

무막줄기세포추출물의 3T3-L1 세포에서 포도당 흡수 촉진 효과

김지현[†] · 김민정[†] · 박혜숙¹ · 김영실¹ · 조은주

부산대학교 식품영양학과, ¹(주)티스템

Membrane Free Stem Cell Extract from Adipose Tissue Enhances Glucose Uptake in 3T3-L1 Cells

Ji Hyun Kim[†], Min Jeong Kim[†], Hye Sook Park¹, Young Sil Kim¹, Eun Ju Cho

Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, ¹T-STEM Co., Ltd.

Received: October 1, 2019
Revised: October 17, 2019
Accepted: October 28, 2019

[†]Ji Hyun Kim and Min Jeong Kim are contributed equally to this paper.

Correspondence to: Eun Ju Cho
Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, 2, Busandaehak-ro, 63beon-gil, Geumjeong-gu, Busan 46241, Korea
Tel: +82-51-510-2837
Fax: +82-51-583-3648
E-mail: ejcho@pusan.ac.kr

Copyright © 2019 by The Society of Korean Medicine for Obesity Research

Objectives: We investigated whether membrane free stem cell extract from adipose tissue (MFSCe) has anti-diabetic effect.

Methods: To determine glucose uptake effect of MFSCe, we carried out glucose uptake assay in 3T3-L1 adipocytes. The regulatory mechanisms of MFSCe on glucose uptake were examined by Western blot analysis.

Results: When MFSCe was treated to adipocytes at the concentration of 0.5, 1, 2.5, and 5 $\mu\text{g/mL}$, 2-deoxyglucose-6-phosphate uptake was elevated approximately 1.8-fold compared to cells not treated with MFSCe. It indicated that MFSCe enhances glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. In addition, MFSCe reduced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 at serine 307 and induced Akt and glucose transporter 4 protein expressions that were related to insulin signaling. Furthermore, MFSCe regulated adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) pathway by increases of increase phosphorylation of AMPK and acetyl-CoA carboxylase that were related to AMPK pathway.

Conclusions: These results indicated that MFSCe promotes glucose uptake via modulation of insulin signaling and AMPK pathway. Therefore, MFSCe could be a promising agent for treatment of diabetes mellitus.

Key Words: AMP-activated protein kinases, Diabetes mellitus, Membrane free stem cell extract, 3T3-L1 cells

서론

당뇨병은 인슐린 분비 또는 작용의 결함으로 인한 대사성 질환으로, 체내 혈당조절이 정상적으로 이루어지지 않아 만성적인 고혈당을 특징으로 한다¹⁾. 제2형 당뇨병은 췌장 베타세포에서 인슐린 분비능 이상과 간, 골격근, 지방조직과 같은 말초조직에서의 인슐린 저항성으로 인해 발생한다²⁾. 제2형 당뇨 환자들은 혈중 고혈당 및 높은 당화혈색소 농도로 인해 실명, 심혈관질환, 신부전과 같은 합병증에 노출되기 쉬우며, 합병증으로 인한 사망률 또한

증가한다³⁾. 이러한 당뇨병성 합병증의 발생을 억제하기 위한 근본적인 치료방법은 혈당을 조절하는 것이며, 이를 위해 임상에서는 생활습관 개선과 함께 경구용 혈당강하제를 이용하고 있다. 그러나 이들 약물의 사용은 체중 증가, 저혈당 위험, 위장관 장애와 같은 부작용을 수반하므로 이를 최소화함과 동시에 혈당을 효과적으로 조절할 수 있는 소재의 개발이 필요한 실정이다^{4,5)}.

줄기세포(stem cell)는 미분화된 세포로서, 특정 기능을 가지는 세포로 분화할 수 있는 다중분화능과 미분화성 및 다중분화능을 포함한 체 세포분열하는 자가 재생산을 특

정으로 한다⁶⁾. 수정란으로부터 얻어지는 배아줄기세포와 달리 성체줄기세포는 골수, 제대혈, 지방조직 등에서 채취할 수 있으며, 그중 지방조직은 수율이 높고, 윤리적인 문제로부터 비교적 자유롭기 때문에 성체줄기세포의 이상적인 공급원으로 여겨진다⁷⁾. 지방 유래 줄기세포를 이용한 치료법으로는 주로 추출한 세포를 배양하여 환자에게 주입하는 방법이 있으며, 이외에도 줄기세포 추출물 또는 배양액을 이용한 연구가 진행되고 있다⁸⁻¹⁰⁾. 지방 유래 줄기세포 추출물과 배양액의 활성으로는 상처치유, 섬유조직 증식 등의 효과가 보고되고 있으며, 이는 세포로부터 분비된 물질들에 의한 것으로 알려져 있다^{11,12)}. 본 연구에서는 세포막 잔여물과 배지 성분을 제거한 무막줄기세포추출물(membrane-free stem cell extract)을 사용함으로써 소혈청 및 항생제와 같은 첨가제 성분을 제거하고 유효성분의 함유량을 높여 단순 추출물 또는 배양액을 사용함에 따라 발생할 수 있는 부정적인 효과를 감소시킬 수 있을 것으로 생각된다. 지방 유래 줄기세포 추출물 또는 배양액, 특히 무막줄기세포추출물을 이용하여 지방 세포에서 포도당 흡수 촉진 효과를 확인한 연구는 전무한 실정이므로, 본 연구에서는 마우스 유래 지방전구세포인 3T3-L1 세포를 이용하여 지방 세포에서의 포도당 흡수 효과와 그 메커니즘을 규명하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), bovine calf serum (BCS), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin, trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 WelGENE (Gyeongsan, Korea)에서 구입하였다. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,3-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), dexamethasone, insulin은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 구매하여 사용하였다. Krebs-Ringer-phosphate-HEPES (KRPH) buffer는 Biosolution Co., Ltd. (Seoul, Korea)에서 구입하였다. Bovine serum albumin (BSA)는 Bioworld Technology (Bloomington, MN, USA)사 제품을 구입하였다. 1차 항체와 2차 항체는 Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)사 제품을 사용하였다. Enhanced chemiluminescence (ECL) solution은 Bio-Rad

Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)에서 구입하였다.

2. 무막줄기세포추출물 제조

무막줄기세포추출물은 (주)티스탬(Changwon, Korea)으로부터 제공받아 실험에 사용하였다. 혈액검사와 의사의 진단 결과에 따라 다른 질병이 없는 건강한 20대 비만 여성(BMI 25-29.9)의 미용을 목적으로 외과적 지방흡입 수술을 통해 버려지는 체지방 조직을 시료 제조에 사용하였다. 시행한 혈액검사 항목은 B형간염바이러스, C형간염바이러스, 인체면역결핍바이러스, 인체T림프영양성 바이러스, 파보바이러스B19, 사이토메가로바이러스, 엡스타인바바이러스, 매독크레포네마 등이다. 지방흡입 시술 전 식약처에서 고시한 공여자 관리 절차에 따라 공여자에게 체지방 조직이 연구 목적으로 활용된다는 서면동의를 받았으며, 생명윤리위원회의 임상시험 승인을 받은 protocol에 따라 체지방 조직을 획득하였다. 지방 조직은 type 2 collagenase (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA)에서 배양한 뒤, 원심 분리 및 세척하여 phosphate-buffered saline (PBS)에 재현탁시켜 지방 유래 줄기세포 수집에 사용하였다. 지방 조직으로부터 지방 유래 줄기세포를 정제하기 위해, 고정된 세포에 각 표면 marker에 대한 monoclonal antibody와 2차 항체인 rabbit fluorescein isothiocyanate-labeled anti-mouse immunoglobulin G 등을 부착하였으며, 이를 fluorescence microscope를 이용하여 시각화하여 positive marker인 CD105, CD29를 확인하여 지방 유래 줄기세포를 정제하였다. 위와 같이 정제된 지방 유래 줄기세포는 37°C, 5% CO₂ incubator에서 초기배양을 실시하였으며, 계대배양을 6-10회 반복하였다. 배지를 제거하고 줄기세포를 일정량 수득하여 초음파 등의 물리적 방법을 사용하여 세포막을 벗기고, 필터 등의 방법을 이용하여 세포막 조각을 제거하여 무막줄기세포추출물을 획득하였다. 최종제인 무막줄기세포추출물은 Good Laboratory Practice 인정 기관인 (주)캠온에서 물질에 대한 비임상 독성시험과 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소에서 총 9회의 독성시험을 진행하여 독성이 없는 안전한 물질임을 확인하였다. 수용액 상태의 무막줄기세포추출물은 동결건조하여 파우더 제형으로 만든 후 5±2°C에서 보관하였다.

3. 세포 배양

실험에 사용된 마우스 지방전구세포 3T3-L1 preadipocyte

는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)사에서 구매하였다. 3T3-L1 preadipocyte는 100 units/mL penicillin streptomycin, 10% BCS가 함유된 DMEM을 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 80% confluence 상태에서 PBS (pH 7.4)로 세포를 세척한 후 부착된 세포를 0.05% trypsin과 0.02% EDTA 혼합액으로 분리하여 1,000 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 3T3-L1 preadipocyte를 adipocyte로 분화유도하기 위하여 100% confluent된 상태에서 2일 후 0.5 mM IBMX, 1 µM Dex, 및 10 µg/mL insulin (MDI)와 10% FBS가 함유된 분화유도 배지로 교체하였다. 2일 뒤 10% FBS, 10 µg/mL insulin을 포함한 배지로 2일간 배양한 후 adipocyte로 분화할 때까지 2일마다 10% FBS가 포함된 배지로 교체해주었다.

4. MTT assay

3T3-L1 preadipocyte는 80% confluence 상태가 되면 24-well plate에 5×10^4 cells/mL로 seeding하였다. 세포가 confluence 상태가 되었을 때 무막줄기세포추출물(0.5, 1, 2.5, 5 µg/mL)을 처리하여 72시간 배양한 뒤, 5 mg/mL의 MTT solution을 각 well에 주입한 후 37°C에서 4시간동안 재배양하였다. 배양이 완료되면 formazan 결정을 DMSO에 녹여 30분간 실온에서 방치하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다¹³⁾.

5. Glucose uptake assay

3T3-L1 preadipocyte가 80% confluence되었을 때 96-well plate에 1.5×10^4 cells/mL로 seeding하여 실험에 사용하였다. Confluence 후 2일 뒤 분화유도배지로 교체하여 adipocyte로의 분화를 유도하였고, 유도 후 2일 뒤 10% FBS, 10 µg/mL insulin을 포함한 배지로 2일간 배양한 후 adipocyte로 분화할 때까지 2일마다 10% FBS가 포함된 배지로 교체해주었다. 분화가 완료되면 glucose free 배지로 교체하여 16시간 배양 후, 2% BSA가 포함된 100 µL KRPH buffer로 40분간 배양하여 starvation하였다. 무막줄기세포추출물(0.5, 1, 2.5 µg/mL) 또는 1 µM insulin을 처리하여 30분간 배양한 뒤, 10 mM 2-deoxyglucose를 처리하여 20분간 배양하여 sample preparation하였다. 포도당 흡수는 glucose uptake assay kit (Abcam, Cambridge, UK)을 이용하여 측정하였다¹⁴⁾.

6. Western blot analysis

무막줄기세포추출물을 처리한 세포에 radioimmunoprecipitation assay buffer를 첨가하여 용해시킨 후 4°C, 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 획득한 단백질을 정량하였다. 단백질은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis한 다음 membrane에 electrotransfer하였다. 단백질이 부착된 membrane을 5% skim milk로 처리하여 blocking한 후, 1차 항체를 4°C에서 overnight 반응시켰다. PBS-T로 세척한 다음 2차 항체를 상온에서 1시간 반응시키고 다시 PBS-T로 세척한 후 ECL solution과 반응시켜 DavinChemi™ Chemiluminescence image system (Core Bio, Seoul, Korea)을 이용하여 단백질 발현을 확인하였다.

7. 통계분석

모든 실험 결과는 3회 반복 실험하여 평균±표준편차로 나타내었으며, 각 실험 결과 간 유의성을 검토하기 위하여 Statistical Package for the Social Sciences (SPSS; IBM Corp., Armonk, NY, USA)를 이용하였다. Analysis of variance test 및 Duncan's multiple range test를 실시하여 P<0.05에서 시료의 평균값 간 유의차를 검정하였다.

결과

1. 세포생존에 미치는 영향

3T3-L1 preadipocyte에서 무막줄기세포추출물의 세포독성을 확인하기 위하여 0.5-5 µg/mL 농도에서 MTT assay를 실시한 결과, 2.5 µg/mL의 농도까지 세포 생존에 영향을 미치지 않았다(Table 1). 따라서 무막줄기세포추출물 0.5, 1, 2.5 µg/mL를 실험 농도로 설정하였다.

2. 포도당 흡수 조절

3T3-L1세포에 무막줄기세포추출물을 0.5, 1, 2.5 µg/mL

Table 1. Cytotoxicity of Membrane Free Stem Cell Extract from Adipose Tissue in 3T3-L1 Preadipocytes

Treatment (µg/mL)	Cell viability (%)
0	100.00±0.52
0.5	106.51±1.72
1	101.88±1.10
2.5	96.61±0.55

Values are mean±standard deviation.

의 농도로 처리하였을 때 농도가 증가함에 따라 2-deoxy-glucose-6-phosphate (2-DG6P)의 흡수가 농도의존적으로 증가한 것을 확인하였다. 특히, 무막줄기세포추출물을 처리하지 않은 control군과 비교하여 2.5 µg/mL의 농도에서 약 1.8배 높은 2-DG6P 흡수율을 나타내어 포도당 흡수가 증가함을 확인하였다(Fig. 1).

3. 인슐린 신호전달 관련 단백질 및 glucose transporter 4 (GLUT4) 단백질 발현 조절

분화가 유도된 3T3-L1 adipocyte에 무막줄기세포추출물을 처리한 후 인슐린 신호전달 관련 단백질인 insulin receptor substrate-1 (IRS-1), Akt의 단백질 발현을 측정된 결과, 무막줄기세포추출물 처리 농도가 증가함에 따라 p-IRS-1/IRS의 단백질 발현이 감소하고 p-Akt/Akt의 단백질 발현이 증가하였다(Fig. 2). 이어서 무막줄기세포추출물을 처리한 3T3-L1 adipocyte에서 GLUT4 단백질 발현을 확인한 결과, control군과 비교하여 무막줄기세포추출물을 처리했을 때 GLUT4의 단백질 발현이 증가하는 것을 확인하였다.

4. Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) pathway 관련 단백질 발현 조절

무막줄기세포추출물에 의한 AMPK의 활성화를 확인하기 위해 Western blot analysis를 통해 단백질 발현을 측정된 결과, control군과 비교하여 p-AMPK/AMPK의 단백질 발현이 농도의존적으로 증가하였고, p-acetyl-CoA carboxylase (ACC)/ACC의 단백질 발현 또한 증가함을 확인하였다(Fig. 3). 특히 무막줄기세포추출물을 처리하지 않은 control군과 비교하여 2.5 µg/mL의 농도에서 가장 높은 p-AMPK/AMPK 및 p-ACC/ACC 단백질 발현 증가를 나타내었다.

고찰

당뇨병은 인슐린 합성 저해 또는 인슐린 저항성 증가로 인해 인슐린 작용력이 감소한 상태로, 포도당 대사 장애로 인한 비정상적인 고혈당을 수반한다¹⁾. 특히, 제2형 당뇨병의 경우 인슐린 저항성 발생으로 인한 고혈당이 주된 원인으로 이는 근육, 지방조직과 같은 말초조직에서 인슐린 민감성을 개선함으로써 당뇨병 및 당뇨 합병증의

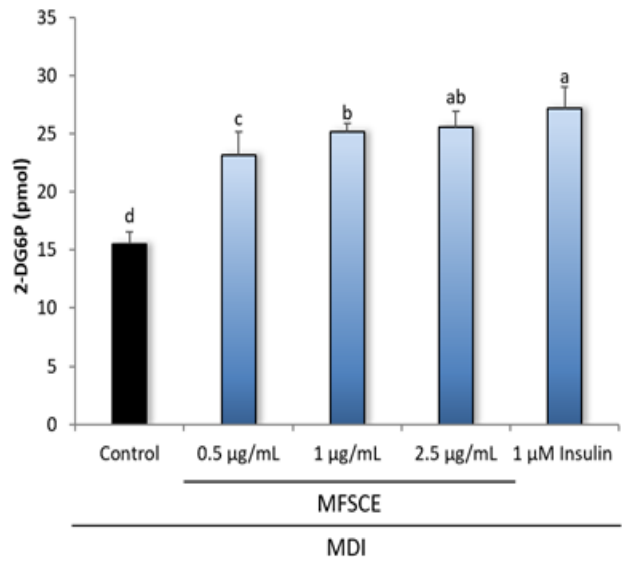


Fig. 1. Effect of membrane free stem cell extract from adipose tissue on glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. Values are mean±standard deviation from three independent experiments. The letters (a-d) represent significant differences (P<0.05) by Duncan's multiple range test. 2-DG6P: 2-deoxyglucose-6-phosphate, MFSCE: Membrane free stem cell extract from adipose tissue. MDI: 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 µM dexamethasone, and 10 µg/mL insulin.

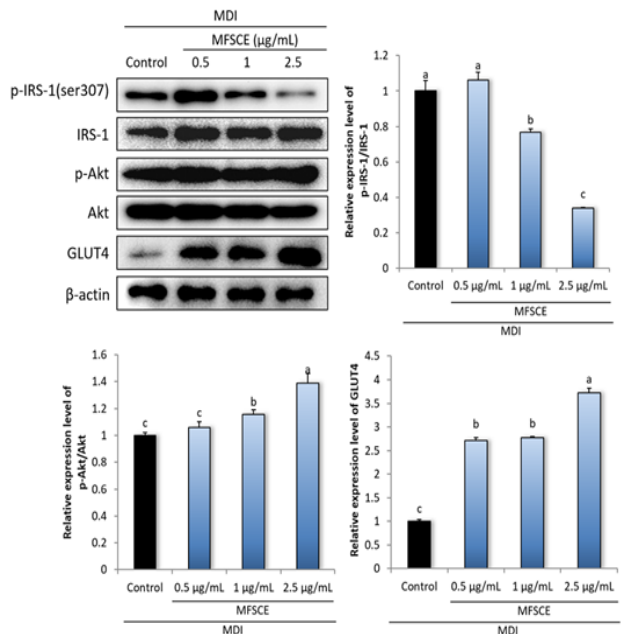


Fig. 2. Effects of membrane free stem cell extract from adipose tissue on insulin signaling-related protein expressions in 3T3-L1 adipocytes. Values are mean±standard deviation from three independent experiments. The letters (a-c) represent significant differences (P<0.05) by Duncan's multiple range test. MDI: 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 µM dexamethasone, and 10 µg/mL insulin, MFSCE: Membrane free stem cell extract from adipose tissue, IRS-1: insulin receptor substrate-1, GLUT4: glucose transporter 4.

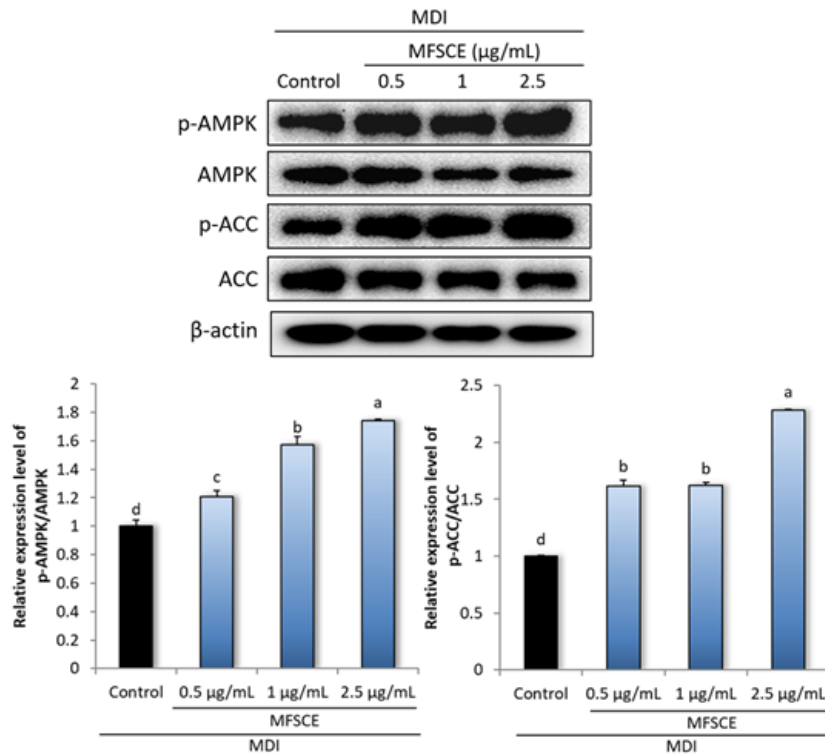


Fig. 3. Effects of membrane free stem cell extract from adipose tissue on AMPK pathway-related protein expressions in 3T3-L1 adipocytes. Values are mean±standard deviation from three independent experiments. The letters (a-d) represent significant differences (P<0.05) by Duncan's multiple range test. AMPK: adenosine monophosphate-activated protein kinase, MFSCE: Membrane free stem cell extract from adipose tissue. MDI: 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 μM dexamethasone, and 10 μg/mL insulin, ACC: Acetyl-CoA carboxylase.

증상을 호전시킬 수 있다¹⁵). 따라서 인슐린 민감성을 개선하기 위한 다양한 약물이 이용되고 있다. 현재 임상에서 사용되고 있는 경구용 혈당강하제는 말초조직에서 인슐린 저항성을 완화하는 metformin, 췌장세포에서 인슐린 분비를 촉진하는 sulfonylurea와 glinides, 소장에서 당 흡수를 지연시키는 α-glucosidase inhibitor 등이 있다¹⁶). 그러나 metformin은 설사, 구토와 같은 위장관 장애를 유발하며, sulfonylurea 역시 저혈당 유발 등의 부작용이 보고되고 있다^{4,17}). 따라서 부작용으로부터 자유로우면서도 효과가 탁월한 당뇨병 치료용 소재를 찾기 위한 연구가 계속해서 진행되고 있다. 본 연구에서는 무막줄기세포추출물의 포도당 흡수 효과와 그 기전을 살펴봄으로써 무막줄기세포추출물의 항당뇨 소재로서의 가능성을 평가하였다.

MTT assay는 세포의 증식과 성장을 확인할 수 있는 방법으로¹⁸), 3T3-L1 preadipocyte에서 무막줄기세포추출물의 세포독성을 확인하기 위하여 0.5-5 μg/mL 농도에서 MTT assay를 실시한 결과, 2.5 μg/mL의 농도까지 세포 생존에 영향을 미치지 않음을 확인하여 무막줄기세포추출물 0.5,

1, 2.5 μg/mL를 실험 농도로 설정하였다. 분화된 3T3-L1 adipocyte은 특히 인슐린에 민감하게 반응하며, 인슐린은 세포 내로 포도당 수송을 약 10배 속도로 촉진한다¹⁹). 따라서 3T3-L1 adipocyte는 인슐린 신호전달 작용을 통해 항당뇨 소재를 스크리닝하기 위한 효과적인 모델로서 널리 이용되고 있다²⁰). 무막줄기세포추출물의 포도당 흡수 촉진 효과를 알아보기 위해 3T3-L1 adipocyte에 무막줄기세포추출물을 처리한 뒤 glucose uptake assay를 실시하였다. 그 결과, 무막줄기세포추출물을 처리하였을 때 농도가 증가함에 따라 2-DG6P의 흡수가 증가한 것을 확인하여, 지방세포에서 포도당 흡수를 촉진하여 혈당 강하 효과를 나타낼 것으로 생각한다.

지방세포에서 포도당 흡수는 주로 인슐린 신호전달 과정을 거쳐 GLUT4에 의해 이루어진다. 인슐린 신호전달 과정은 IRS-1이 tyrosine kinase 활성을 가지는 insulin receptor에 의해 인산화되면서 시작된다²¹). 이 때 IRS-1의 serine 인산화가 촉진될 경우 IRS-1의 tyrosine 인산화가 감소됨으로써 결과적으로 인슐린 저항성을 유발할 수 있다²¹).

IRS는 ser 307과 tyr 612 phosphorylation을 조절하여 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), AKT, GLUT4 pathway에 관여함으로써, 항당뇨 활성 평가에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이전 연구에 의하면, 3T3-L1 세포에서 시료의 항당뇨 활성 평가 시 IRS ser 307 phosphorylation만으로 PI3K, AKT, GLUT4 pathway 조절을 설명한 것을 확인하여 본 연구에서도 IRS ser 307 phosphorylation을 이용하여 결과를 서술하였다²²⁾. Protein tyrosine kinase에 의해 tyrosine 인산화된 IRS-1는 차례로 PI3K, Akt, GLUT4를 활성화하며, 이 과정에서 GLUT4는 세포질에서 세포막으로 이동하여 포도당을 세포 내로 운반한다²³⁾. Glucose uptake assay 결과를 바탕으로 3T3-L1 adipocyte에서 무막줄기세포추출물이 인슐린 신호전달 과정에 미치는 영향을 알아보기 위해 Western blot analysis를 실시하였다. 분화가 유도된 3T3-L1 adipocyte에 무막줄기세포추출물을 처리했을 때, p-IRS-1/IRS의 단백질 발현이 감소하고 p-Akt/Akt 및 GLUT4 단백질 발현이 증가하였다. 따라서 무막줄기세포추출물은 인슐린 신호전달 작용을 촉진하여 GLUT4의 발현을 증가시킴으로써 지방세포 내 포도당 이용을 증가시키는 것으로 생각된다.

AMPK는 세포 내 에너지 항상성을 유지하는 조절인자로, 간에서 당 신생을 억제하고, 근육 및 지방세포에서 GLUT4의 발현을 증가시켜 포도당 흡수를 촉진한다²⁴⁾. 특히 AMPK는 독립적으로 GLUT4를 활성화하여 포도당 이용을 증가시키는 것으로 알려져 당뇨병 치료를 위한 타겟 인자로서 널리 연구되고 있다²⁵⁾. ACC는 AMPK의 substrate로, AMPK가 이를 인산화하여 세포 내 지방산 합성을 조절함으로써 에너지 균형을 조절한다. 무막줄기세포추출물에 의한 AMPK의 활성화를 확인하기 위해 Western blot analysis를 통해 단백질 발현을 측정된 결과, 무막줄기세포추출물 처리 시 p-AMPK/AMPK 및 p-ACC/ACC 단백질 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 따라서 무막줄기세포추출물이 3T3-L1 adipocyte에서 AMPK pathway를 활성화하는 것으로 나타났으며, 이는 인슐린 신호전달 경로와 함께 포도당 흡수능에 영향을 미칠 것으로 생각된다.

줄기세포를 이용한 치료법에는 대표적으로 줄기세포를 주입하는 방법과 줄기세포 추출물 또는 배양액 내의 유효 성분을 이용하는 방법이 있다. 이전 연구에 따르면 지방 유래 줄기세포는 다른 간엽 성체줄기세포와 마찬가지로 인슐린을 생성할 수 있는 췌장세포로 분화할 수 있다²⁶⁾.

또한 지방조직 내 기질에 존재하는 줄기세포는 조직이 손상되었을 때 paracrine factor를 분비하여 손상된 조직을 보호한다는 점에서 착안하여 지방조직 유래 줄기세포 추출물과 배양액의 활성연구가 활발히 이루어지고 있다. 지방조직 유래 줄기세포 배양액은 PC12 세포에서 AMPK pathway를 활성화하여 신경보호 작용을 나타냈다²⁷⁾. 이에 더하여 본 연구에서는 지방조직 유래 무막줄기세포추출물이 AMPK pathway와 인슐린 신호전달 경로를 통해 3T3-L1 adipocyte에서 포도당 흡수를 촉진함을 확인하였다. 이와 같은 결과는 지방 유래 줄기세포는 다양한 치료법을 통해 당뇨병 개선을 위한 물질로 이용될 수 있음을 시사한다. 본 연구에 사용한 무막줄기세포추출물은 (주)티스텍의 특허기술로 제조되었으며 줄기세포의 세포막을 제거한 뒤 각종 펩타이드와 성장인자 등을 함유한 추출물이다. 무막줄기세포추출물을 nano-liquid chromatography-mass spectrometry analysis에 의해 분석하였을 때 대사과정, 생리활성, 세포증식 등을 조절하는 252개의 단백질을 확인하였다 (data not shown). 이들 중 integrin alpha-5, integrin beta-1, -3 등을 포함한 19개 단백질은 세포 부착에 관여하며, 36개 단백질은 상처 치료에 관여하는 재생인자인 것으로 보고되었다. 또한 9개의 단백질은 NF- κ B signaling, toll-like receptor 4-dependent signaling 등을 조절하여 항염증 활성을 나타내며, SOD1, CD36 등을 포함하는 17개 단백질은 세포 해독작용에 관여하는 것으로 보고되었다(data not shown). 이러한 결과들을 종합해 볼 때, 무막줄기세포추출물의 펩타이드와 단백질 성분이 염증반응을 억제하고 세포 대사 과정을 조절하는 것으로 여겨지며, 본 연구와 관련하여 당 흡수를 개선시킬 수 있는 성분들에 관한 추가적인 연구가 필요한 것으로 생각된다. 또한, 무막줄기세포추출물은 기존 줄기세포의 1:1 환자 맞춤 제한 기술을 극복하고자 개발된 물질로 줄기세포 세포막에 붙어있는 면역원성을 제거하여 1:다수의 치료가 가능하고 산업화가 가능한 물질로써 기대된다.

결론

당뇨병은 인슐린 분비 또는 작용의 결함으로 인해 체내 혈당조절이 정상적으로 이루어지지 않아 만성적이고 혈당과 이에 수반되는 대사 장애가 지속되는 질환이다. 무막줄기세포추출물이 3T3-L1 지방세포에서 세포 내 포

도당 흡수에 미치는 영향을 확인한 결과, 무막줄기세포추출물을 처리했을 때 glucose uptake assay에서 2-DG6P 흡수가 증가하여 포도당 흡수 촉진 작용을 확인하였다. 또한 p-IRS-1 (ser 307)의 단백질 발현을 감소시키고, p-Akt, p-AMPK, p-ACC 및 GLUT4의 단백질 발현을 증가시켜 포도당 수송을 조절하는 것으로 생각된다. 이러한 결과들은 무막줄기세포추출물이 당뇨병 예방 및 치료를 위한 기능성 소재로 이용될 수 있음을 시사한다.

References

- Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006 ; 212 : 167-78.
- Ward WK, Beard JC, Halter JB, Pfeifer MA, Porte D. Pathophysiology of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus, *Diabetes Care.* 1984 ; 7 : 491-502.
- Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group. 2008. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008 ; 358 : 2545-59.
- Bouchoucha M, Uzzan B, Cohen R. Metformin and digestive disorders. *Diabetes Metab.* 2011 ; 37 : 90-6.
- Hussein Z, Wentworth JM, Nankervis AJ, Proietto J, Colman PG. Effectiveness and side effects of thiazolidinediones for type 2 diabetes: real-life experience from a tertiary hospital. *Med J Aust.* 2004 ; 181 : 536-9.
- Seo GS. Stem cell properties of therapeutic potential. *Korean J Gastroenterol.* 2011 ; 58 : 125-32.
- Fernyhough ME, Hausman GJ, Guan LL, Okine E, Moore SS, Dodson MV. Mature adipocytes may be a source of stem cells for tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 ; 368 : 455-7.
- Hu L, Zhao J, Liu J, Gong N, Chen L. Effects of adipose stem cell-conditioned medium on the migration of vascular endothelial cells, fibroblasts and keratinocytes. *Exp Ther Med.* 2013 ; 5 : 701-6.
- Jeon GS, Im W, Shim YM, Lee M, Kim MJ, Hong YH, et al. Neuroprotective effect of human adipose stem cell-derived extract in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochem Res.* 2016 ; 41 : 913-23.
- Rhie JW, Kim KJ. Adipose stem cell therapy: present, future. *J Korean Wound Manag Soc.* 2016 ; 12 : 39-45.
- Lee YJ, Baek SE, Lee S, Cho YW, Jeong YJ, Kim KJ, et al. Wound healing effect of adipose stem cell derived extracellular matrix sheet on full thickness skin defect rat model: Histological and immunohistochemical study. *Int Wound J.* 2019 ; 16 : 286-96.
- Yuan B, Broadbent JA, Huan J, Yang H. The effects of adipose stem cell-conditioned media on fibrogenesis of dermal fibroblasts stimulated by transforming growth factor- β 1. *J Burn Care Res.* 2017 ; 39 : 129-40.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 ; 65 : 55-63.
- Fakhoury H, Osman S, Ghazale N, Dahdah N, El-Sibai M, Kanaan A. Enhanced glucose uptake in phenylbutyric acid-treated 3T3-L1 adipocytes. *Cell Tissue Biol.* 2018 ; 12 : 48-56.
- Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet.* 2005 ; 365 : 1333-46.
- Lee JM. Antihyperglycemic agent combination therapy for patients with type 2 diabetes mellitus. *J Korean Med Assoc.* 2014 ; 57 : 435-43.
- Berger W. Incidence of severe side effects during therapy with sulfonylureas and biguanides. *Horm Metab Res.* 1985 ; 15 : 111-5.
- Levitz SM, Diamond RD. A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. *J Infect Dis.* 1985 ; 152 : 938-45.
- de Herreros RD, Birnbaum MJ. The acquisition of increased insulin-responsive hexose transport in 3T3-L1 adipocytes correlates with expression of a novel transporter gene. *J Biol Chem.* 1989 ; 264 : 19994-9.
- Yang YC, Hwang JH, Hong SJ, Hsu HK. Enhancement of glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes by Toona sinensis leaf extract. *Kaohsiung J Med Sci.* 2003 ; 19 : 327-32.
- Carlson CJ, White MF, Rondinone CM. Mammalian target of rapamycin regulates IRS-1 serine 307 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 ; 316 : 533-9.
- Mazibuko SE, Joubert E, Johnson R, Louw J, Opoku AR, Muller CJ. Aspalathin improves glucose and lipid metabolism in 3T3-L1 adipocytes exposed to palmitate.

- Mol Nutr Food Res. 2015 ; 59 : 2199-208.
23. Holman GD, Kasuga M. From receptor to transporter: insulin signalling to glucose transport. *Diabetologia*. 1997 ; 40 : 991-1003.
24. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 ; 13 : 251-62.
25. Ke R, Xu Q, Li C, Luo L, Huang D. Mechanisms of AMPK in the maintenance of ATP balance during energy metabolism. *Cell Biol Int*. 2018 ; 42 : 384-92.
26. Paek HJ, Kim C, Williams SK. Adipose stem cell-based regenerative medicine for reversal of diabetic hyperglycemia. *World J Diabetes*. 2014 ; 5 : 235-43.
27. Tan B, Luan Z, Wei X, He Y, Wei G, Johnstone BH, et al. AMP-activated kinase mediates adipose stem cell-stimulated neuritogenesis of PC12 cells. *Neuroscience*. 2011 ; 181 : 40-7.