은 flavanone에서 rhamnose와 glucose가 한 분자씩 결합된 glycoside형태로, 녹색식물의 열매에 높은 농도로 존재하며(Higby., 1941), 여기에서 당이 가수분해 되면 hesperetin이라는 aglycone 형태가 된다(Budavari *et al.*, 1989 ; Figure 1.B). 제주산 감귤에 풍부하게 함유되어 있는 hesperetin은 항염 효과(Rotelli *et al.*, 2003), 암세포의 세포사멸 작용(Chen *et al.*, 2003), 그리고 간 조직에서 중성지방과 혈장 내 콜레스테롤의 감소 효능(Kim *et al.*, 2003 ; Cha., 2001) 등과 같은 생리활성을 나타낸다는 보고는 있지만, 지방세포 분화와 관련하여 연구된 바는 없다.

본 연구에서는 지방세포 분화와 hesperetin의 분자적 상호작용기전을 이해하는데 기초 자료를 제공하기 위하여 3T3-L1 지방세포 분화에 미치는 hesperetin의 영향을 분석하였다.

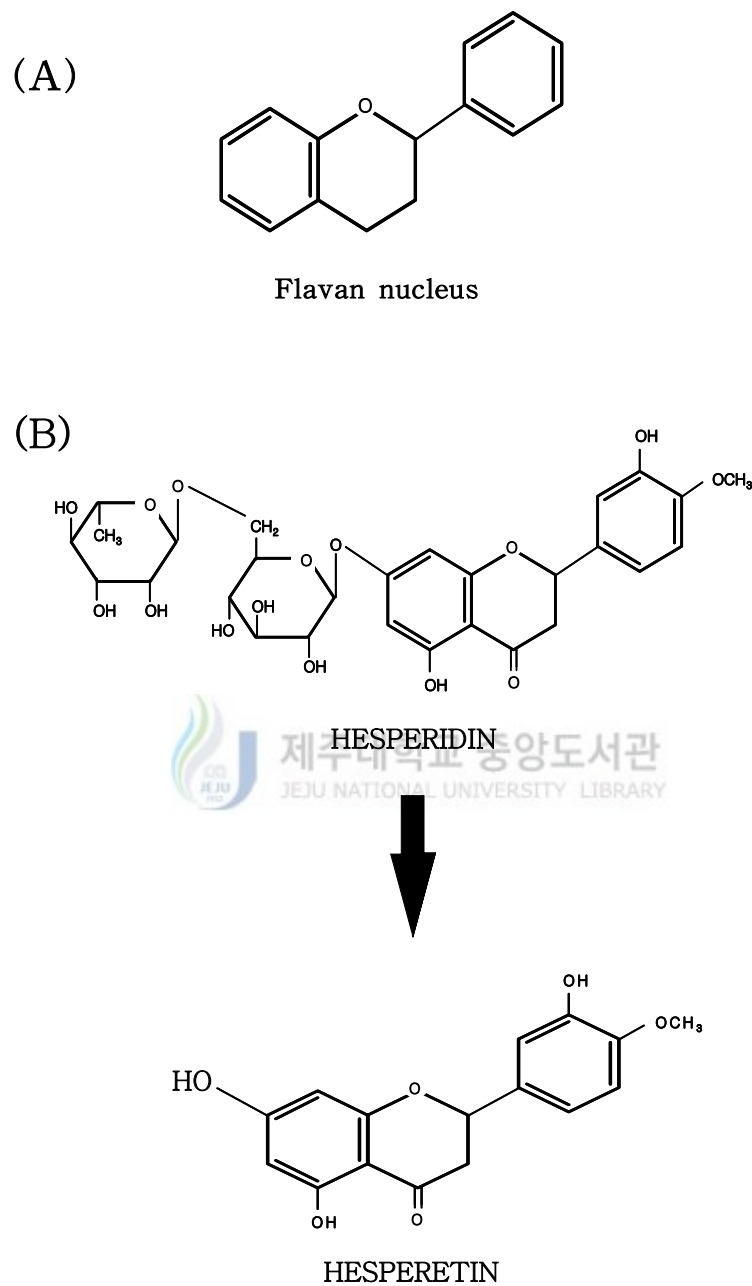


Figure 1. Chemical structure of flavonoid. (A) Structure of flavan nucleus. (B) Hesperetin is derived from the hydrolysis of its aglycone, hesperidin.

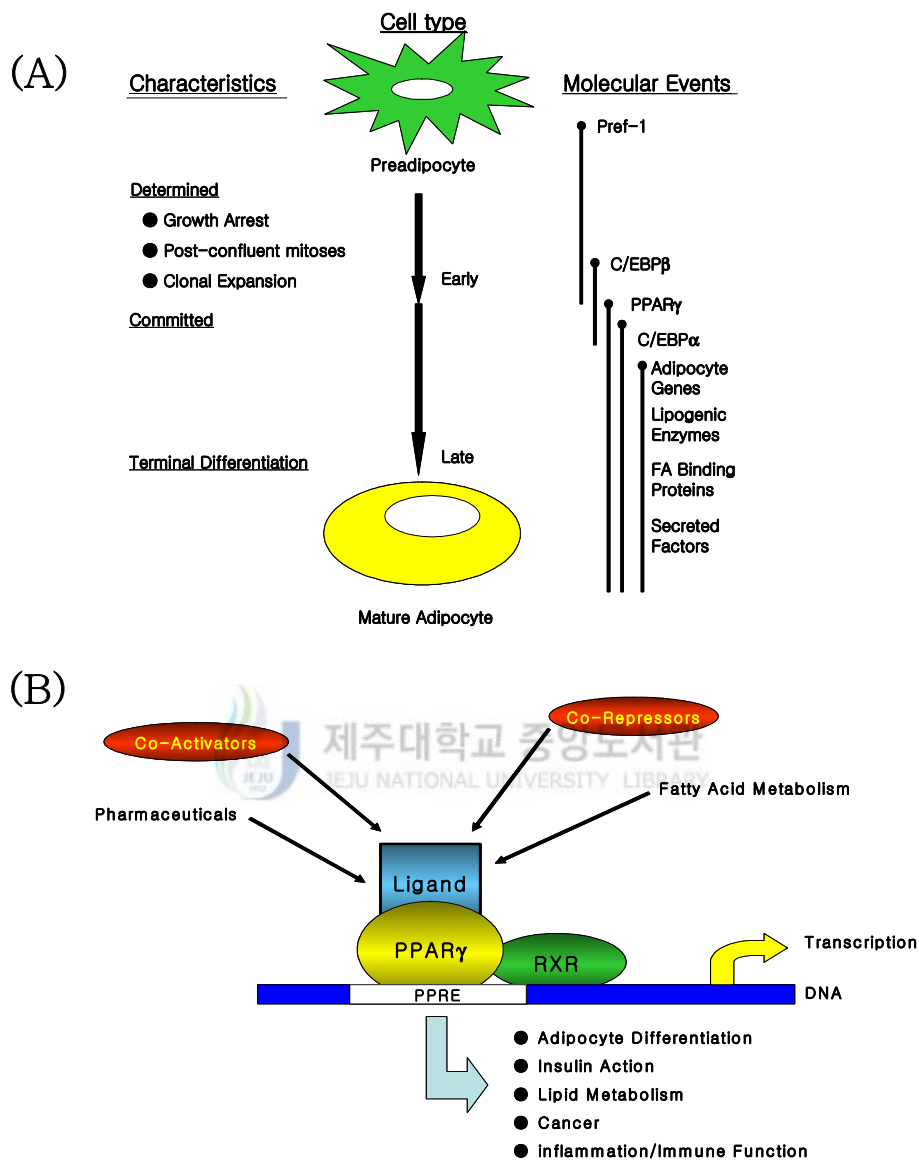


Figure 2. 3T3-L1 preadipocyte differentiation and activation of PPAR- γ . (A) Overview of stages in adipocyte differentiation. (B) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma(PPAR- γ).

II. 재료 및 방법

1. Cell culture

3T3-L1 전지방세포(American Type Culture Collection)는 10% 우태아혈청(Sigma)과 1% penicillin-streptomycin(penicillin 10,000U/ml, streptomycin 10,000 μ g/ml; Gibco BRL.)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle media(DMEM; Gibco BRL.)을 이용하여 5% CO₂ 와 37°C 조건에서 배양하였다. 세포는 4일 마다 기존 배지를 제거하고 1×PBS로 세척한 뒤 Trypsin-EDTA(Gibco BRL.)로 세포를 수확하여 원심분리한 후 새로운 배지로 희석하여 계대 배양하였다.

2. Cell differentiation

지방세포로 분화를 유도하기 위하여 3T3-L1 전지방세포 (1.0×10⁵ cells/ml)를 24시간 동안 배양한 후, IDX(10 μ g/ml insulin, 0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 0.5 μ M dexamethasone)를 처리하였고, 배양 48시간이후 다시 IDX를 반복 처리하여 총 4일 동안 배양하였다.



3. MTT assay

세포 생존율에 미치는 hesperetin의 영향을 분석하기 위해서 3T3-L1 전지방세포를 96well plate(1.0×10⁴ cells/well)에 24시간 동안 배양한 후 일정 농도의 hesperetin(100 μ g/ml ~ 12.5 μ g/ml)을 첨가하여 72시간 동안 배양하였다. 배양세포에 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT; Sigma) 50 μ l를 첨가하여 4시간 동안 배양한 후 생성된 formazan을 DMSO 150 μ l에 녹여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. Immunoblotting assay

1) Protein 분리 및 정량

배양된 세포는 수거하여 원심분리한 후 상층액을 제거한 후 1×PBS를 첨가하여 4°C, 14000rpm에서 1분 동안 원심분리하여 세척하였다. 세척된 세포는 lysis buffer(50mM Tris-HCl(pH7.5), 150mM NaCl, 1% Triton, 10% Glycerol, 1mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF, β -Glycerophosphate, Sodium pyrophosphate)에

녹인 후 균질화시켜 -20℃에 보관하였다. 단백질량은 bradford protein assay 방법으로 정량하였다.

2) Immunoblotting

배양세포로부터 얻은 단백질을 시료는 10% SDS-PAGE(Amersham)로 전기영동으로 분리하고, 전이용액(48mM Tris, 39mM glycine, 20% v/v methanol, pH 9.2)을 사용하여 단백질을 nitro cellulose membrane으로 80mA로 1시간동안 전이시켰다. 면역염색을 위해 nitro cellulose membrane를 TBST(50mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 0.05% Tween-20)/3% skim milk으로 30분 동안 blocking 하였으며 TBST/3% egg albumin으로 1차 항체를 1:1000비율로 희석하여 4℃에서 24시간동안 반응시켰다. TBST buffer로 세척 후 HRP-conjugated secondary antibody를 1:1000비율로 희석하여 TBST/3% skim milk에 혼합하여 1시간동안 실온에서 반응하였고 TBST buffer로 세 번 세척 후 ECL kit(Amersham)를 사용하여 X-ray 필름으로 현상하였다. 각각의 일차 항체 phospho-p44/42 MAPK antibody, p44/42 MAPK antibody(Cell signaling), PPAR- α (Santa Cruz), mice β -actin(Sigma)을 사용하였고, 이차 항체는 anti-rabbit, anti-mouse antibody(Sigma)를 사용하였다.

6. Oil Red O staining

지방 세포로 분화가 유도된 세포를 1×PBS로 2번 세척하고 10% formalin/1×PBS로 30분 동안 고정시켰다. 고정시킨 후 증류수로 세척하였고 Oil Red O(Sigma) 염색약으로 1시간동안 실온에서 염색시켰다. 그 후 증류수로 2번 세척하여 mayer's Hematoxylin으로 1분 동안 대조염색한 후 90% Glycerol/1×PBS로 마운팅하여 현미경으로 검경하였다.

7. RNA 분리 및 RT-PCR

1) RNA 분리 및 정량

RNA를 분리하기 위해 배양된 세포의 배지를 제거하고 Tri-zol(Molecular research center. inc)을 첨가하여 피펫팅으로 균질화시켰다. 균질화된 세포를 마이크로 튜브에 옮긴 후 클로로포름을 첨가하여 세게 흔들어 주었고 실온에서 15분

동안 방치했으며 4°C, 12,000g에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 새 튜브에 옮기고 동량의 이소프로판올을 첨가하여 침전시킨 다음 12,000g에서 10분 동안 원심분리를 하여 RNA를 pellet을 얻었다. RNA는 75% EtoH/DEPC 처리된 물을 첨가한 다음 8000g에서 8분 동안 원심분리하여 세척한 후 실온에서 건조시켰다. RNA는 DEPC로 처리된 물에 녹여 260nm에서 흡광도로 측정하여 정량 하였고, cDNA를 합성할 때 까지 -70°C에서 보관하였다.

2) cDNA 합성

cDNA imProm-II RT system kit(promega)로 사용하여 합성하였다. RNA 1 μ g를 nuclease-free water, 0.5 μ g/ μ l oligo(dT) 프라이머 1 μ l를 첨가하여 최종 5 μ l의 부피를 만든 후 70°C에서 5분간 가열하여 annealing 한 다음 즉시 얼음속에 넣고, 역전사 반응을 하기 위해 nuclease-free water, 5 \times Reaction buffer, 25mM MgCl₂, 각 10mM dNTP mix, RNase inhibitor, reverse transcriptase를 혼합하여 5 μ l의 RNA-primer mix에 넣고 최종 20 μ l의 부피로 만든 후 25°C에서 5분, 42°C에서 1시간 동안 역전사 반응을 수행하였다. 역전사반응이 끝나 후, 70°C에서 가열을 하여 역전사 반응을 중지시키고, PCR을 즉시수행하거나, -70°C에 보관하였다.

3) RT-PCR

3T3-L1 preadipocyte의 분화과정에 PPAR- α 의 발현양상을 분석하기 위해서 RT-PCR을 수행하였다. PCR에 사용된 프라이머는 이미 보고 된 유전자의 sequence를 참고하여 <G+C>함량이 55%정도 구성되게 고안하였고, RT-PCR assay를 위한 internal control은 mice의 β -actin 프라이머를 사용하였다(Table. 1). PCR 반응은 2 μ l cDNA, 2.5 μ l 10 \times Reaction buffer(contains 15mM MgCl₂), 2 μ l 10mM dNTP(각 2.5mM), 0.5 μ l primer, 0.3 μ l Taq polymerase(5U/ μ l)를 첨가하여 3차 증류수로 최종 부피를 25 μ l로 맞추어 수행하였다. PCR 조건은 94°C에서 3분, 57°C에서 2분, 72°C에서 3분동안 1 cycle을 수행한 후, 94°C에서 1분, 57°C에서 1분, 72°C에서 1분 동안 총 25cycle을 실시하였다. 증폭된 DNA는 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

Table1. Nucleotide sequences of primers used in this study.

Gene	Primer sequence	Product size
PPAR- γ	sense : 5'-TCATGACCAGGGAGTTCCTC-3'	309bp
	antisense : 5'-ACGTGCTCTGTGACGATCTG-3'	
β -actin	sense : 5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'	348bp
	antisense : 5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'	



Ⅲ. 결 과

1. 3T3-L1 지방세포 증식에 미치는 hesperetin의 영향.

3T3-L1 전지방 세포증식에 미치는 hesperetin의 효과를 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 방법으로 분석하였다. Hesperetin의 농도를 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서부터 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 처리한 결과, 각 11%, 30%, 71%, 81%, 90%의 세포 생존율을 보여 농도 의존적으로 세포의 생존율을 억제한다는 것을 알 수 있었다(Figure. 3). Hesperetin이 세포에 대한 영향을 분석하기 위해 세포의 형태를 현미경으로 관찰한 결과 hesperetin 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 control 세포보다 억제효과가 현저히 떨어짐을 관찰하였다(Figure. 4). 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서부터 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지는 농도 의존적으로 세포 성장 억제 효과를 보였으나 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 control 구와 마찬가지로 세포 성장 억제 효과가 나타나지 않았다.

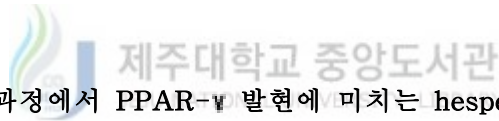
2. ERK 1/2 활성화에 미치는 hesperetin의 영향.

Insulin은 MAPK 경로에서 ERK1/2를 활성화 시킨다는 사실은 일찍이 보고 되었다(Ceresa et al. 1998). Hesperetin이 ERK 1/2 활성화에 어떠한 영향을 미치는지 시간별로 분석한 결과 3T3-L1 전지방세포에 insulin(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)만을 처리한지 5분 만에 ERK1/2의 활성이 강하게 나타났으며 30분까지 강한 활성을 보였으나 시간이 경과하면서 ERK1/2의 활성이 점차적으로 감소하였다. 그러나 hesperetin(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 insulin(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 동시에 처리한 세포에서는 5분 동안에 ERK1/2의 활성이 insulin만을 처리했을 때보다 ERK1/2의 활성이 억제되었으며, 30분 후에는 insulin만을 처리한 control 보다 현격히 억제되었다. 또한 hesperetin을 처리한지 4시간 후에는 ERK1/2의 활성이 관찰되지 않았지만, 6~8 시간이 지나면 ERK1/2 활성화가 복귀하는 현상을 보이거나 매우 약한 활성을 나타내었다(Figure 5). 또한 hesperetin을 다양한 농도에 따른 ERK1/2 활성억제를 ERK 활성 억제제인 PD98059를 이용하여 비교분석하였다(Figure 6). Insulin을 처리한 후 ERK1/2의 활성이 강하게 나타나는 30분에 hesperetin을 농도별로 처리하여 분석하였으며, insulin에 hesperetin을 농도별로 처리한 ERK1/2의 활성이 insulin만을 처리한 ERK1/2의 활성과 비교하여 약 2배정도 감소효과를 보였다(Figure 6). ERK 억제제인 PD98059의 ERK1/2 활성은

농도 의존적으로 억제되었다.

3. 지방세포 분화과정에서 중성지방 형성에 미치는 hesperetin의 영향.

3T3-L1 전지방세포에 insulin, dexamethasone, isobutylmethylxanthine을 처리하여 지방세포로 분화를 유도하면서, hesperetin을 첨가하여 중성지방 형성에 따른 hesperetin의 영향을 PD98059와 비교 분석하였다. Figure 7은 Oil Red O로 염색된 중성지방의 축적 정도를 나타내고 있다. Negative-control(Figure 7.A)은 자연적으로 일반 배지 내에서 중성지방이 축적되었지만, IDX(10 μ g/ml insulin, 0.5 μ M dexamethasone, 0.5 mM isobutyl-methylxanthine)만 처리한 positive-control(Figure 7.B)은 중성지방 축적 정도가 현저히 증가하였고, 세포의 수가 적었고 핵이 negative-control에 비해 크다는 것을 관찰할 수 있었다. Hesperetin처리군(Figure 7.C)은 positive-control에 비하여 중성지방 형성이 감소되었고, ERK 활성 억제제인 PD98059(Figure 7.D) 처리구보다도 중성지방 축적 정도가 감소된 효과를 나타내었다.



4. 지방세포 분화과정에서 PPAR- γ 발현에 미치는 hesperetin의 영향.

Hesperetin이 지방세포를 분화에 따른 중성지방의 축적을 감소시키기 때문에 지방분화에 중요한 작용을 하는 PPAR- γ 유전자발현 양상을 mRNA와 단백질 수준에서 분석하였다. RT-PCR 분석결과, PPAR- γ 의 전사체는 negative-control과 positive-control에서는 발현 차이를 나타내지 않았으나, hesperetin을 100 μ g/ml, 75 μ g/ml, 50 μ g/ml의 농도로 처리한 실험구에서는 발현이 감소하였다. PD98059 50 μ M을 처리한 실험구에서는 PPAR- γ 전사체 발현이 억제되었다(Figure 8.). 그리고 hesperetin은 단백질 수준에서는 농도 의존적으로 발현을 억제하였다. PD98059 50 μ M을 처리한 실험구에서는 단백질 수준이 PPAR- γ 발현을 억제하였지만, 고농도에서는 오히려 PPAR- γ 의 발현을 증가시키는 결과를 나타내었다.

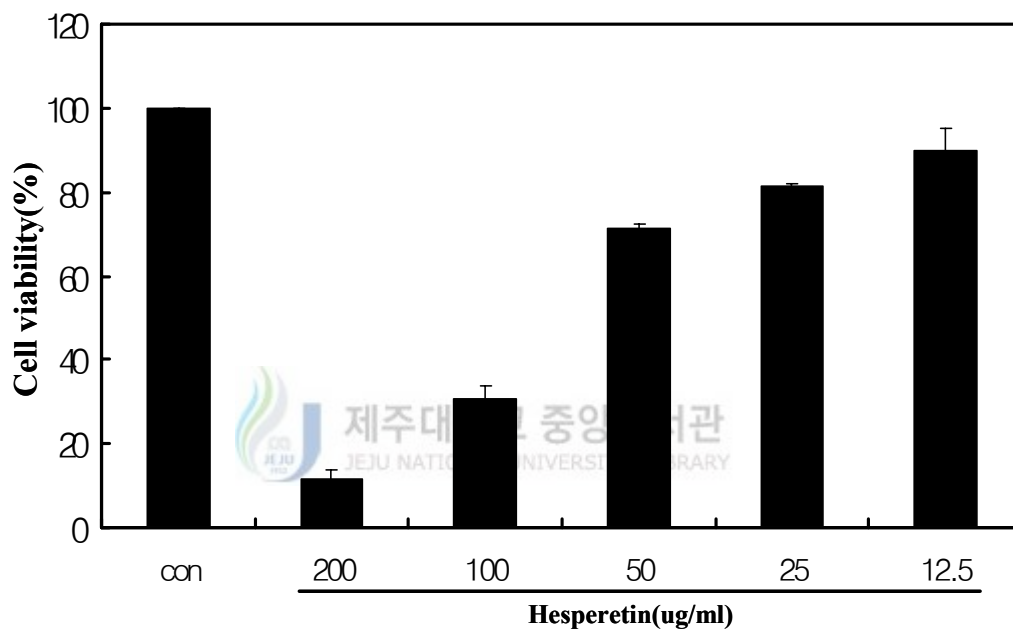


Figure 3. Effect of hesperetin on 3T3-L1 preadipocyte proliferation. Hesperetin was added to preconfluent preadipocytes in various concentrations (vehicle, 200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 25 μ g/ml, 12.5 μ g/ml) for 72hours. Cells were determined via a colorimetric proliferation assay (MTT assay).

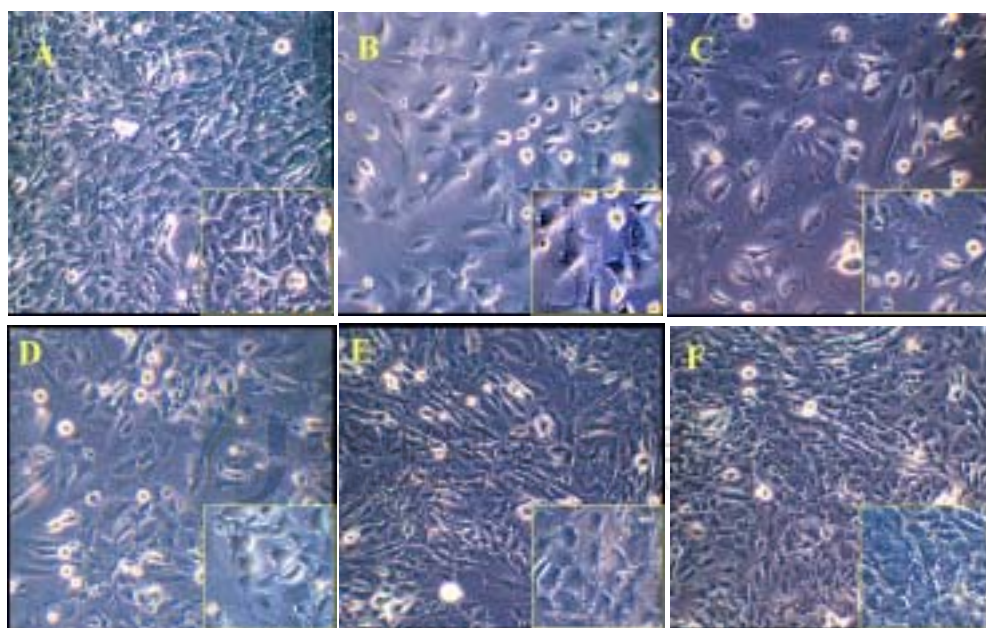


Figure 4. Photomicrographs of hesperetin-treated 3T3-L1 preadipocyte.

A; control ($\times 100$). B; hesperetin($200\mu\text{g/ml}$). C; hesperetin($100\mu\text{g/ml}$). D; hesperetin ($75\mu\text{g/ml}$). E; hesperetin($50\mu\text{g/ml}$). F; hesperetin($25\mu\text{g/ml}$). Yellow panel was observed with $\times 200$.

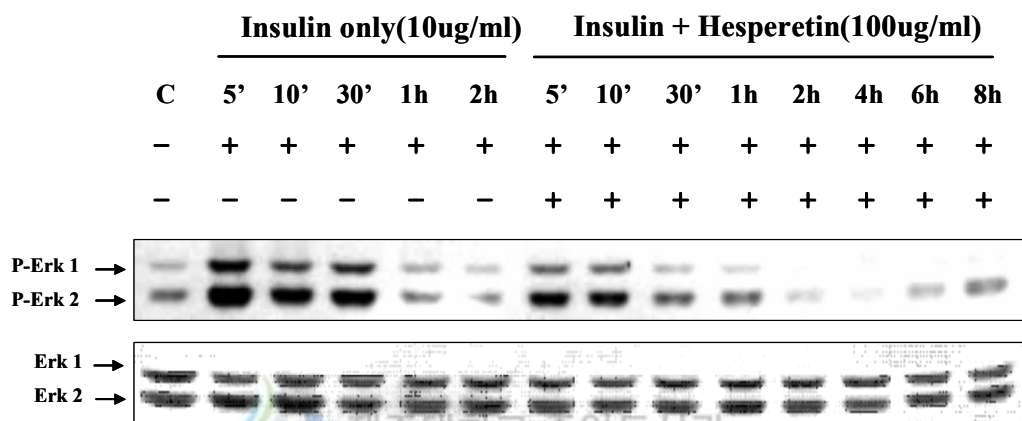


Figure 5. Effect of hesperetin on ERK 1/2 activity of 3T3-L1 preadipocyte in a time-dependent manner. The 3T3-L1 preadipocyte was cultured in presence of insulin ($10\mu\text{g/ml}$) and hesperetin ($100\mu\text{g/ml}$) in a time-dependent manner.

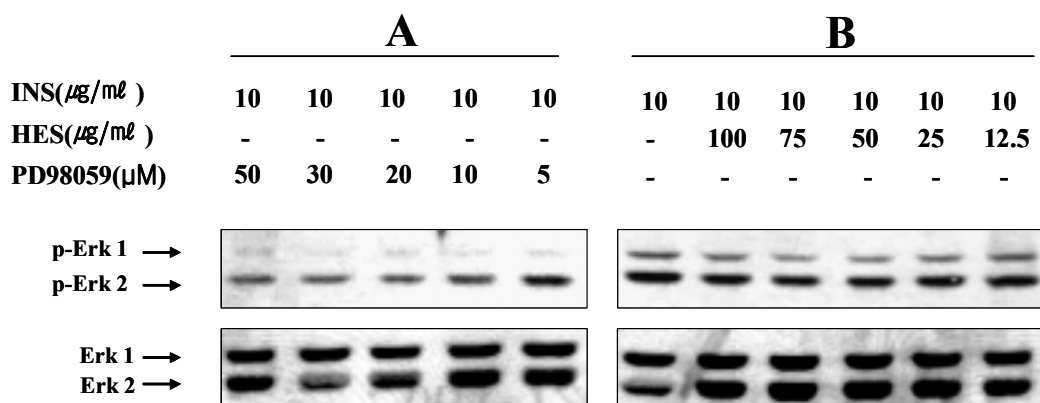


Figure 6. Effect of hesperetin on ERK1/2 activity of 3T3-L1 preadipocyte in a dose-dependent manner. A; 3T3-L1 preadipocyte was pretreated with PD98059 for 15 min after then stimulated with insulin ($10\mu\text{g}/\text{m}\ell$) for 30min. B; 3T3-L1 preadipocyte were pretreated with hesperetin for 15min after then stimulated with insulin ($10\mu\text{g}/\text{m}\ell$) for 30min.

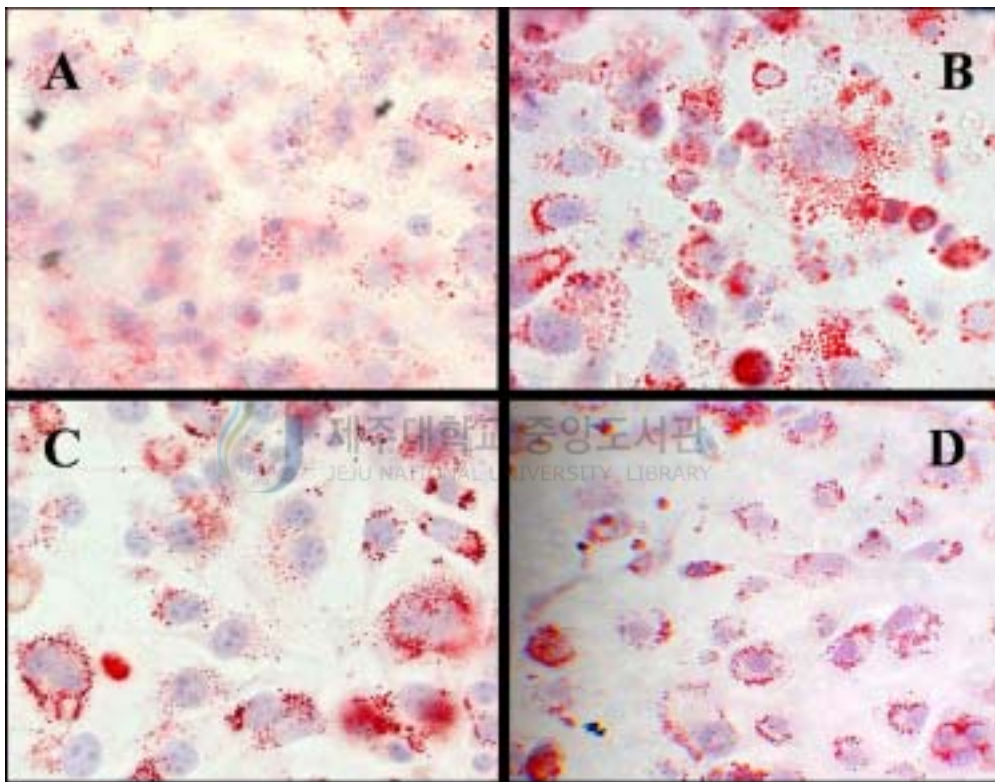


Figure 7. Oil Red O staining of triacylglycerol in 3T3-L1 preadipocyte differentiation. The 3T3-L1 preadipocyte was induced adipocyte differentiation for 4 days with IDX. A; negative-control. B; IDX + 0.25% DMSO. C; IDX + hesperetin (100 μ g/ml). D; IDX + PD98059 (50 μ M).

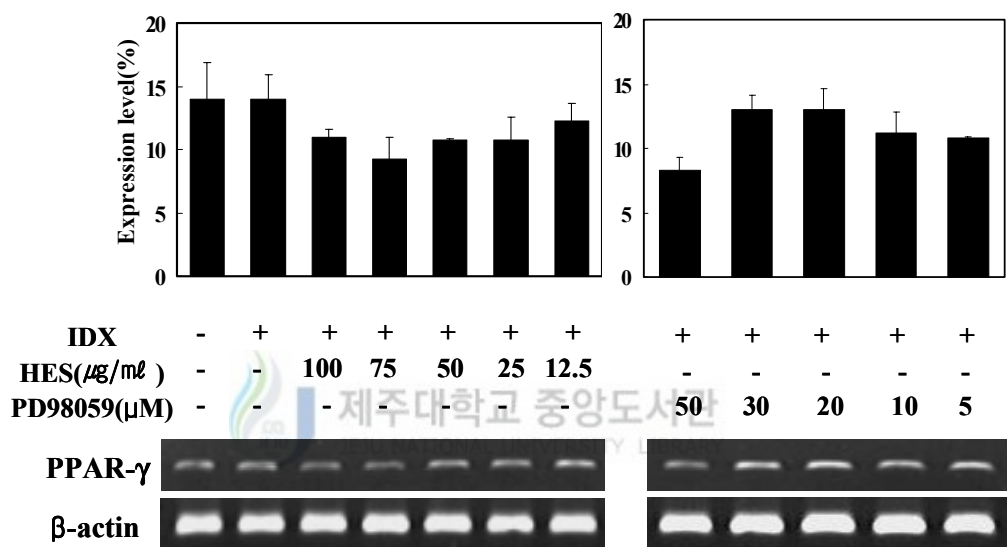


Figure 8. Effect of hesperetin on PPAR- γ expression on 3T3-L1 preadipocyte differentiation using RT-PCR. The 3T3-L1 preadipocyte was differentiated with IDX and hesperetin (HES) or PD98059 for 4 days and then detected the PPAR- γ expression using RT-PCR.

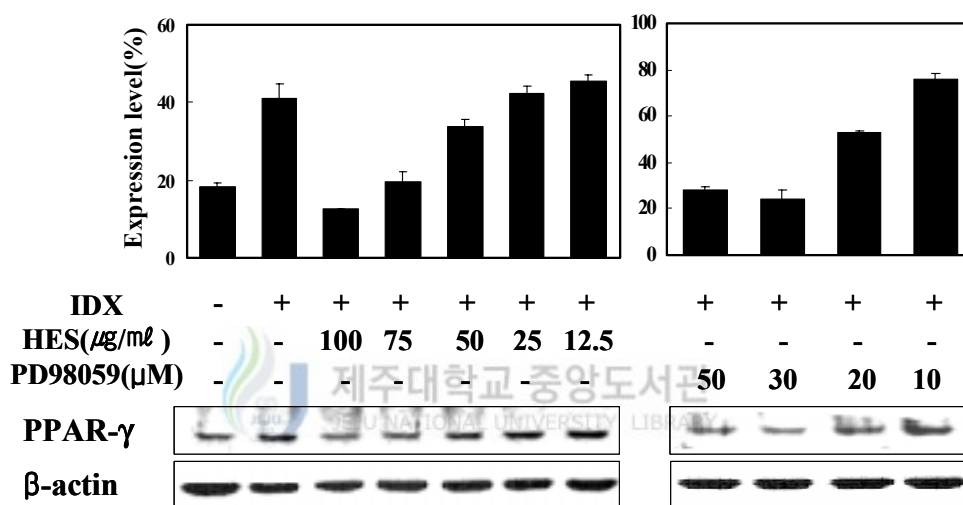


Figure 9. Effect of hesperetin on PPAR- γ expression on 3T3-L1 preadipocyte differentiation using immunoblotting. The 3T3-L1 preadipocyte was differentiated with IDX and hesperetin (HES) or PD98059 for 4 days and then detected the PPAR- γ expression using immunoblotting

IV. 고 찰

본 연구는 flavonoid 계통인 hesperetin이 3T3-L1 전지방세포 분화과정에 미치는 영향을 분석하였다. Flavonoid는 모든 식물의 열매, 잎, 꽃, 껍질 등에 다량 함유되어 있어, 직접 섭취하거나 차, 주스, 견과류 등으로 가공하여 건강음료와 식품소재로써 각광 받고 있다. 이런 이유는 flavonoid가 항암(Kuo., 1996), 항산화(Robak *et al.*, 1988), 콜레스테롤 개선작용(Monforte *et al.*, 1995 ; Bok *et al.*, 1999 ; Lichtenstein., 1998)이 있는 것으로 매우 잘 알려졌기 때문이다. 최근 연구에서 보듯이 naringin, naringenin, hesperidin, hesperetin은 고 콜레스테롤 식이를 한 실험동물 연구에서 동맥내의 콜레스테롤을 낮추는 효과(Lee *et al.*, 2001)와 간과 혈장내의 지질과 중성지방을 낮추는 효과가 있다고 보고 되었다(Cha *et al.* 2001 ; Monforte *et al.*, 1995). 최근에는 hesperetin이 장 내에 대사되어 3,4-dihydroxy-phenylpropionic acid (3,4-DHPP), 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid (ferulic acid), m-hydroxycinnamic acid (m-HC)를 형성하고, 이 화합물이 간 내의 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase와 acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) 활성을 억제함으로써 지질농도를 낮추는 효과를 보인다고 보고되었다(Kim *et al.*, 2003). 또한 식물의 열매나 오렌지 주스, grapefruit 주스 등을 섭취한 임상실험결과에서도 혈액내의 hesperetin과 naringenin이 높은 농도로 존재하고 있어, 고 콜레스테롤 환자에서는 HDL을 향상시킨다는 결과를 보고하였다(Kurowska *et al.*, 2000). 이것은 hesperidin과 naringin이 장내 세균에 의해 hesperetin과 naringenin으로 당이 가수분해 되어 혈장 내에 높은 농도로 존재하기 때문이다(Lin *et al.*, 2003). 이처럼 hesperetin은 콜레스테롤과 지질합성 억제 그리고 HDL를 향상시킴으로써 동맥경화와 같은 심장질환을 억제하거나 예방할 수 있지만, 지방조직에서 중성지방 합성을 억제하는 기작은 연구된 바가 없다. 이전 연구에서 hesperetin은 rat 지방세포에서 epinephrine과 theophylline에 의해 유도된 lipolysis를 각각 125 μ M과 250 μ M농도에서 antilipolytic 활성을 나타낸다고만 알려져 왔다(Kuppusamy *et al.*, 1993).

Hesperetin은 3T3-L1 전지방세포 증식에서 농도 의존적으로 세포 증식을 억제하였다(Figure 3.). Hesperetin 200 μ g/ml에서 가장 낮은 약 20%정도의 증식을 보였으며, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml의 농도에서도 세포의 증식이 30%이상 억제되는 것을 볼 수 있었다. 세포의 형태도 또한 200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 75 μ g/ml농도에서 세포가 증식하지 못하는 결과를 보여주었다(Figure 4.). Hesperetin 200 μ g/ml의 농도에서 control구와 비교 하

였을 때 강한 세포증식 억제 효과를 보였다. 그러나 $50\mu\text{g/ml}$, $25\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 control 구와 비슷한 세포증식 효과를 보였다. Naringenin은 3T3-L1 전지방세포의 증식을 억제한다고 보고된 바 있다(Harmon *et al.*, 2001). 이들의 연구에서는 $100\ \mu\text{M}$ naringenin 농도에서 세포성장 억제효과를 나타낸다고 하였지만, 본 연구에 사용된 hesperetin의 농도는 이들이 사용한 농도보다 높다. Hesperetin과 naringenin은 hesperidin과 naringin에서 당이 가수분해 되어 생성된 flavanone이고 그 구조가 유사하지만, phenyl benzene ring의 4번째 탄소에서 hesperetin은 OCH_3 기, naringenin은 OH기가 있는 것이 다르다. 이것은 아마도 flavanone의 구조는 유사하지만 작용하는 작용기의 차이에 의해 달라질 수 있다고 사료된다.

Insulin은 신진대사에 중요한 호르몬이며, 생체 내에서 지방 조직을 축적시키는 역할을 한다고 잘 알려져 있다(Zhang *et al.*, 1996). 그 이유는 insulin은 지방세포 분화에 가장 중요한 역할을 하기 때문이다(Smith *et al.*, 1998). Insulin에 의한 MAPK 신호전달 경로는 일반적으로 Ras/MAPK 경로로 잘 알려져 있으며(Ceresa *et al.*, 1998), 전지방세포에서 지방세포로 분화하는 과정에 중요한 세포신호 전달 수단이다(Campbell *et al.*, 1992). PD98059는 Raf에 의한 mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase(MEK)의 활성을 억제시키며 3T3-L1 전지방세포에서 mitotic expansion phase를 억제하는 역할을 한다고 보고 되었다(Qiu *et al.*, 2001). 따라서 본 연구결과는 세포 증식에 관여하는 세포신호전달 중 하나인 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 경로에서 ERK1/2의 활성을 알아보기 위하여 insulin 호르몬을 처리하였다.

Insulin을 처리한 3T3-L1 전지방세포에서 MAPK 경로를 통한 ERK1/2의 활성을 시간별로 분석한 결과(Figure 5.)는 처리 후 5분에서 ERK1/2의 활성이 강하게 나타났고, 30분 까지 그 활성이 지속되었지만 1시간 이후로는 활성이 급격히 감소하였는데, 이는 Kayali 등(2000)의 연구 결과와 유사하였다. Hesperetin은 3T3-L1 전지방세포에서 insulin에 의한 ERK1/2의 활성을 저해하는 작용을 보였다. 특히 처리 후 30분 경과 후에 가장 강한 저해효과를 나타내었지만, 처리 후 4시간 이후에는 ERK1/2의 활성을 저해하는 효과를 나타내지 않았다. 또한 hesperetin은 PD98059보다는 ERK1/2의 활성을 저해하는 그 효과가 적었다. PD98059의 분자구조는 flavanone과 flavone의 구조와 매우 유사하므로(Reiners *et al.* 1998) flavanone과 flavone이 ERK의 활성을 억제할 수 있는 효과를 나타낼 수 있음을 암시해준다. Reiners 등(1998)은 MCF10A, MCF10A-Neo, MCF10A-NeoT 세포에서 flavanone, flavone, PD98059를 농도별로 처리했을 경우 ERK의 활성이 농도가 높을수록 억제되었지만, MEK를 억제할 수 있는

inhibition concentration(IC₅₀%)값은 flavanone과 flavone이 190μM, PD98059는 5μM로 최소 38배나 차이가 난다고 하였다. 따라서 이런 결과를 미루어 볼 때 비록 세포주가 다르긴 하지만 3T3-L1 전지방세포에서도 hesperetin에서 ERK 1/2 활성저해는 ERK 저해제인 PD98059보다는 그 효능이 떨어지지만, ERK1/2의 활성을 저해하는 작용을 하는 것으로 사료된다.

Hesperetin 혹은 PD98059는 지방세포분화에서 중성지방 축적을 완전히 저해하지는 못하지만, 현저히 감소시키는 효과와 세포 증식을 저해하였다. Qiu *et al.*(2001)은 ERK 저해제인 PD98059는 중성지방의 축적에는 영향을 미치지 못한다고 보고하였다. 이는 PD98059가 mitotic clonal expansion을 저해하고, DNA 합성을 억제하기 때문에 IDX를 첨가한 0일째 되는 단계의 세포의 수와 유사하다고 하였다. 따라서 PD98059는 mitotic clonal expansion의 과정을 저해하기는 하지만, 지방 세포의 분화과정을 억제하지 못한다고 하였다. 결국, Qiu 등(2001)은 preadipocyte가 adipocyte로 분화하는 과정에서 DNA 합성과 mitotic clonal expansion은 요구되지 않는 단계라고 보고 하였다. 따라서 hesperetin을 처리한 세포의 중성지방 축적은 PD98059를 처리한 세포와 같이 ERK1/2의 활성을 억제시킴으로써 mitotic clonal expansion을 막고 세포의 수가 늘어나지 않는 것으로 보이며, 또한 지방 분화의 과정을 억제하지는 못하는 것이라고 사료된다. 따라서 hesperetin이 어떠한 기작으로 중성지방의 축적을 억제하는 지에 대해서는 더 많은 연구가 필요하다.

지방세포의 분화를 조절하는 메커니즘은 각 단계에서 필요한 특수한 유전자들의 발현과 단백질들의 복잡한 상호작용에 의해 이루어진다. PPAR- γ 는 지방세포의 분화 과정에서 가장 많이 왕성하게 발현되며, 마지막 분화(terminal differentiation) 단계까지 그 활성이 유지된다(Gregoire *et al.*, 1998, Figure 2.). PPAR- γ 는 RXR과 상호작용을 하여 DNA의 PPRE에 결합하여 PEPCK, LPL, aP2, UCP1등 지방분화에 관련된 유전자를 전사시킨다(Tontonoz *et al.*, 1994, 1995 ; Schoongans., 1996 ; Ross *et al.*, 1990 ; Sears *et al.*, 1996). Hesperetin은 PPAR- γ 의 전사체의 발현을 어느 정도 억제하는 효과를 나타내었고, Immunoblotting 방법으로 분석한 PPAR- γ 단백질의 발현은 농도 의존적으로 억제하였다. 지방세포의 분화과정에서 PPAR- γ 의 발현은 MEK/ERK 경로의 활성화에 의해 촉진된다고 알려져 있다(Prusty *et al.*, 2002). PD98059는 ERK1/2의 활성을 저해함으로써 PPAR- γ 의 발현을 억제한다(Liu *et al.*, 2002). 따라서 hesperetin은 insulin에 의해 활성화되는 ERK1/2의 활성을 저해하고, PPAR- γ 의 발현을 억제하는 것으로 추측할 수 있지만, 이에 대한 상세한 분자적 기작에 대한 연구가 요구된다.

V. 인 용 문 헌

- Avruch, J. 1998. Insulin signal transduction *Mol. Cell. Biochem.* 182: 31-48.
- Bok, S.H., S.H. Lee and M.S. Choi. 1999. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *J Nutr.* 129: 1182-1185.
- Budavari, S., M.J. O'Neil and A. Smith. 1989. Merck index. 11th ed. New Jersey, USA: Merck & CO. p.738.
- Campbell, G.S., L. Pang, T. Miyasaka, A.R. Saltiel and C. Carter-Su. 1992. Stimulation by growth hormone of MAP kinase activity in 3T3-F442A fibroblasts. *J Biol Chem.* 267(9): 6074-6082.
- Camp, H.S and S.R. Tafuri. 1997. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* Apr 18;272(16): 10811-10816.
- Ceresa, B.P and Pessin JE. 1998. Insulin regulation of the Ras activation/inactivation cycle. *Mol. Cell. Biochem.* 182(1-2): 23-29.
- Cha, J.Y., Y.S. Cho, I. Kim, T. Anno, S.M. Rahman and T. Yanagita. 2001. Effect of hesperetin, a citrus flavonoid, on the liver triacylglycerol content and phosphatidate phosphohydrolase activity in orotic acid-fed rats. *Plant Foods for Human Nutrition.* 56: 349-358.
- Chen, Y.C., S.C. Shen and H.Y. Lin. 2003. Rutinoside at C7 attenuates the apoptosis-inducing activity of flavonoids. *Biochem Pharmacol.* Oct 1;66(7): 1139-1150.

- Cowherd, R.M., E.L. Robert and R.E. McGehee Jr. 1999. Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin Cell Dev Biol.* Feb10(1); 3-10.
- Downward, J. 1994. GRB2/Sem-5 adaptor protein. *FEBS Lett.* 338: 113-117.
- Gregoire, F.M., C.M. Smas, and H.S. Sul. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiological Review.* vol 78, No.3. July 783-809.
- Harmon, A.W. and J.B. Harp. 2001. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 280: C807-C813.
- Higby, R.H. 1941. The chemical nature of hesperidin and its experimental medicinal use as a source of vitamin-P. A review. *J Am Pharm Assoc Sci Edi.* 30: 629.
- Houseknecht, K.L., B.M. Cole and P.J. Steele. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma(PPAR γ) and its ligands: A review. *Domestic Animal Endocrinology.* 22: 1-23.
- Kayali, A.G., D.A. Austin and N.J. Webster. 2000. Stimulation of MAPK cascades by insulin and osmotic shock: lack of an involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes.* Nov;49(11): 1783-1793.
- Kim, H.K., T.S. Jeoun, M.K. Lee, Y.B. Park and Choi MS. 2003. Lipid-lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats. *Clinica Chimica Acta.* 327: 129-137.
- Kuo, S.M. 1996. Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Lett.* 110: 41-48.

- Kuppusamy, U.R. and N.P. Das. 1993. Antilipolytic action of hesperetin in rat adipocytes. *Planta Med.* Dec 59(6) 508-12.
- Kurowska, E.M., J.D. Spence, J. Jordan, S. Wetmore, D.J. Freeman, L.A. Piché and P. Serratore . 2000. HDL-Cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr.* 72 1095-100.
- Le bail, J.C., F. Varnat, J.C. Nicolas and G. Habrioux. 1998. Estrogenic and antiproliferative activities on MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids. *Cancer Lett.* 130: 209-216.
- Lee, C.H., T.S. Jeong, Y.K. Choi, B.H. Hyun, G.T. Oh, E.H. Kim , J.R. Kim, J.I. Han and Bok SH. 2001. Anti-atherogenic effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, associated with hepatic ACAT and aortic VCAM-1 and MCP-1 in high cholesterol-fed rabbits. *Biochem Biophys Res Commun.* Jun15;284(3): 681-688.
- Lichtenstein, A.H., 1998. Soy protein, isofalvonones and cardiovascular disease Risk. *J Nutr.* Oct;128(10): 1589-1592.
- Lin, Y.T., S.L. Hsiu, Y.C. Hou, H.Y. Chen and P.D. Chao. 2003. Degradation of flavonoid aglycones by rabbit, rat and human fecal flora. *Bio Pharm Bull.* may;26(5): 747-751.
- Liu, K., Y. Guan, M.C. MacNicol, A.M. MacNicol and R.E. McGehee. 2002. Early expression of p107 is associated with 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Mol Cell Endocrinol.* Aug30;194(1-2): 51-61.
- MacDougald, O. and M.D. Lane. 1995. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem.* 64: 345-373.

- Miksicek, R.J., 1993. Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. *Mol Pharmacol.* 44: 37-43.
- Monforte, M.T., A. Trovato, S. Kirjavainen, A.M. Forestieri, E.M. Galati and R.B. LoCurto. 1995. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid(note II): hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rats. *Farmaco.* 50: 595-599.
- Molteni, A., L. Vrizio-Molteni and V. Persky. 1995. In vitro hormonal effects of soybean isoflavonoids. *J Nutr.* 125: 715S-756S.
- Mouly, P.P.M., C.G. Arzouyan, E.M. Gaydou and J.M. Estienne. 1994. Differentiation of citrus juices by factorial discriminate analysis using liquid chromatography of flavonone glycosides. *J Agric Food Chem.* 42; 70-79.
- Must, A., J. Spadano, E.H. Coakley, A.E. Field, G. Colditz and W.H. Dietz. 1999. The disease burden associated with overweight and obesity. *J Am Med Assoc.* 282: 1523-1529.
- Prusty, D., B.H. Park, K.E. Davis and S.R. Farmer. 2002. Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and C/EBP α gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem.* Nov29;277(48): 46226-46232.
- Qiu, Z., Y. Wei, N. Chen, M. Jiang, J. Wu and K. Liao. 2001. DNA synthesis and mitotic clonal expansion is not a required step for 3T3-L1 preadipocyte differentiation into adipocytes. *J Biol Chem.* Apr13;276(15): 11988-11995.

- Reiners, J.J., J.Y. Lee, R.E. Clift, D.T. Dudley and S.P. Myrand. 1998. PD98059 is an equipotent antagonist of the aryl hydrocarbon receptor and inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol Pharmacol.* Mar;53(3): 438-445.
- Robak, J. and R.J. Gryglewski. 1988. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol.* 37: 837-841.
- Ross, S.R., R.A. Graves, A. Greenstein, K.A. Platt, H.L. Shyu, B. Mellovitz and B.M. Spiegelman. 1990. A fat-specific enhancer is the primary determinant of gene expression for adipocyte P2 in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 9590-9594.
- Rotelli, AE., T. Guardia, A.O. Juarez, N.E. de la Rocha and L.E. Pelzer. 2003. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacol Res.* Dec;48(6): 601-606.
- Rouseff, R.L., S.F. Martin and C.O. Youtsey. 1987. Quantitative survey of narirutin, naringin, hesperidin and neohesperidin in citrus. *J Agric Food Chem.* 35: 1027-1030.
- Schoongans, K.J., A.M. Peinado-Onsurbe, R.A. Lefebvre, M. Heyman, S. Briggs, B.S. Deeb, I. Sears, M. MacGinnitie, L. Kovacs and R. Graves. 1996. Differentiation-dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: regulation by peroxisome proliferator-activated receptor α . *Mol. Cell. Biol.* 16:3410-3419.
- Sears, I., M. MacGinnitie, L. Kovacs and R. Graves. 1996. Differentiation-dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: regulation by peroxisome proliferator-activated receptor α . *Mol. Cell. Biol.* 16; 3410-3419.

- Silalahi, J., 2002. Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. *Asia Pacific J Clin Nutr.* 11(1): 79-84.
- Smith, P.J., L.S. Wise, R. Berkowitz, C. Wan and C.S. Rubin. 1988. Insulin-like growth factor is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocyte. *J. Biol. Chem.* 263: 9402-9408.
- Tontonoz, P., E. Hu and B.M. Spiegelman. 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblast by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* 79: 1147-1111.
- Tontonoz, P., E. Hu, R.A. Graves, A.I. Budavari and B.M. Spiegelman. 1994. mPPAR γ 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Gene Dev.* 8: 1224-1234.
- Tontonoz, P., E. Hu, J. Devine, E.G. Beale and B.M. Spiegelman. 1995. PPAR γ 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol. Cell. Biol.* 15: 351-357.
- Zhang. B., J. Berger, G. Zhou, A. Elvrecht, S. Biswas, S. white-Carrington, D. Szalkowski and D.E. Moller. 1996. Insulin- and Mitogen-activated Protein Kinase Mediated Phosphorylation and activation of Peroxisome proliferator-activated receptor γ . *J. Biol. Chem.* 271; 31771-31774.

VI. 적 요

Hesperetin은 flavonoid계통에 속하는 flavanone으로 citrus fruits에 다량 함유되어 있다. Hesperetin은 hesperidin에서 ramnose와 glucose으로 구성된 당이 가수분해 되어 생성된 aglycone으로 항암 효과, 항염 효과, 지질과 콜레스테롤을 개선효과 등 약리 활성을 가지고 있다. 본 연구는 hesperetin이 3T3-L1 전지방세포의 분화과정에 미치는 영향을 알아보기 위하여 PPAR- γ 의 발현과 중성지방의 축적 정도를 분석하였다. 또한 preadipocyte의 증식과정에서 insulin에 의한 MAPK경로를 통하는 ERK의 활성 억제 효과를 분석하였다. 본 연구에서 얻은 결과는 다음과 같다. 1) Hesperetin은 3T3-L1 전지방세포에서 insulin에 의해 유발되는 ERK1/2의 활성을 억제하였다. 2) Hesperetin은 3T3-L1 전지방세포의 지방분화과정에서 PPAR- γ 의 발현을 감소시켰다. 3) Hesperetin은 Oil Red O 염색으로 분석한 중성지방의 축적을 감소시켰다. 4) Hesperetin은 3T3-L1 전지방세포의 세포증식을 억제하였다. 따라서 hesperetin은 ERK1/2 활성 저해와 PPAR- γ 발현억제를 통해 3T3-L1 전지방세포 지방분화를 억제하는 것으로 사료된다.

감사의 글

대학원을 입학한지가 엇그제 같았는데 어느덧 졸업하게 되었습니다. 대학원 2년 동안의 세월은 힘든 나날과 보람 있는 나날의 연속이었습니다. 그 속에서 많은 깨달음과 가르침을 주신 모든 분들께 지면으로나마 감사의 말씀을 전하고자 합니다.

우선, 부족한 저에게 많은 질타와 격려를 아끼지 않으셨고 제 앞날에 희망이라는 불을 밝혀주신 김세재 교수님께 진심으로 감사합니다. 많은 업무 속에서 부족한 저를 신경써주시고 그로인해 늘어나는 흰 머리카락을 보면 죄송스럽지만 한편으론 감사하다는 생각이 듭니다. 또한 부족한 논문을 세심하게 봐주시고 언제나 밝은 미소로 저를 대해주신 오문유 교수님과 김기욱 박사님께 감사의 말씀을 전합니다. 학부 4년동안, 그리고 대학원 2년동안 많은 가르침을 주신 허인옥 교수님, 오덕철 교수님, 이용필 교수님, 김문홍 교수님, 김원택 교수님, 이화자 교수님, 고석찬 교수님도 감사합니다. 모두 건강하시고 하시는 모든 일에 성공이 있길 기원합니다.

학부 3학년 때부터 같이 고생하고 격려를 많이 해준 분자생물학 실험실 선배, 후배님들께 감사합니다. 실험실 처음 들어가서 실험의 기본을 가르쳐주시고, 제가 힘들 때 술 많이 사주신 지권이형, 항상 서로 농담하며 지내지만 언제나 제 마음을 알고 있는 형복이형, 누나라고 우기는 지현이, 그리고, 같이 2년을 고생하고 서로 서로 부족한 면을 채워준 최진영, 현은아에게.. 감사하다는 말과 고생했고 수고했다는 말을 함께 전하고 싶습니다. 또한 내 친구 양명천, 막내인 현경만 에게도 보잘 것 없는 선배를 위해 애써줘서 고맙다는 말을 전합니다.

제가 부족할 때 옆에서 조언과 격려를 아끼지 않으신 강신혜 선생님, 구박만 하지만 저를 많이 챙겨주시는 박수영 선생님, 같이 졸업하는 약리학 실험실에 김상철, 이해자에게도 감사의 말씀을 전합니다.

아울러 지역기술혁신센터(TIC)에 있는 현근희 선생님, 함명옥 선생, 그리고 서로 많이 싸우고 지냈지만 1년 동안 실질적으로 저를 많이 도와준 막내 강은옥 에게도 고마움을 전합니다.

2년 동안 같이 고생하고 서로서로 도와준 같이 졸업하는 우리 동기들...
김은미누님, 김제환, 송지훈, 이은주 에게 지금까지 모두 고생했고 언젠가 모두 성공해서 지금의 추억들을 안주 삼는 날이 오길 바랍니다.

바쁘다는 핑계로 저녁약속 제대로 지키지 못하고, 술 한잔 못 사준 친구들과 95학번동기들, 여과지 후배들에게 미안할 따름이지만, 그래도 여러분이 있어서 저에겐 많은 위안과 힘을 갖게 했습니다.

마지막으로, 이 자리까지 못난 아들을 위해 고생하시고, 자신감을 잃지 않게 해주신 부모님께 변함없는 사랑과 감사의 마음을 전합니다.

벌써 한 해가 저물어 가는군요..

서로 자신이 한 일을 마무리 할 때인가 봅니다.

내년에도 항상 건강하시고 멋지고 행복한 삶을 누리시길 바랍니다.

모두 사랑합니다...



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY