



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0090683
(43) 공개일자 2020년07월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/077 (2010.01)

(52) CPC특허분류
C12N 5/0653 (2013.01)
C12N 2501/30 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0089425(분할)

(22) 출원일자 2020년07월20일

심사청구일자 없음

(62) 원출원 특허 10-2018-0160814

원출원일자 2018년12월13일

심사청구일자 2018년12월13일

(71) 출원인

연세대학교 원주산학협력단

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1

(72) 발명자

김지현

강원도 원주시 단관공원길 111, 112동 103호(단구동, 중앙하이츠아파트)

이정근

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 연세대학교 청연학사 1717호

(74) 대리인

김보민

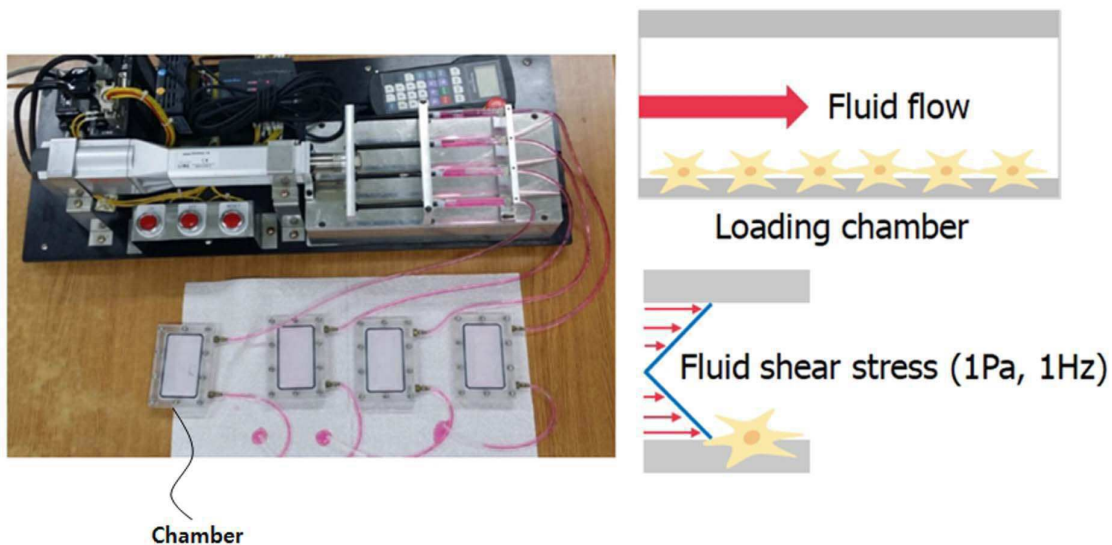
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 유체전단응력 및 멜라토닌을 이용한 지방전구세포의 지방세포로의 분화 억제 방법

(57) 요약

본 발명은 유체전단응력(Fluid shear stress) 및 멜라토닌(Melatonin)을 이용한 지방전구세포의 지방세포로의 분화 억제 방법에 관한 것으로, 구체적으로 지방전구세포에 멜라토닌을 처리하고 동시에 유체전단응력을 가하여 세포의 신호전달체계 관련 인자가 활성화되고, 지방생성의 지표 단백질의 발현이 감소하는 것을 확인하였으므로, 상기 유체전단응력 및 멜라토닌을 동시에 가하는 방법을 지방전구세포의 지방세포로의 분화 억제 방법으로 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 2521/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345270326

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기본연구지원사업

연구과제명 생체주기 내 운동을 통한 비만 조절에서 근골격계 조직의 역할 규명

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교(원주캠퍼스)

연구기간 2017.11.01 ~ 2018.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 지방전구세포에 0.1 내지 2 mM의 멜라토닌(Melatonin)을 포함하는 배양 배지를 처리하는 단계; 및
- 2) 상기 단계 1)의 지방전구세포에 유체전단응력(Fluid shear stress)을 가하는 단계를 포함하는, 지방전구세포의 지방세포로의 분화 억제 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)에서 지방전구세포에 0.5 내지 1.5 mM의 멜라토닌을 포함하는 배양 배지를 처리하는 것을 특징으로 하는, 지방전구세포의 지방세포로의 분화 억제 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 단계 1)에서 지방전구세포에 0.8 내지 1.3 mM의 멜라토닌을 포함하는 배양 배지를 처리하는 것을 특징으로 하는, 지방전구세포의 지방세포로의 분화 억제 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 단계 2)에서 유체전단응력을 75 내지 165분 동안 가하는 것을 특징으로 하는, 지방전구세포의 지방세포로의 분화 억제 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 단계 2)에서 유체전단응력을 90 내지 150분 동안 가하는 것을 특징으로 하는, 지방전구세포의 지방세포로의 분화 억제 방법.

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 단계 2)에서 유체전단응력을 105 내지 135분 동안 가하는 것을 특징으로 하는, 지방전구세포의 지방세포로의 분화 억제 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 단계 2)에서 유체전단응력을 진동수 0.1 내지 2 Hz, 압력 0.1 내지 2 Pa로 가하는 것을 특징으로 하는, 지방전구세포의 지방세포로의 분화 억제 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 단계 2)에서 유체전단응력을 진동수 0.5 내지 1.5 Hz, 압력 0.5 내지 1.5 Pa로 가하는 것을 특징으로 하는, 지방전구세포의 지방세포로의 분화 억제 방법.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 지방전구세포는 C/EBP β , PPAR γ 및 오스테오펀틴(Osteopontin)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 인자의 발현이 억제되는 것을 특징으로 하는, 지방전구세포의 지방세포로의 분화 억제 방법.

청구항 10

제 1항에 있어서, 상기 지방전구세포의 지방세포로의 분화 억제는 시험관 내에서 이루어지는 것을 특징으로 하는, 지방전구세포의 지방세포로의 분화 억제 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유체전단응력(Fluid shear stress) 및 멜라토닌(Melatonin)을 이용한 지방전구세포의 지방세포로의 분화 억제 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 비만은 과도한 에너지 섭취로 인한 지방 조직의 비정상적인 발달을 특징으로 하는 대사 질환이다. 비만으로 인한 대사 불균형의 직접적인 원인으로는 지방세포의 과잉 증식 및 성장을 꼽을 수 있는데, 특히 지방세포의 직경이 커질 경우 인슐린 민감도가 저하되어 혈당 조절에 문제가 생겨 항상성 유지에 있어 지방의 역할을 잃어버리게 된다. 따라서 비만을 치료하고 증상을 완화하기 위해 과도한 지방생성(adipogenesis)을 억제하고 지방세포의 세포자살(apoptosis)을 유발할 수 있는 방법을 찾기 위한 연구가 이루어지고 있다.

[0005] 지방생성은 지방세포로 분화하기 전 단계인 지방전구세포(pre-adipocyte)가 성숙한 지방세포(adipocyte)로 분화하는 일련의 과정으로, 세포 내 다양한 성장 인자들과 사이토카인(cytokine), 호르몬의 영향을 받는다. 지방 조직의 과도한 증식을 억제하기 위한 연구는 크게 화학 물질이나 호르몬을 활용한 분자생물학적 접근과 지방세포에 다양한 물리적 자극을 직접적으로 가하는 기계생물학(mechanobiology)적 접근으로 나눌 수 있다.

[0006] 호르몬의 경우 생체 주기와 관련한 연구가 지속되고 있으며, 그 중 송과선(pineal gland)에서 분비되어 생물의 일주기를 조절하는 멜라토닌(melatonin)과 지방세포와의 연관성에 대한 연구가 있다. 그러나 멜라토닌은 처리 시간, 농도, 대상 세포의 종류에 따라 세포의 apoptosis와 증식을 억제하는지 촉진시키는지 달라지기 때문에 보다 심도 있는 연구가 필요하다.

[0007] 한편, 기계생물학적 측면에서 지방 조직은 항상성 유지의 역할뿐만 아니라 물리적 하중을 견뎌내는 구조물로서도 역할을 수행하고, 각각의 세포는 다양한 물리적 자극에 적응하기 위해 이에 반응하는 수용체들을 가지고 있다. 이에 비만 치료의 일환으로 지방 조직과 물리적 자극 간의 상관관계를 규명하기 위한 시도도 계속되고 있다. 지방세포에 가해지는 자극은 힘의 크기가 고정된 정적인(static) 자극과 일정한 주기로 순환하는 동적인(dynamic) 자극으로 나눌 수 있다. 같은 종류의 자극이라 할지라도 힘의 크기 변화가 정적인지 동적인지에 따라 세포에 미치는 영향이 달라진다. 세포에 동적인 물리적 자극을 가하는 방법 중의 하나로, 세포를 슬라이드 위에 배양한 뒤 그 위로 얇은 공간을 조성하고 유체가 흐르게 하여 전단응력을 발생시키는 유체전단응력(Fluid shear stress, FSS)이 있다. 유체전단응력은 간엽줄기세포가 뼈 세포로 분화하도록 유도하는 한편 조골세포의 뼈 생성을 유도하는 것으로 알려져 있으나, 지금까지 지방세포와 유체전단응력 간의 상관관계에 대한 연구는 활발히 이루어지지 않고 있는 실정이다.

[0009] 이에 본 발명자들은 생화학적 접근법과 물리적 접근법을 융합하여 지방생성을 억제할 수 있는 방법을 개발하기 위해 노력한 결과, 지방전구세포에 멜라토닌을 처리하고 동시에 유체전단응력을 가하여 세포의 신호전달체계 관

런 인자가 활성화되고, 지방생성의 지표 단백질의 발현이 감소하는 것을 확인하여, 상기 유체전단응력 및 멜라토닌을 동시에 가하는 방법을 지방전구세포의 지방세포로의 분화 억제 방법으로 이용할 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0011]

(비특허문헌 0001) Y.W. Wang, and P.J.H. Jones, "Conjugated linoleic acid and obesity control: efficacy and mechanisms", Int. J. Obes., vol. 28, no. 8, pp. 941-955, 2004.

(비특허문헌 0002) P.G. Kopelman, "Obesity as a medical problem", Nature, vol. 404, pp. 635-643, 2000.

(비특허문헌 0003) M.I. Lefterova, and M.A. Lazar, "New developments in adipogenesis", Trends Endocrinol. Metab., vol. 20, no. 3, pp. 107-114, 2009.

(비특허문헌 0004) H. Kato, G. Tanaka, S. Masuda, J. Ogasawara, T. Sakurai, T. Kizaki, H. Ohno, and T. Izawa, "Melatonin promotes adipogenesis and mitochondrial biogenesis in 3T3-L1 preadipocytes", J. Pineal. Res., vol. 59, no. 2, pp. 267-275, 2015.

(비특허문헌 0005) D.E. Blask, L.A. Sauer, R.T. Dauchy, E.W. Holowachuk, M.S. Ruhoff, and H.S. Kopff, "Melatonin inhibition of cancer growth in vivo involves suppression of tumor fatty acid metabolism via melatonin receptor-mediated signal transduction events", Cancer res., vol. 59, no. 18, pp. 4693-4701, 1999.

(비특허문헌 0006) Y. Tanabe, M. Koga, M. Saito, Y. Matsunaga, and K. Nakayama, "Inhibition of adipocyte differentiation by mechanical stretching through ERK-mediated downregulation of PPAR γ 2", J. Cell. Sci., vol. 117, no. 16, pp. 3605-3614, 2004.

(비특허문헌 0007) H. Huang, R.D. Kamm, and R.T. Lee. "Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology", Am. J. Physiol. Cell. Physiol., vol. 287, no. 1, pp. C1-C11, 2004.

(비특허문헌 0008) M. Zeyda, K. Gollinger, J. Todoric, F.W. Kiefer, M. Keck, O. Aszmann, G. Prager, G.J. Zlabinger, P. Petzelbauer, and T.M. Stulnig, "Osteopontin is an activator of human adipose tissue macrophages and directly affects adipocyte function", Endocrinology, vol. 152, no. 6, pp. 2219-2227, 2011.

(비특허문헌 0009) F.M. Pavalko, R.L. Gerard, S.M. Ponik, P.J. Gallagher, Y. Jin, and S.M. Norvell, "Fluid shear stress inhibits TNF- α -induced apoptosis in osteoblasts: A role for fluid shear stress-induced activation of PI3-kinase and inhibition of caspase-3", J. Cell. Physiol., vol. 194, no. 2, pp. 194-205, 2003.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012]

본 발명의 목적은 유체전단응력(Fluid shear stress) 및 멜라토닌(Melatonin)을 이용한 지방전구세포의 지방세포로의 분화 억제 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014]

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

- [0015] 1) 지방전구세포에 0.1 내지 2 mM의 멜라토닌(Melatonin)을 포함하는 배양 배지를 처리하는 단계; 및
- [0016] 2) 상기 단계 1)의 지방전구세포에 유체전단응력(Fluid shear stress)을 가하는 단계를 포함하는, 지방전구세포의 지방세포로의 분화 억제 방법을 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은
- [0018] 1) 멜라토닌을 포함하는 유체를 개체에 투여하는 단계; 및
- [0019] 2) 상기 단계 1)의 유체에 전단응력을 가하는 단계를 포함하는, 비만 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명에서는 지방전구세포에 멜라토닌(Melatonin)을 처리하고 동시에 유체전단응력(Fluid shear stress)을 가하여 세포의 신호전달체계 관련 인자가 활성화되고, 지방생성의 지표 단백질의 발현이 감소하는 것을 확인하였으므로, 상기 유체전단응력 및 멜라토닌을 동시에 가하는 방법을 지방전구세포의 지방세포로의 분화 억제 방법으로 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 본 발명의 일 실시예에서 사용한 유체전단응력(fluid shear stress) 기기를 나타낸 도이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 3T3-L1 지방전구세포에 유체전단응력 및/또는 멜라토닌(Melatonin)을 처리하고 ERK의 활성화를 확인한 도이다.
- 도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따라 3T3-L1 지방전구세포에 유체전단응력 및/또는 멜라토닌을 처리하고 C/EBP β 의 단백질 발현을 확인한 도이다.
- 도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따라 3T3-L1 지방전구세포에 유체전단응력 및/또는 멜라토닌을 처리하고 PPAR γ 의 단백질 발현을 확인한 도이다.
- 도 3c는 본 발명의 일 실시예에 따라 3T3-L1 지방전구세포에 유체전단응력 및/또는 멜라토닌을 처리하고 오스테오폰틴(Osteopontin, OPN)의 단백질 발현을 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0026] 본 발명은
- [0027] 1) 지방전구세포에 0.1 내지 2 mM의 멜라토닌(Melatonin)을 포함하는 배양 배지를 처리하는 단계; 및
- [0028] 2) 상기 단계 1)의 지방전구세포에 유체전단응력(fluid shear stress)을 가하는 단계를 포함하는, 지방전구세포의 지방세포로의 분화 억제 방법을 제공한다.
- [0029] 본 발명에 있어, 상기 단계 1)에서 지방전구세포에 0.1 내지 2 mM의 멜라토닌을 포함하는 배양 배지를 처리하는 것이 바람직하고, 0.5 내지 1.5 mM의 멜라토닌을 포함하는 배양 배지를 처리하는 것이 보다 바람직하며, 0.8 내지 1.3 mM의 멜라토닌을 포함하는 배양 배지를 처리하는 것이 보다 더 바람직하고, 약 1 mM의 멜라토닌을 포함하는 배양 배지를 처리하는 것이 가장 바람직하다. 상기 범위를 벗어날 경우, 지방전구세포의 지방세포로의 분화가 촉진될 수 있다.
- [0030] 본 발명에 있어, 상기 단계 2)에서 유체전단응력은 세포에 동적인 물리적 자극을 가하는 방법으로, 세포, 구체적으로 지방전구세포를 슬라이드 위에 배양한 뒤 그 위로 얇은 공간을 조성하고 유체, 예컨대 멜라토닌을 포함하는 배양 배지가 흐르게 하여 전단응력을 발생시킬 수 있다. 보다 구체적으로 도 1에 나타낸 바와 같이 챔버 내 슬라이드 위에서 지방전구세포를 멜라토닌을 포함하는 배양 배지로 배양하고, 상기 챔버에 연결된 주사기를 이용하여 피스톤 운동을 가함으로써 상기 배양 배지가 흐르게 하여 전단응력을 발생시킬 수 있다.

- [0031] 또한, 상기 유체전단응력은 75 내지 165분 동안 가하는 것이 바람직하고, 90 내지 150분 동안 가하는 것이 보다 바람직하며, 105 내지 135분 동안 가하는 것이 보다 더 바람직하고, 120분 동안 가하는 것이 가장 바람직하다.
- [0032] 또한, 상기 유체전단응력을 진동수 0.1 내지 2 Hz, 압력 0.1 내지 2 Pa로 가하는 것이 바람직하고, 진동수 0.5 내지 1.5 Hz, 압력 0.5 내지 1.5 Pa로 가하는 것이 보다 바람직하며, 진동수 0.8 내지 1.2 Hz, 압력 0.8 내지 1.2 Pa로 가하는 것이 보다 더 바람직하고, 진동수 약 1.0 Hz, 압력 약 1.0 Pa로 가하는 것이 가장 바람직하다.
- [0033] 유체전단응력을 가하는 시간, 진동수 및 압력 범위가 상기 범위를 벗어날 경우 지방전구세포의 지방세포로의 분화가 촉진될 수 있다.
- [0034] 본 발명에 있어, 상기 지방전구세포는 지방생성 인자 또는 비만 환자에게서 염증을 유발하는 인자, 구체적으로 C/EBP β , PPAR γ 또는 오스테오폰틴(Osteopontin)의 발현이 억제되어 지방세포로의 분화가 억제된다.
- [0035] 본 발명에 있어, 상기 지방전구세포의 지방세포로의 분화 억제는 시험관 내에서 이루어질 수 있다.
- [0037] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 마우스 유래 3T3-L1 지방전구세포에 멜라토닌을 처리하고 동시에 유체전단응력을 가하여 세포의 신호전달체계 관련 인자인 ERK가 활성화되고, 지방생성의 지표인 C/EBP β , PPAR γ 및 오스테오폰틴 단백질의 발현이 감소하는 것을 확인하였다(도 2 및 도 3 참조).
- [0038] 따라서, 본 발명자들은 지방전구세포에 생리학적 자극 및 물리적 자극으로 멜라토닌 및 유체전단응력을 동시에 가하여 세포 신호전달을 활성화하고, 지방생성 관련 인자의 발현을 억제함을 확인하였으므로, 상기 유체전단응력 및 멜라토닌을 동시에 가하는 방법을 지방전구세포의 지방세포로의 분화 억제 방법으로 유용하게 이용할 수 있다.
- [0040] 또한, 본 발명은
- [0041] a) 멜라토닌을 포함하는 유체를 개체에 투여하는 단계; 및
- [0042] b) 상기 단계 1)의 유체에 전단응력을 가하는 단계를 포함하는, 비만 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0043] 본 발명에 있어, 상기 단계 a)에서 개체는 소, 돼지, 쥐, 인간, 토끼 등이 있으나, 상기 예에 의해 개체가 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 또한, 상기 단계 a)에서 유체는 하나 이상의 치료액, 혈액 또는 이들의 혼합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 또한, 상기 단계 a)에서 개체에 멜라토닌을 포함하는 유체를 개체에 정맥 투여, 경구 투여 또는 피하투여할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 또한, 상기 단계 a)에서 0.1 내지 2 mM의 멜라토닌을 포함하는 유체를 개체에 투여하는 것이 바람직하고, 0.5 내지 1.5 mM의 멜라토닌을 포함하는 유체를 개체에 투여하는 것이 보다 바람직하며, 0.8 내지 1.3 mM의 멜라토닌을 포함하는 유체를 개체에 투여하는 것이 보다 더 바람직하고, 약 1 mM의 멜라토닌을 포함하는 유체를 개체에 투여하는 것이 가장 바람직하다. 상기 범위를 벗어날 경우, 지방전구세포의 지방세포로의 분화가 촉진되어 비만 증상이 악화될 수 있다.
- [0047] 본 발명에 있어, 상기 단계 b)에서 전단응력은 75 내지 165분 동안 가하는 것이 바람직하고, 90 내지 150분 동안 가하는 것이 보다 바람직하며, 105 내지 135분 동안 가하는 것이 보다 더 바람직하고, 약 120분 동안 가하는 것이 가장 바람직하다.
- [0048] 또한, 상기 전단응력을 진동수 0.1 내지 2 Hz, 압력 0.1 내지 2 Pa로 가하는 것이 바람직하고, 진동수 0.5 내지 1.5 Hz, 압력 0.5 내지 1.5 Pa로 가하는 것이 보다 바람직하며, 진동수 0.8 내지 1.2 Hz, 압력 0.8 내지 1.2 Pa로 가하는 것이 보다 더 바람직하고, 진동수 약 1.0 Hz, 압력 약 1.0 Pa로 가하는 것이 가장 바람직하다.
- [0049] 전단응력을 가하는 시간, 진동수 및 압력 범위가 상기 범위를 벗어날 경우 지방전구세포의 지방세포로의 분화가 촉진되어 비만 증상이 악화될 수 있다.
- [0050] 또한, 상기 전단응력은 생체 외에서 유체에 전단응력을 가하는 시스템을 이용하여 가할 수 있고, 운동, 예컨대

제자리뛰기 또는 달리기 등을 통해 가할 수 있다.

[0051] 본 발명자들은 지방전구세포에 생리학적 자극 및 물리적 자극으로 멜라토닌 및 유체전단응력을 동시에 가하여 세포 신호전달을 활성화하고, 지방생성 관련 인자의 발현을 억제함을 확인하였으므로, 상기 유체전단응력 및 멜라토닌을 동시에 가하는 방법을 비만 예방 또는 치료 방법으로 유용하게 이용할 수 있다.

[0053] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0054] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0056] <실시예 1> 지방전구세포 배양

[0057] 지방세포의 분화를 억제하는 방법을 알아보기 위하여, 지방 조직 및 세포 실험에 주로 사용되는 마우스 유래 지방전구세포를 배양하였다.

[0058] 구체적으로, 마우스 유래 3T3-L1 지방전구세포(한국세포주은행)를 1주일에 한 번 confluence가 80% 이상 도달했을 때 계대 배양을 수행하였다. 계대 배양은 calf serum (CS) 5%, penicillin/streptomycin 1%가 포함된 DMEM(Dulbecco's modified eagle's medium) 배지를 사용하여 수행하였다. 배지 교환은 새로 계대 배양한지 3일 후에 실시하였다. 세포 배양에 사용된 모든 용액은 사용 전 water bath를 이용하여 37℃로 맞춰 사용하였다. 세포 배양기는 온도 37℃에 이산화탄소 농도 5%로 고정하였다.

[0060] <실시예 2> 멜라토닌 및 유체전단응력 동시 처리에 따른 지방세포 분화 억제 확인

[0061] <2-1> 멜라토닌 및 유체전단응력 동시 처리에 따른 지방전구세포의 신호전달체계 활성화 확인

[0062] 지방생성을 억제하는 동적 신축(dynamic stretching) 자극은 ERK(extracellular signal-regulated kinase)를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 따라서, 생화학적 접근법과 물리적 접근법을 융합하여 지방세포의 분화를 억제하는 방법을 알아보기 위하여, 지방전구세포에 멜라토닌 및 유체전단응력을 동시 처리한 후 세포의 신호전달체계 활성화 정도를 분석하였다.

[0063] 구체적으로, 상기 <실시예 1>에서 충분히 배양한 3T3-L1 지방전구세포를 trypsin을 이용하여 떼어준 뒤 유리 슬라이드 위에 6×10^5 개씩 분주하여 배양하였다. 그 다음, 상기 배양한 세포를 도 1에 나타낸 바와 같이 자체 제작한 유체전단응력 기기에 연결된 챔버(chamber) 안에 넣었다. 유체전단응력 단독 처리 실험군(FSS)은 진동수 1 Hz, 1 Pa의 압력으로 총 2시간 동안 유체전단응력을 가하였다. 유체전단응력을 가할 때 사용된 배지는 세포 배양에 쓰인 것과 동일한 조건의 배지를 사용하였다. 또한, 유체전단응력 및 멜라토닌 동시 처리 실험군(Mel+FSS)은 1 mM의 멜라토닌을 투여한 배지를 사용하여 상기에 기재된 방법과 동일한 방법으로 유체전단응력을 가하였다. 또한, 멜라토닌 단독 처리 실험군(Mel)은 3T3-L1 지방전구세포에 1 mM의 멜라토닌을 투여한 배지를 처리하고 2시간 동안 실온에 두었다. 대조군(Con)은 3T3-L1 지방전구세포에 세포 배양에 쓰인 배지를 처리하고 2시간 동안 실온에 두었다.

[0064] 2시간 후 상기 대조군 및 실험군 각각의 세포를 회수한 후, 웨스턴 블롯팅을 수행하였다. Gel 제작 시 acrylamide/bis 농도는 running gel 9%, stacking gel 5%로 설정하였으며, 80 V의 전압으로 2시간 동안 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후, 100 V의 전압에서 50분 동안 단백질을 PVDF membrane으로 transfer한 후 shaker를 이용, membrane을 1시간 동안 5% skim milk로 blocking 하였다. 1차 항체는 BSA에 1:1000의 비율로 희석하여 사용하였고, shaker에서 배양하였다. 2차 항체는 5% skim milk에 1:5000의 비율로 희석하여 사용하였고, 1시간 동안 shaker에서 배양하였다. 항체 처리의 각 과정 사이에는 TBS-T용액을 사용하여 10분씩 네 번, 총 40분 간 membrane을 shaker로 washing하였다. 세포의 신호전달체계 활성화 정도를 분석하기 위해, 1차 항체로 항-ERK 항체, 항-p-ERK 항체, 항-GAPDH 항체를 사용하였다.

[0065] 그 다음, 감광하여 필름에 검출된 밴드는 Image J 프로그램을 이용하여 밴드의 상대적 밝기를 측정 후, Graphpad Prism 5 프로그램을 이용하여 그래프를 산출하였고, 같은 프로그램을 이용하여 one-way ANOVA를 수행하였다. 결과 값은 평균±표준편차 (SD)로 표현하였고, 사후 검정은 Tukey's test를 사용하였다. 유의 수준은 0.05로 설정하였다.

[0066] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 유체전단응력 및 멜라토닌 동시 처리 실험군(Mel+FSS)의 경우 대조군(Con), 멜라토닌 단독 처리 실험군(Mel) 및 유체전단응력 단독 처리 실험군(FSS)에 비해 ERK의 활성화 형태인 p-ERK의 발현이 현저히 높게 나타남을 확인하였다(도 2).

[0067] 상기의 결과를 통해 유체전단응력 및 멜라토닌 동시 자극에 의해 신호전달이 더욱 활발히 이루어짐을 확인하였다.

[0069] <2-1> 멜라토닌 및 유체전단응력 동시 처리에 따른 지방전구세포의 신호전달체계 활성화 확인

[0071] *C/EBP β (CCAAT/enhancer-binding protein β) 및 PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor γ)은 지방전구세포의 세포신호전달에서 열량 보존이 주 역할인 백색 지방의 생성을 조절하는 역할을 하며, 이에 지방 생성 핵심 지표 인자로 잘 알려져 있다. 따라서 생화학적 접근법과 물리적 접근법을 융합하여 지방세포의 분화를 억제하는 방법을 알아보기 위하여, 지방전구세포에 멜라토닌 및 유체전단응력을 동시 처리한 후 지방생성 핵심 지표 인자의 발현을 분석하였다.

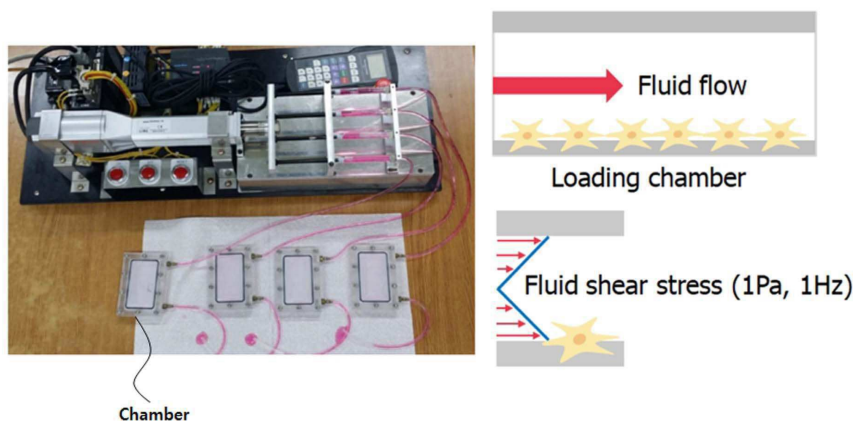
[0072] 구체적으로, 상기 실시예 <2-1>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 유체전단응력 및/또는 멜라토닌을 처리하고, 웨스턴 블롯팅을 수행하였다. 이때, 지방생성 핵심 지표 인자의 발현을 분석하기 위해, 1차 항체로 항-C/EBP β 항체, 항-PPAR γ 항체, 항-오스테오펀틴(Osteopontin, OPN) 항체, 항-GAPDH 항체를 사용하였다.

[0073] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 유체전단응력 및 멜라토닌 동시 처리 실험군(Mel+FSS)의 경우 대조군(Con), 멜라토닌 단독 처리 실험군(Mel) 및 유체전단응력 단독 처리 실험군(FSS)에 비해 지방생성의 지표 인자인 C/EBP β 및 PPAR γ 의 단백질 발현이 현저히 감소함을 확인하였다. 또한, 지방 조직에서 cleaved form으로 분비되어 비만 환자에게서 염증을 유발하는 OPN의 단백질 발현이 현저히 감소함을 확인하였다(도 3).

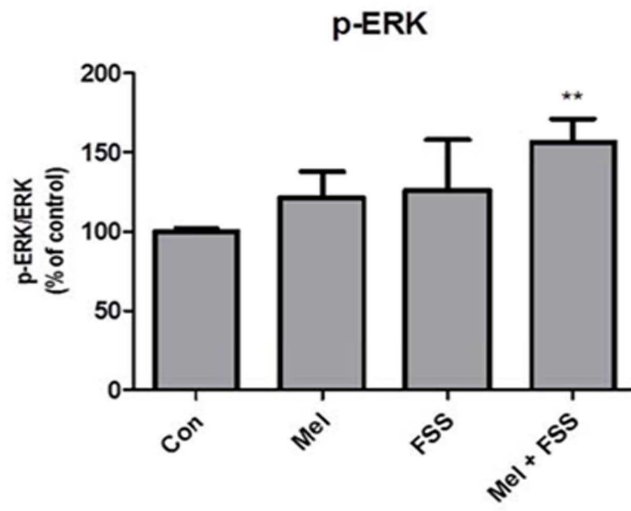
[0074] 상기의 결과를 통해 유체전단응력 및 멜라토닌 동시 자극에 의해 신호전달이 활성화되고 지방생성 인자의 발현이 억제되어 지방세포 분화가 억제되고, 이를 통해 지방생성이 억제됨을 확인하였다. 또한, 유체전단응력 및 멜라토닌 동시 자극에 의해 OPN의 발현이 억제되어 비만 증상을 개선할 수 있음을 확인하였다.

도면

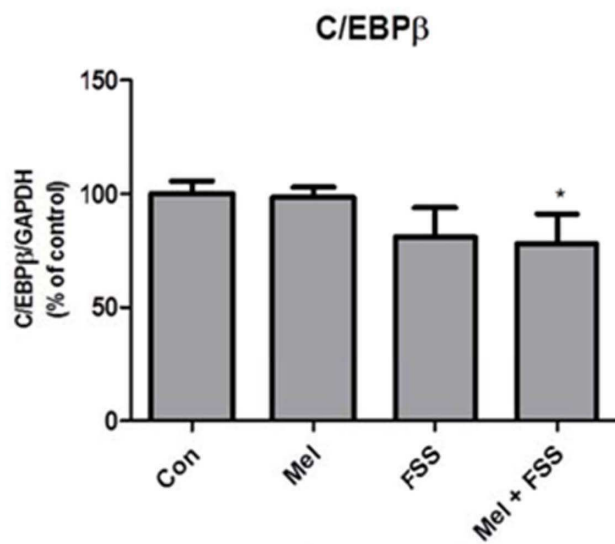
도면1



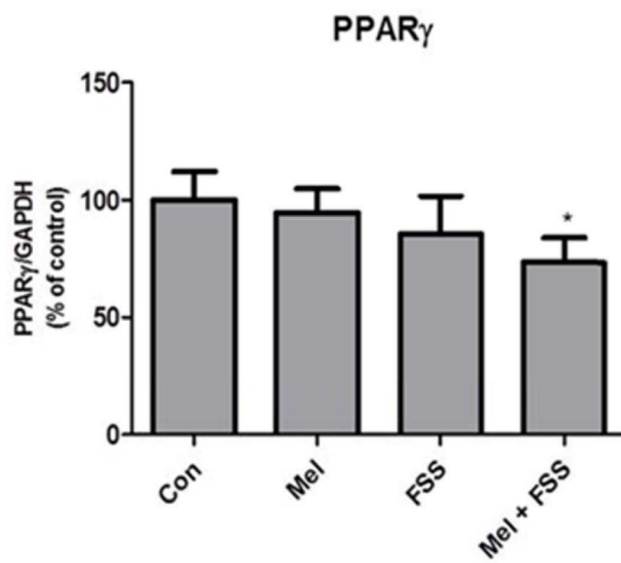
도면2



도면3a



도면3b



도면3c

