

무막줄기세포추출물의 LLC-PK₁ 세포에서의 산화적 스트레스 개선 효과

김민정¹, 김지현¹, 박혜숙², 김영실², 조은주^{1*}
¹부산대학교 식품영양학과 및 김치연구소 ²(주)티스텝

Protective Effect of Membrane-Free Stem Cell Extract against Oxidative Stress in LLC-PK₁ Cells

Min Jeong Kim¹, Ji Hyun Kim¹, Hye Sook Park², Young Sil Kim², Eun Ju Cho^{1*}

¹Department of Food Science and Nutrition & Kimchi Research Institute, Pusan National University
²T-STEM Co., Ltd.

요약 신장에서 발생한 산화적 스트레스는 조직을 손상시키고 이는 만성신장질환으로 이어질 수 있다. 본 연구에서는 LLC-PK₁ 신장세포를 이용하여 산화적 스트레스 개선 효과를 살펴보았다. LLC-PK₁ 세포에 무막줄기세포추출물을 처리했을 때 체내 항산화 단백질인 heme-oxygenase-1, thioredoxin reductase 1, 및 NADPH quinone oxidoreductase-1의 발현이 증가함을 확인하였다. LLC-PK₁에 산화적 스트레스를 유도하기 위하여 3-morpholinosydnonimine (SIN-1)을 처리한 결과 세포생존율이 감소하여 산화적 스트레스로 인해 세포가 손상됨을 확인하였다. 그러나 무막줄기세포추출물을 처리하였을 때 세포생존율이 증가하였으며, 2.5 µg/mL에서 세포생존율이 58.84%에서 64.43%까지 증가하였다. 또한 무막줄기세포추출물은 LLC-PK₁ 세포에서 SIN-1으로 유도된 염증 및 세포사멸을 조절하였다. 염증 관련 단백질인 inducible nitric oxide synthase와 cyclooxygenase-2는 무막줄기세포추출물을 처리했을 때 단백질 발현이 감소하였고, 세포사멸과 관련된 B-cell lymphoma-2-associated X protein/B-cell lymphoma-2 비율과 cleaved caspase-3, cleaved-poly (ADP-ribose) polymerase의 단백질 발현이 감소함을 확인하였다. 결과적으로 무막줄기세포추출물은 SIN-1을 처리한 LLC-PK₁ 세포에서 산화적 스트레스에 대한 보호 효과가 있음을 알 수 있었으며, 이들 결과를 바탕으로 무막줄기세포추출물의 항산화 기능성 소재로서의 활용 가능성을 확인하였다.

Abstract Oxidative stress in kidneys can precede the development of chronic renal injury. We investigated the antioxidative effect of membrane-free stem cell extract (MFSCE) from adipose tissue in LLC-PK₁ renal proximal tubule cells. Treatment of LLC-PK₁ cells with MFSCE showed the up-regulation of heme-oxygenase-1, thioredoxin reductase 1, and NADPH quinone oxidoreductase-1 protein expressions, which are proteins related with antioxidative activities. When oxidative stress was induced by 3-morpholinosydnonimine (SIN-1), cell viability was decreased, indicating that LLC-PK₁ cells were damaged by SIN-1. However, MFSCE significantly elevated cell viability from 58.84% to 64.43% at the concentration of 2.5 µg/mL in oxidative stress-induced LLC-PK₁ cells. Furthermore, MFSCE ameliorated inflammation and apoptosis in SIN-1-treated LLC-PK₁ cells by modulating protein expressions. Inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 protein expressions were down-regulated when LLC-PK₁ cells were treated with MFSCE. Apoptosis-related proteins, including B-cell lymphoma-2-associated X protein/B-cell lymphoma-2 ratio, cleaved caspase-3, and cleaved-poly (ADP-ribose) polymerase, were also down-regulated. It indicated that MFSCE protected apoptosis against oxidative stress in LLC-PK₁ cells. Taken together, these results suggested that MFSCE had a protective effect against SIN-1-induced oxidative stress in LLC-PK₁ cells. Therefore, MFSCE could be a promising therapeutic agent for oxidative stress-induced renal injury.

Keywords : Apoptosis, Inflammation, LLC-PK₁, Membrane-Free Stem Cell Extract, Oxidative Stress

*Corresponding Author : Eun Ju Cho(Pusan National Univ.)

email: ejcho@pusan.ac.kr

Received May 7, 2019

Revised June 4, 2019

Accepted August 2, 2019

Published August 31, 2019

1. 서론

인체는 생명을 유지하는데 필요한 에너지를 얻기 위하여 호흡과정을 통해 끊임없이 산소를 대사하며, 이 과정에서 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)을 생산한다[1]. Nitric oxide (NO)로부터 파생된 질소화합물을 통칭하는 활성질소종 (reactive nitrogen species, RNS)은 염증반응 시 발생하며, 유인된 대식세포와 호중구의 면역반응의 일환으로 NO synthase에 의해 다량 생성된다[2]. ROS와 RNS를 포함하는 free radical은 분자구조적으로 매우 불안정하기 때문에 지질, 단백질, DNA와 같은 고분자의 세포성분과 반응하여 지질 산화, 단백질 분해, DNA 변성 등을 일으켜 세포의 손상을 초래한다[3]. 인체는 이러한 free radical로부터 정상 세포를 보호하기 위해 항산화 효소 체계를 통해 free radical을 반응성이 작은 물질로 환원하지만, free radical이 과다하게 생성되거나 생체 내 항산화 효소 체계의 활성이 저해되어 이들 간의 균형이 깨어질 경우 산화적 스트레스가 발생하여 세포의 손상 및 손실을 초래하며, 노화를 비롯한 고혈압, 동맥경화와 같은 다양한 질환의 발병으로 이어질 수 있다[4,5].

신장은 체내에서 활발히 대사하는 조직으로 산화적 인산화를 통해 ATP를 생산하는 호기성 호흡이 활발히 일어나며, 조직을 구성하는 지질 성분 중 long-chain polyunsaturated fatty acid가 풍부한 것으로 알려져 있어 산화적 스트레스로 인한 세포 손상의 위험이 높은 기관이다[6,7]. 만성 신부전 환자의 경우 미토콘드리아 내 산소전달계에서 전자 전달이 비효율적으로 이루어짐에 따라 ROS 생성이 증가할 뿐만 아니라 항산화 효소인 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione 혈중 농도가 감소하여 더 많은 산화적 스트레스가 축적된다[6,8]. 신장 근위 세뇨관 세포 (renal proximal tubule cell)는 체내에서 여과된 물질의 재흡수 등 중요한 역할을 담당하고 있으며, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase의 isoform인 nephrox가 신장 근위 세뇨관 세포에서 ROS를 생성하는 주요 효소로 알려져 있다[8]. 신장의 피질부위에 위치한 근위 세뇨관 세포가 산화적 스트레스에 노출될 경우 급·만성 신독성 및 신기능부전 등의 질병을 야기할 수 있으므로, 산화적 스트레스 개선을 통한 신장 보호 효과를 확인하기 위해 신장 근위 세뇨관 상피 세포인 LLC-PK₁ 세포가 이용되고 있다[9-10].

줄기세포는 특정 조건에서 다양한 조직으로 분화할 수

있는 능력을 가진 미분화 세포로, 최근 이러한 다중분화능을 이용한 줄기세포 연구가 활발히 진행되고 있다[11]. 줄기세포에는 수정란으로부터 얻어지는 배아줄기세포와 수정란의 발생과정 후 성체로부터 얻어지는 성체줄기세포가 있으며, 그 중 성체줄기세포는 죽은 세포나 손상된 조직을 대체하기 위해 각 조직에 존재한다[12]. 윤리적 문제로부터 비교적 자유로운 성체줄기세포의 이용이 선호되고 있지만, 성체줄기세포를 바로 주입하는 형식은 면역역거부반응 등의 이유로 본인의 것으로 제한되는 한계가 있다[13]. 따라서 줄기세포를 주입하는 대신 줄기세포 배양액을 사용하기도 하나, 이러한 배양액은 소혈청 및 항생제와 같이 세포 배양 시 필요한 기타 첨가제가 함유되어 있어 유효성분의 함유량이 적고, 이러한 성분들이 주입될 경우 원하는 기능이나 효능 이외에 원하지 않는 부정적인 효과가 나타날 수 있다[14]. 따라서 무막줄기세포 추출물 (MFSCE; membrane-free stem cell extract)을 이용함으로써 유효성분을 효과적으로 추출할 뿐만 아니라 불순물로 인한 부작용을 방지하여 그 효과가 증대될 것으로 기대된다. 무막줄기세포추출물을 이용하여 신장 근위 세뇨관 세포에서 산화적 스트레스 개선 효과를 확인한 연구는 거의 전무한 실정이므로 본 연구에서는 LLC-PK₁ 세포를 이용하여 무막줄기세포추출물의 산화적 스트레스 개선 효과를 검토하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험재료

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin streptomycin, trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 WelGENE (Gyeongsan, Korea)에서 구입하였다. 3-Morpholiniosydnonimine (SIN-1)은 Santa Cruz Biotech. (Santa Cruz, CA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,3-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA)사 제품을 구매하여 사용하였다. 1차 항체와 2차 항체는 Cell Signaling Tech. (Beverly, MA, USA)와 Santa Cruz Biotech. (Santa Cruz, CA)에서 구매하였다. Enhanced chemiluminescence (ECL) solution는 BioRad (Hercules, CA, USA)에서 구입하였다.

2.2 무막줄기세포추출물 제조

본 시험에 사용된 무막줄기세포추출물은 ㈜티스템으로부터 제공받았다. 무막줄기세포추출물은 줄기세포 성분 추출물로, 인체지방조직에서 줄기세포를 분리, 배양한 후 세포막을 제거하여 획득하였다. 원재료인 지방조직은 혈액검사를 통해 이상이 없는 20대 여성 중 BMI 25 ~ 29.9에 해당하는 사람을 대상으로 지방공여동의서를 받고 확보하였다. 시행한 혈액검사 항목은 B형간염바이러스, C형간염바이러스, 인체면역결핍바이러스, 인체T림프영양성바이러스, 파보바이러스B19, 사이토메가로바이러스, 엡스타인바바이러스, 매독크레포네마 등이다. 최종제인 무막줄기세포는 Good Laboratory Practice 인정기관에서 안전성 검사를 완료하여 독성이 없는 물질임을 확인하였다. 위의 과정을 거쳐 획득한 지방조직에서 지방줄기세포를 분리하여 정제한 후, 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 초기배양을 실시하였으며, 세포가 자란 정도를 확인한 후 계대배양을 6~10회 반복하였다. 배지를 제거하고 줄기세포를 일정한 수득하여 초음파 등의 물리적 방법을 사용하여 세포막을 벗기고, 필터 등의 방법을 이용하여 세포막 조각을 제거하여 무막줄기세포추출물을 획득하였다. 수용액 상태의 무막줄기세포추출물은 동결건조하여 파우더 제형으로 만든 후 5 ± 2°C에서 보관하였다.

2.3 세포 배양

실험에 사용된 LLC-PK₁ 세포는 ATCC (Manassas, USA)사에서 구매하여 실험에 사용하였다. LLC-PK₁ 세포는 5% FBS, 100 units/mL penicillin streptomycin가 함유된 DMEM을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 1~2일에 한 번씩 배양액을 교체하면서 배양하여 80-90% confluence 상태에서 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 세포를 세척한 후 0.05% trypsin과 0.02% EDTA 혼합액으로 부착된 세포를 분리하여 1,000 rpm에서 3분간 원심 분리 한 후 현탁하여 사용하였다.

2.4 MTT assay

LLC-PK₁ 세포는 90-100% confluence 상태가 되면 96-well plate에 각각 1×10^4 cells/mL로 seeding하여 실험에 사용하였다. LLC-PK₁ 세포는 seeding 후 37°C에서 2시간 배양시켜 세포가 잘 부착되면 SIN-1 (300 μM)를 첨가하여 24시간 배양하였다. Generator로 산화

적 스트레스 유발 후, 무막줄기세포추출물 (0.5, 1, 2.5 μg/mL)을 처리하여 24시간 배양한 뒤 5 mg/mL의 MTT solution을 각 well에 처리하였다. 37°C에서 4시간 동안 재배양한 후 생성된 formazan 결정을 DMSO에 녹여 30분간 실온에서 방치 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다[15].

2.5 Western blot analysis

배양한 세포에 RIPA buffer를 첨가한 후 4°C, 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 상층액을 이용하여 단백질 정량을 실시하였다. 각각의 시료를 8-10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에서 전기영동하여 membrane에 transfer하였다. 단백질이 부착된 membrane은 5% skim milk로 상온에서 50분 blocking 한 다음, 1차 항체를 4°C에서 overnight하며 반응시킨 후, PBS-T로 세척하고 2차 항체와 상온에서 1시간 반응시켰다. 이후 PBS-T로 세척 후 ECL solution과 반응시켜 chemiluminescence image system (Davinch-ChemiTM)을 이용하여 단백질 발현을 확인하였다.

2.6 통계분석

모든 실험 결과는 mean ± standard deviation (SD)로 나타내었다. 통계 프로그램은 Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)를 이용하여 분석하였으며, analysis of variance (ANOVA) test 및 Duncan's multiple range test를 이용하여 $P < 0.05$ 수준에서 각 군의 유의성을 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

신장 근위 세뇨관 세포는 free radical로 인한 산화적 스트레스에 민감한 세포로 알려져 있다. 신장 근위 세뇨관 상피 세포인 LLC-PK₁ 세포에 H₂O₂를 처리하여 산화적 스트레스를 유도했을 때, 세포막의 지질 산화 및 세포질 내 Ca₂⁺ 이온의 비정상적인 증가가 세포에 비가역적으로 손상을 일으킨다[16,17]. 또한 산화적 스트레스로 인해 ion gradient가 붕괴되어 ATP 결핍과 Na⁺-K⁺-ATPase의 불활성화를 유도하며 이는 포도당 및 인산 수송의 저해로 이어져 세포 손상을 유도한다[18]. LLC-PK₁ 세포에서 hydroxyl radical을 비롯한

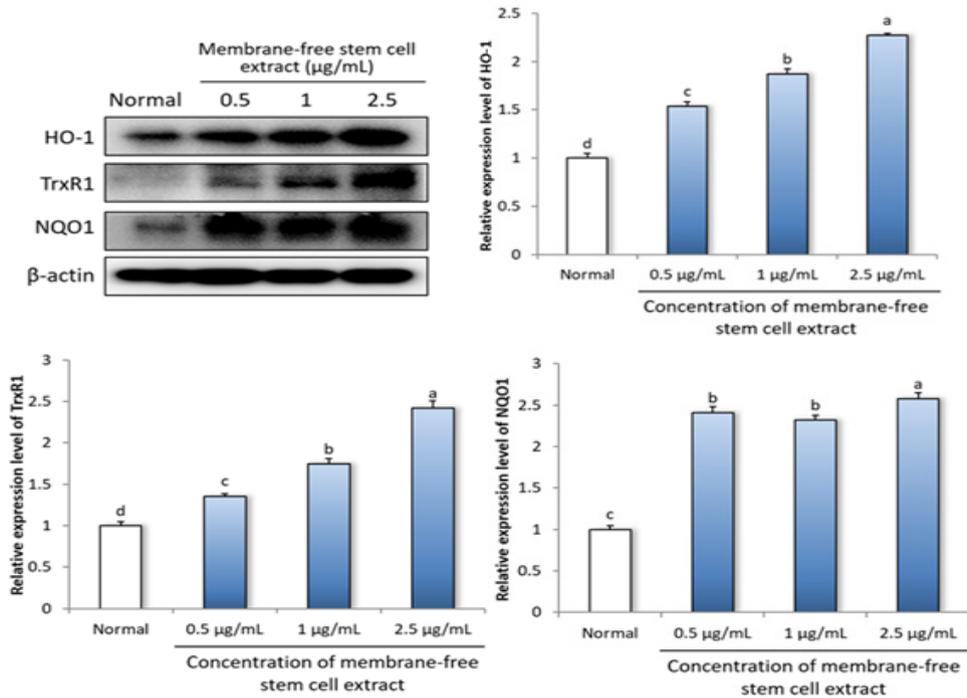


Fig. 1. Effect of membrane-free stem cell extract from adipose tissue on antioxidant activity-related protein expressions in LLC-PK₁ cells. Cells were treated with 300 μM SIN-1 for 24 hr, and then incubated with 0.5, 1, 2.5 μg/mL membrane-free stem cell extract for 24 hr. Values are mean ± SD. The letters (a-d) represent significant differences (*P* < 0.05) by Duncan's multiple range test.

산소 대사물은 endonuclease를 활성화시켜 DNA를 분절하여 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다[19]. 따라서 산화적 스트레스에 의한 세포 손상 연구에 널리 이용되는 세포주인 LLC-PK₁ 세포에 SIN-1으로 산화적 스트레스를 유도한 후 무막줄기세포추출물의 세포 보호 효과를 확인하여 항산화제로서 무막줄기세포추출물의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

3.1 항산화 관련 단백질 발현 조절

체내에 산화적 스트레스가 발생할 경우, ROS에 대한 방어효소의 발현을 조절하는 전사인자인 nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf-2)가 heme- oxygenase-1 (HO-1), thioredoxin reductase 1 (TrxR1), NADPH quinone oxidoreductase-1 (NQO1)과 같은 항산화 단백질의 발현을 증가시켜 산화적 스트레스로부터 세포를 보호한다[20-23]. HO-1은 세포 내의 heme을 biliverdin과 일산화탄소로 분해하며, 이들은 항산화 및 항염증 작용을 통해 산화적 스트레스를 감소시킨다[24]. TrxR1과 NQO1은 산화환원 반응을 통해 산화적 스트레

스로부터 세포를 보호하는 것으로 알려져 있다[23,25,26]. LLC-PK₁ 세포에 무막줄기세포추출물을 농도별로 처리하여 HO-1, TrxR1 및 NQO1의 단백질 발현을 측정할 결과, 무막줄기세포추출물을 처리하였을 때 이들 단백질 발현이 증가하였으며, HO-1과 TrxR1의 단백질 발현이 농도유의적으로 증가함을 확인하였다 (Fig. 1). 이러한 결과를 통해 무막줄기세포추출물은 항산화 효과가 있는 단백질의 발현을 증가시킴으로써, free radical로 유도되는 세포의 산화적 스트레스를 보호할 것으로 사료된다.

3.2 세포생존율 조절

ROS는 동맥경화를 비롯한 혈관 질환의 병리적 매개물질로 작용하며, RNS 중 NO는 과도하게 생성될 경우 혈관확장, 염증반응을 유발하여 조직에 손상을 일으킨다[27]. NO가 O₂와 반응하여 생성되는 ONOO⁻는 O₂⁻와 NO와 비교했을 때 그 반응성이 크게 증가하여 강한 조직 파괴력을 나타낸다[28]. LLC-PK₁ 세포에 300 μM SIN-1을 24시간 동안 처리하여 ONOO⁻의 생성을 유도한 후, 무막줄기세포추출물을 처리하여 신장 근위 세뇨관

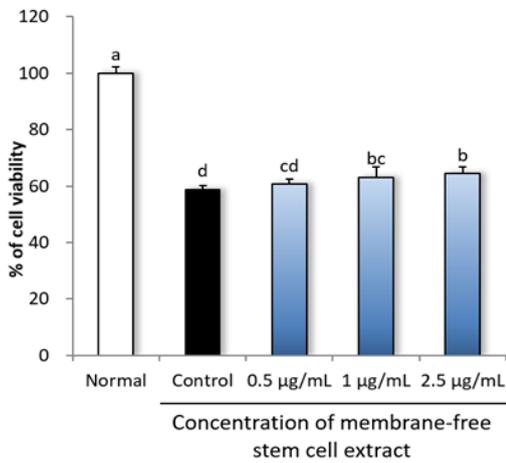


Fig. 2. Effect of membrane-free stem cell extract from adipose tissue on cell viability in LLC-PK₁ cells treated with SIN-1. Cells were treated with 300 µM SIN-1 for 24 hr, and then incubated with 0.5, 1, 2.5 µg/mL membrane-free stem cell extract for 24 hr. Values are mean ± SD. The letters (a-c) represent significant differences ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

세포에서 산화적 스트레스에 대한 무막줄기세포추출물의 효과를 확인하였다. 그 결과, normal군 100% 대비 SIN-1을 단독으로 처리한 control군에서 58.84%로 세포 생존율이 감소하였다 (Fig. 2). 반면 무막줄기세포추출물을 처리하였을 때, 2.5 µg/mL의 농도에서 64.43%로 세포 생존율이 증가하였으며 control군에 비해 통계적으로 유의미한 차이를 나타내었으므로 ONOO⁻로 인한 산화적 손상에 대한 무막줄기세포추출물의 보호 효과를 확인하였다.

3.3 염증 관련 단백질 발현 조절

산화적 스트레스와 염증반응은 서로 긴밀히 연결되어 있다. 예를 들어 세포 내에서 ROS는 염증매개인자, 전염증성 사이토카인, 케모카인 등의 발현을 조절하는 nuclear factor κB (NF-κB)를 활성화시키며, 이에 따라 백혈구 및 resident cell의 활성화가 촉진되어 염증반응을 유발한다[29,30]. 염증매개인자인 inducible nitric oxide synthase (iNOS)는 L-arginine으로부터 NO를 다량 생성하며, cyclooxygenase-2 (COX-2) 아라키돈산을

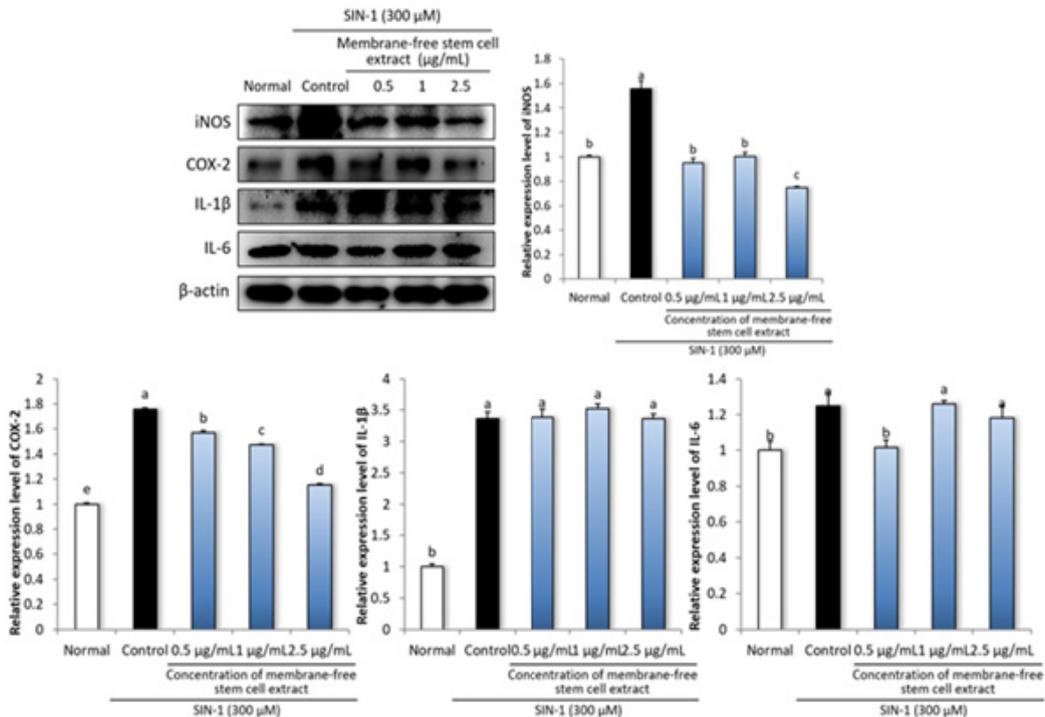


Fig. 3. Effect of membrane-free stem cell extract from adipose tissue on inflammation-related protein expressions in LLC-PK₁ cells. Cells were treated with 300 µM SIN-1 for 24 hr, and then incubated with 0.5, 1, 2.5 µg/mL membrane-free stem cell extract for 24 hr. Values are mean ± SD. The letters (a-e) represent significant differences ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

prostaglandin H₂로 전환하여 prostaglandin E₂, prostacyclin 등의 생성을 촉진한다[31,32]. Interleukin (IL)-1 β 와 IL-6는 전염증성 사이토카인으로 혈관 내막 세포의 기능 변화를 유도하여 혈관 내로 염증세포의 침투를 용이하게 한다[33]. LLC-PK₁ 세포에 300 μ M

SIN-1을 처리하여 ONOO⁻의 발생을 유도한 후 무막줄기세포추출물을 처리하여 염증 관련 단백질 발현을 측정 한 결과, normal군과 비교하여 control군에서 iNOS, COX-2, IL-1 β , IL-6의 단백질 발현이 유의적으로 증가한 것을 확인하였다 (Fig. 3). 반면 무막줄기세포추출물

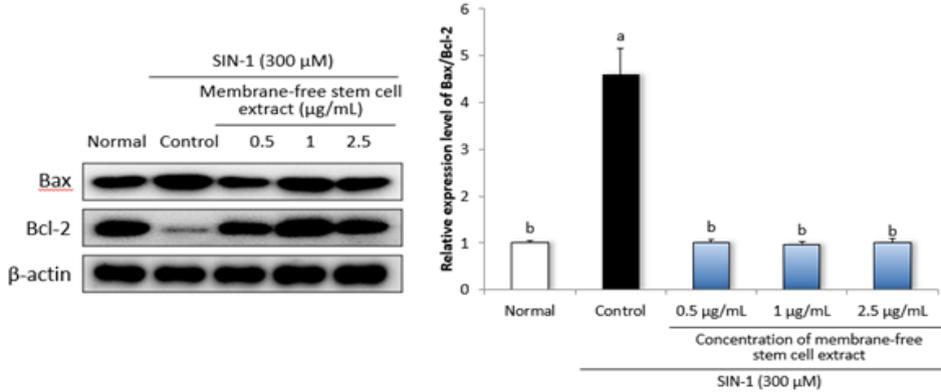


Fig. 4. Effect of membrane-free stem cell extract from adipose tissue on Bax/Bcl-2 protein expressions in LLC-PK₁ cells. Cells were treated with 300 μ M SIN-1 for 24 hr, and then incubated with 0.5, 1, 2.5 μ g/mL membrane-free stem cell extract for 24 hr. Values are mean \pm SD. The letters (a-b) represent significant differences ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

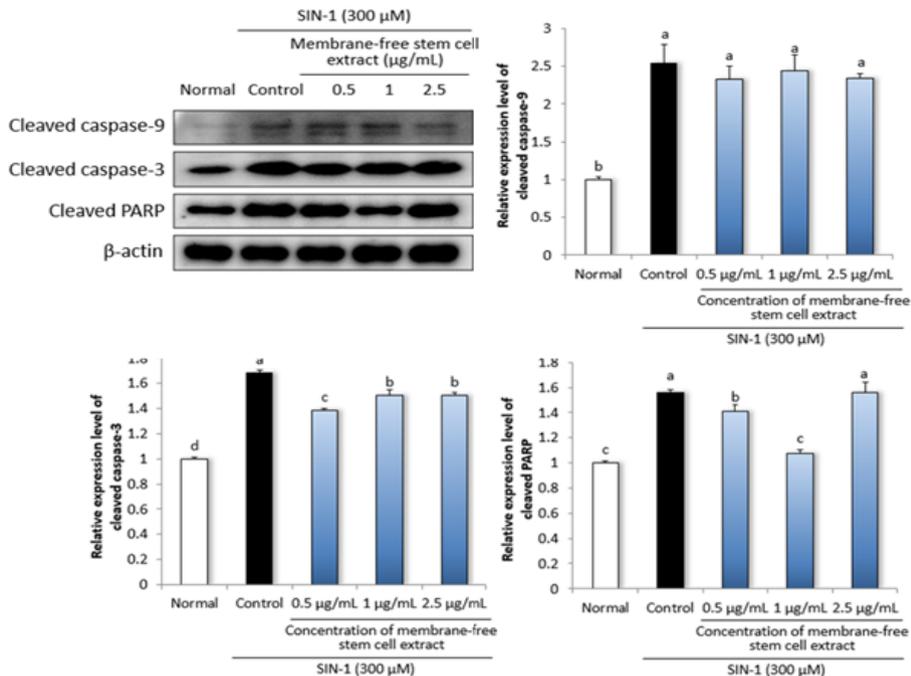


Fig. 5. Effect of membrane-free stem cell extract from adipose tissue on apoptosis-related protein expressions in LLC-PK₁ cells. Cells were treated with 300 μ M SIN-1 for 24 hr, and then incubated with 0.5, 1, 2.5 μ g/mL membrane-free stem cell extract for 24 hr. Values are mean \pm SD. The letters (a-c) represent significant differences ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

을 처리하였을 때, COX-2, iNOS의 단백질 발현이 효과적으로 감소하였으며, IL-1 β 과 IL-6의 단백질 발현에는 영향을 미치지 못하였다. 이러한 결과는 무막줄기세포추출물이 염증매개인자인 COX-2와 iNOS의 조절을 통해 염증반응을 감소시킬 수 있을 것으로 기대되지만, COX-2의 활성화를 유도하여 염증반응을 일으키거나 COX-2가 활성화됨으로써 생성되는 전염증성 사이토카인인 IL-1 β 과 IL-6에 대한 무막줄기세포추출물의 조절 메커니즘에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

3.4 세포사멸 관련 단백질 발현 조절

신장 세뇨관 상피 세포의 세포사멸은 저산소성 손상에 의해 현저히 나타나며, 이는 산화적 스트레스로 인한 endonuclease의 활성화로 인해 유도될 수 있다 [19,34,35]. 세포사멸에 관여하는 Bcl-2 family는 세포사멸 촉진인자인 Bax, Bak, Bid와 세포사멸 억제인자인 Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-b 등으로 구성되어 있다[36]. 이들 세포사멸 촉진인자와 억제인자 간의 균형이 깨어질 경우, 미토콘드리아 내부에서 세포질로 cytochrome C가 방출되어 세포사멸을 유도하는 caspase cascade를 활성화한다[37]. Normal군과 비교하여 300 μ M SIN-1을 처리한 control 군에서 Bax/Bcl-2의 단백질 발현이 증가한 것을 확인한 한편, 무막줄기세포추출물을 처리하였을 경우, Bax/Bcl-2의 단백질 발현이 유의적으로 감소하였다 (Fig. 4).

Caspase는 protease의 일종으로, 정상세포에서 pro-enzyme의 형태로 존재하며 세포사멸과 관련된 신호에 의해 활성화되면 표적 단백질을 분해한다[38]. 세포질로 방출된 cytochrome C에 의해 pro-caspase-9와 pro-caspase-3은 활성형인 cleaved caspase-9와 cleaved caspase-3로 절단되며, 이는 세포 내에서 poly ADP-ribose polymerase (PARP)를 절단하여 세포사멸을 유도한다[39]. LLC-PK₁ 세포에 300 μ M SIN-1으로 산화적 스트레스를 유도한 후 무막줄기세포추출물을 처리하여 세포사멸 관련 단백질 발현을 측정할 결과, normal군에 비해 control군에서 cleaved caspase-9, cleaved caspase-3, cleaved PARP의 단백질 발현이 유의적으로 증가한 것을 확인하였다 (Fig. 5). 무막줄기세포추출물을 처리하였을 때 cleaved caspase-9의 단백질 발현에서는 유의미한 효과를 확인하지 못하였으나 cleaved caspase-3의 단백질 발현을 유의적으로 감소시켰으며, control 군과 비교하여 0.5와 1 μ g/mL 농도

에서 cleaved PARP의 단백질 발현을 유의적으로 감소시켰다.

지방 유래 줄기세포는 사이토카인을 비롯한 paracrine factor를 분비하여 면역시스템 조절을 비롯한 다양한 기능을 수행한다[40]. 이전 연구에 따르면 지방 유래 줄기세포에서 분비된 paracrine factors는 주름 개선, 상처 치유, 모발 성장과 같은 약리학적 작용을 나타내었다 [40-42]. Lee et al.[43]은 인체지방 유래 줄기세포에서 분비된 exosome은 Huntington's disease의 *in vitro* 모델에서 mitochondrial dysfunction과 세포사멸을 감소시켰다고 보고하였다. 또한 지방 유래 줄기세포에서 분비되는 insulin-like growth factor (IGF)를 unilateral ureteral obstruction 마우스 모델에 경구투여했을 때, IGF가 ERK/MAPK pathway를 활성화시켜 신장 세뇨관 상피 세포를 보호하였다[44]. 이들 결과를 바탕으로 산화적 스트레스를 유도한 신장 세뇨관 상피세포에서 인체지방 유래 줄기세포로부터 유효성분을 추출한 무막줄기세포추출물의 보호 효과는 줄기세포에서 분비된 paracrine factor에 의한 것으로 사료된다.

4. 결론 및 요약

본 연구에서는 LLC-PK₁ 세포를 이용하여 무막줄기세포추출물의 산화적 스트레스 개선 효과를 살펴보았다. 무막줄기세포추출물은 LLC-PK₁ 세포에서 항산화 단백질인 HO-1, TrxR1 및 NQO1의 발현을 촉진시켰으며, SIN-1에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대하여 세포생존율을 58.84%에서 64.43%까지 증가시켰다. 이러한 무막줄기세포추출물의 보호 효과에 대한 메커니즘을 살펴본 결과, 염증매개인자인 COX-2, iNOS와 세포사멸 관련 단백질인 Bax, Bcl-2, cleaved caspase 3, cleaved PARP의 발현을 조절함으로써 나타나는 것으로 사료된다. 따라서 무막줄기세포추출물은 항산화, 염증 및 세포사멸 단백질을 조절함으로써 산화적 스트레스에 대한 보호 효과를 가지는 것으로 사료된다.

References

- [1] S. I. Liochev, "Reactive oxygen species and the free radical theory of aging", *Free Radical Biology and Medicine*, Vol.60, pp.1-4, 2013.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.011>

- [2] R. P. Patel, J. McAndrew, H. Sellak, C. R. White, H. Jo, B. A. Freeman, V. M. Darley-Usmar, "Biological aspects of reactive nitrogen species", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, Vol.1411, No.2-3, pp.385-400, 1999.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(99\)00028-6](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00028-6)
- [3] H. S. Kim, Y. H. Kang, "Antioxidant activity of ethanol extracts of non-edible parts (stalk, stem, leaf, seed) from oriental melon", *Korean Journal of Plant Resources*, Vol.23, No.5, pp.451-457, 2010.
- [4] B. Halliwell, "Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning)", *Free radical research*, Vol.31, No.4, pp.261-272, 1999.
DOI: <https://doi.org/10.1080/10715769900300841>
- [5] K. Hensley, K. A. Robinson, S. P. Gabbita, S. Salsman, R. A. Floyd, "Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury", *Free Radical Biology and Medicine*, Vol.28, No.10, pp.1456-1462, 2000.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00252-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00252-5)
- [6] D. M. Small, J. S. Coombes, N. Bennett, D. W. Johnson, G. C. Gobe, "Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease" *Nephrology*, Vol.17, No.4, pp.311-321, 2012.
DOI: <https://doi.org/10.1111/i.1440-1797.2012.01572.x>
- [7] E. Ozbek, "Induction of oxidative stress in kidney", *International journal of nephrology*, Vol.2012, No., pp.1-9, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/465897>
- [8] N. D. Vaziri, "Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension", *Current opinion in nephrology and hypertension*, Vol.13, No.1, pp.93-99, 2004.
- [9] J. S. Lee, J. L. Song, J. H. Kil, B. J. Jeong, J. S. Jeong, T. G. Huh, K. Y. Park, "Protective effects of *phellinus linteus* and curry-added cooked mixed grain rice extracts on oxidative stress-induced LLC-PK₁ cell damage", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.43, No.11, pp.1674-1680, 2014.
DOI: <https://doi.org/10.3746/jkfn.2014.43.11.1674>
- [10] S. H. Park, "Antioxidative effect of tamoxifen in proximal tubule cells", *Korean Journal of Laboratory Animal Science*, Vol.19, No., pp.110-116, 2013.
- [11] J. Gimble, F. Guilak, "Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential", *Cytotherapy*, Vol.5, No.5, pp.362-369, 2003.
DOI: <https://doi.org/10.1080/14653240310003026>
- [12] M. Raff, "Adult stem cell plasticity: fact or artifact?", *Annual review of cell and developmental biology*, Vol.19, No.11, pp.1-22, 2003.
DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.111301.143037>
- [13] J. M. Gimble, A. J. Katz, B. A. Bunnell, "Adipose-derived stem cells for regenerative medicine", *Circulation research*, Vol.100, No.9, pp.1249-1260, 2007.
DOI: <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000265074.83288.09>
- [14] T. Liu, M. Lee, J. J. Ban, W. Im, I. Mook-Jung, M. Kim, "Cytosolic extract of human adipose stem cells reverses the amyloid beta-induced mitochondrial apoptosis via P53/Foxo3a pathway", *PloS one*, Vol.12, No.1, pp.e0168859, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168859>
- [15] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", *Journal of immunological methods*, Vol.65, No.1-2, pp.55-63, 1983.
- [16] H. Hagar, N. Ueda, S. V. Shah, "Role of reactive oxygen metabolites in DNA damage and cell death in chemical hypoxic injury to LLC-PK₁ cells", *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, Vol.271, No.1, pp.F209-F215, 1996.
DOI: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1996.271.1.F209>
- [17] A. K. Salahudeen, "Role of lipid peroxidation in H₂O₂-induced renal epithelial (LLC-PK₁) cell injury", *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, Vol.268, No.1, pp.F30-F38, 1995.
DOI: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1995.268.1.F30>
- [18] S. P. Andreoli, J. A. McAteer, S. A. Seifert, S. A. Kempson, "Oxidant-induced alterations in glucose and phosphate transport in LLC-PK₁ cells: mechanisms of injury", *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, Vol.265, No.3, pp.F377-F384, 1993.
DOI: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1993.265.3.F377>
- [19] H. Hagar, N. Ueda, S. V. Shah, "Endonuclease induced DNA damage and cell death in chemical hypoxic injury to LLC-PK₁ cells", *Kidney international*, Vol.49, No.2, pp.355-361, 1996.
DOI: <https://doi.org/10.1038/ki.1996.52>
- [20] M. Tanito, M. P. Agbaga, R. E. Anderson, "Upregulation of thioredoxin system via Nrf2-antioxidant responsive element pathway in adaptive-retinal neuroprotection *in vivo* and *in vitro*", *Free Radical Biology and Medicine*, Vol.42, No.12, pp.1838-1850, 2007.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.018>
- [21] A. Loboda, M. Damulewicz, E. Pyza, A. Jozkowicz, J. Dulak, "Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism", *Cellular and molecular life sciences*, Vol.73, No.17, pp.3221-3247, 2016.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2223-0>
- [22] M. Cebula, E. E. Schmidt, E. S. Arnér, "TrxR1 as a potent regulator of the Nrf2-Keap1 response system", *Antioxidants and redox signaling*, Vol.23, No.10, pp.823-853, 2015.
DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6378>
- [23] D. Ross, J. K. Kepa, S. L. Winski, H. D. Beall, A. Anwar, D. Siegel, "NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms", *Chemico-biological interactions*, Vol.129, No.1-2, pp.77-97, 2000.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(00\)00199-X](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(00)00199-X)

- [24] Y. Koriyama, Y. Nakayama, S. Matsugo, S. Kato, "Protective effect of lipoic acid against oxidative stress is mediated by Keap1/Nrf2-dependent heme oxygenase-1 induction in the RGC-5 celline", *Brain research*, Vol.1499, pp.145-157, 2013.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.12.041>
- [25] A. Sakurai, M. Nishimoto, S. Himeno, N. Imura, M. Tsujimoto, M. Kunimoto, S. Hara, "Transcriptional regulation of thioredoxin reductase 1 expression by cadmium in vascular endothelial cells: role of NF-E2-related factor-2", *Journal of cellular physiology*, Vol.203, No.3, pp.529-537, 2005.
DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.20246>
- [26] D. Mustacich, G. Powis, "Thioredoxin reductase", *Biochemical Journal*, Vol.346, No.1, pp.1-8, 2000.
DOI: <https://doi.org/10.1042/bj3460001>
- [27] J. I. Abe, B. C. Berk, "Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease", *Trends in Cardiovascular Medicine*, Vol.8, No.2, pp.59-64, 1998.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S1050-1738\(97\)00133-3](https://doi.org/10.1016/S1050-1738(97)00133-3)
- [28] G. H. Choi, H. C. Shin, "The effects of Lycium Chinense Milie on the H₂O₂-treated LLC-PK₁ cell's redox status and NF- κ B Signaling", *The Journal of Internal Korean Medicine*, Vol.30, No.1, pp.36-50, 2009.
- [29] P. Tripathi, A. Aggarwal, "NF- κ B transcription factor: a key player in the generation of immune response", *Current Science*, Vol.90, No.4, pp.519-531, 2006.
- [30] S. Ruiz, P. E. Pergola, R. A. Zager, N. D. Vaziri, "Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease", *Kidney international*, Vol.83, No.6, pp.1029-1041, 2013.
DOI: <https://doi.org/10.1038/ki.2012.439>
- [31] R. Rajakariar, M. M. Yaqoob, D. W. Gilroy, "COX-2 in inflammation and resolution", *Molecular interventions*, Vol.6, No.4, pp.199-207, 2006.
DOI: <https://doi.org/10.1124/mi.6.4.6>
- [32] J. R. Vane, J. A. Mitchell, I. Appleton, A. Tomlinson, D. Bishop-Bailey, J. Croxtall, D. A. Willoughby, "Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol.91, No.6, pp.2046-2050, 1994.
DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.91.6.2046>
- [33] J. H. Yoon, S. G. Park, M. J. Lee, J. Y. Park, K. S. Seo, K. C. Woo, C. E. Lee, "Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Bletilla striata Reichenbach fil.* fractions as cosmetic", *Journal of Life Science*, Vol.23, No.9, pp.1073-1078, 2013.
DOI: <https://doi.org/10.5352/JLS.2013.23.9.1073>
- [34] M. S. Park, B. S. Kim, P. Devarajan, "Hypoxia/re-oxygenation injury induces apoptosis of LLC-PK₁ cells by activation of caspase-2", *Pediatric Nephrology*, Vol.22, No.2, pp.202-208, 2007.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00467-006-0256-6>
- [35] A. Havasi, S. C. Borkan, "Apoptosis and acute kidney injury", *Kidney international*, Vol.80, No.1, pp.29-40, 2011.
DOI: <https://doi.org/10.1038/ki.2011.120>
- [36] A. Gross, J. M. McDonnell, S. J. Korsmeyer, "BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis", *Genes and development*, Vol.13, No.15, pp.1899-1911, 1999.
- [37] J. Yang, X. Liu, K. Bhalla, C. N. Kim, A. M. Ibrado, J. Cai, T. I. Peng, D. P. Jones, X. Wang, "Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked", *Science*, Vol.275, No.5303, pp.1129-1132, 1997.
DOI: <https://doi.org/10.1126/science.275.5303.1129>
- [38] T. J. Fan, L. H. Han, R. S. Cong, J. Liang, "Caspase family proteases and apoptosis", *Acta biochimica et biophysica Sinica*, Vol.37, No.11, pp.719-727, 2005.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2005.00108.x>
- [39] A. H. Boulares, A. G. Yakovlev, V. Ivanova, B. A. Stoica, G. Wang, S. Iyer, M. Smulson, "Role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells", *Journal of Biological Chemistry*, Vol.274, No.33, pp.22932-22940, 1999.
DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.33.22932>
- [40] Y. K. Na, J. J. Ban, M. Lee, W. Im, M. Kim, "Wound healing potential of adipose tissue stem cell extract", *Biochemical and biophysical research communications*, Vol.485, No.1, pp.30-34, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.103>
- [41] W. S. Kim, B. S. Park, S. H. Park, H. K. Kim, J. H. Sung, "Antiwrinkle effect of adipose-derived stem cell: activation of dermal fibroblast by secretory factors", *Journal of dermatological science*, Vol.53, No.2, pp.96-102, 2009.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2008.08.007>
- [42] C. H. Won, G. H. Park, X. Wu, T. N. Tran, K. Y. Park, B. S. Park, D. Y. Kim, O. Kwon, K. H. Kim, "The Basic mechanism of hair growth stimulation by adipose-derived stem cells and their secretory factors", *Current stem cell research and therapy*, Vol.12, No.7, pp.535-543, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.2174/1574888X12666170829161058>
- [43] M. Lee, L. Tian, W. Im, M. Kim, "Exosomes from adipose-derived stem cells ameliorate Huntington's disease phenotypes in an *in vitro* model", *European Journal of Neuroscience*, Vol.44, No.4, pp.2114-2119, 2016.
DOI: <https://doi.org/10.1111/ejn.13275>
- [44] Z. Wu, Y. Yu, L. Niu, A. Fei, S. Pan, "IGF-1 protects tubular epithelial cells during injury via activation of ERK/MAPK signaling pathway", *Scientific reports*, Vol.6, pp.28066, 2016.
DOI: <https://doi.org/10.1038/srep28066>

김민정(Min Jeong Kim)

[정회원]



- 2017년 2월 : 부산대학교 식품영양학과 (학사)
- 2019년 2월 : 부산대학교 식품영양학과 (석사)
- 2019년 3월 ~ 현재 : 부산대학교 식품영양학과 (박사과정)

<관심분야>
식품영양, 기능성식품

김영실(Young Sil Kim)

[정회원]



- 1985년 2월 : 부산대학교 의과대학 (학사)
- 2002년 2월 : 부산대학교 의과대학 (석사)
- 2006년 2월 : 부산대학교 의과대학 (박사)

- 2000년 2월 ~ 현재 : 티아라의원성형외과 대표원장
- 2011년 9월 ~ 현재 : ㈜티아라줄기세포연구소 대표이사
- 2014년 : (사)한국줄기세포산업협회 회장
- 2016년 4월 ~ 현재 : ㈜티스팀 대표이사

<관심분야>
생명공학, 줄기세포, 의생명

김지현(Ji Hyun Kim)

[정회원]



- 2014년 2월 : 동의대학교 식품영양학과 (학사)
- 2016년 2월 : 부산대학교 식품영양학과 (석사)
- 2016년 3월 ~ 현재 : 부산대학교 식품영양학과 (박사과정)

<관심분야>
식품영양, 기능성식품

조은주(Eun Ju Cho)

[정회원]



- 1996년 2월 : 부산대학교 식품영양학과 (석사)
- 1999년 2월 : 부산대학교 식품영양학과 (박사)
- 2002년 3월 : 일본 토야마의과약과대학교 조교수
- 2003년 10월 ~ 현재 : 부산대학교 식품영양학과 (교수)

<관심분야>
식품영양, 기능성식품

박혜숙(Hye Sook Park)

[정회원]



- 1986년 2월 : 부산대학교 식품영양학과 (학사)
- 1989년 2월 : 부산대학교 일반대학원 (이학석사)
- 2001년 3월 : 부산대학교 일반대학원 (이학박사 수료)

- 2018년 3월 ~ 현재 : ㈜티아라줄기세포연구소 대표이사
- 2016년 4월 ~ 현재 : ㈜티스팀 전무/ R&D 대표

<관심분야>
생명공학, 줄기세포, 의생명