

Adipose Differentiation-Related Protein (ADRP)이 골격근의 포도당 수송에 미치는 영향

서울대학교 의과대학 내과학교실¹, 경북대학교 의과대학 내과학교실²

구윤희^{1*} · 김민^{1*} · 김세나¹ · 박호선¹ · 김한종² · 이인규² · 신동훈¹ · 정성수¹ · 박상규¹ · 조영민¹ · 이홍규¹ · 박경수¹

Effect of Adipose Differentiation-Related Protein (ADRP) on Glucose Uptake of Skeletal Muscle

Yun Hyi Ku^{1*}, Min Kim^{1*}, Sena Kim¹, Ho Seon Park¹, Han-Jong Kim², In-Kyu Lee², Dong Hoon Shin¹,
Sung Soo Chung¹, Sang Gyu Park¹, Young Min Cho¹, Hong Kyu Lee¹, Kyong Soo Park¹

¹Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul,

²Department of Internal Medicine, Kyungpook National University School of Medicine, Daegu, Korea

Abstract

Background: Skeletal muscle is the most important tissue contributing to insulin resistance. Several studies have shown that accumulation of intramyocellular lipid is associated with the development of insulin resistance. Thus, proteins involved in lipid transport, storage and metabolism might also be involved in insulin action in skeletal muscle. Adipose differentiation-related protein (ADRP), which is localized at the surface of lipid droplets, is known to be regulated by peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ). However, it is not known whether ADRP plays a role in regulating glucose uptake and insulin action in skeletal muscle.

Methods: ADRP expression in skeletal muscle was measured by RT-PCR and western blot in *db/db* mice with and without PPAR γ agonist. The effect of PPAR γ agonist or high lipid concentration (0.4% intralipos) on ADRP expression was also obtained in cultured human skeletal muscle cells. Glucose uptake was measured when ADRP was down-regulated with siRNA or when ADRP was overexpressed with adenovirus.

Results: ADRP expression increased in the skeletal muscle of *db/db* mice in comparison with normal controls and tended to increase with the treatment of PPAR γ agonist. In cultured human skeletal muscle cells, the treatment of PPAR γ agonist or high lipid concentration increased ADRP expression. siADRP treatment decreased both basal and insulin-stimulated glucose uptake whereas ADRP overexpression increased glucose uptake in cultured human skeletal muscle cells.

Conclusion: ADRP expression in skeletal muscle is increased by PPAR γ agonist or exposure to high lipid concentration. In these conditions, increased ADRP contributed to increase glucose uptake. These results suggest that insulin-sensitizing effects of PPAR γ are at least partially achieved by the increase of ADRP expression, and ADRP has a protective effect against intramyocellular lipid-induced insulin resistance. (Korean Diabetes J 33:206-214, 2009)

Key words: Adipose differentiation related protein (ADRP), Insulin resistance, Peroxisome proliferator activated receptor γ , Skeletal muscle

접수일자: 2009년 3월 4일, 통과일자: 2009년 6월 1일

교신저자: 박경수, 서울대학교 의과대학 내과학교실, E-mail: kspark@sun.ac.kr

* 구윤희와 김민은 본 논문의 작성에 1저자로 공동 기여하였음.

* 본 논문은 서울대학교병원 일반연구비(04-2003-017-0)의 지원으로 이루어졌음.

서 론

제2형 당뇨병은 췌장의 베타 세포의 기능 저하 및 골격근을 포함한 말초 조직에서의 인슐린저항성을 특징으로 하며¹⁾, 골격근은 인슐린 자극에 의한 포도당 수송의 대부분을 차지하여 양적으로 보았을 때 인슐린저항성의 가장 중요한 조직이다²⁾. 최근의 연구결과들은 근세포 내 지질이 골격근의 인슐린저항성 발생과의 밀접한 관련이 있음을 보여주고 있는데³⁻⁵⁾, 이에 따라 골격근의 지질 수송, 저장 및 대사에 관여하는 단백질들이 인슐린 작용에 미치는 영향에 대해서도 관심이 증가되고 있다.

Adipose differentiation-related protein (ADRP)는 PAT (perilipin/ adipose differentiation-related protein, ADRP/ tail interacting protein 47, TIP47) family에 속하는 단백질로⁶⁾, 처음에는 주로 지방 세포의 초기 분화 과정에서 발현되는 단백질로 알려졌으나 현재에는 골격근을 포함하여 다양한 조직에서 보편적으로 발견되는 것으로 밝혀졌다⁷⁾. ADRP의 정확한 기능은 아직 정립되어 있지 않으나, lipid droplet의 표면에 존재하면서, 지질 분해 효소의 활성도에 관여하여 지질 분해 속도를 조절하고, 결과적으로 lipid droplet의 구조를 안정화시키는 작용을 하는 것으로 생각되고 있다⁸⁻¹¹⁾. 최근의 연구결과들을 보면 간에서 ADRP의 발현이 peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ)에 의해 조절되며 인슐린저항성과 관련이 있을 것으로 주목받고 있으나¹²⁾ 골격근에서 ADRP가 포도당 대사에 대해 어떤 역할을 하는지는 잘 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 골격근에서 ADRP의 발현조절이 포도당 대사에 어떤 역할을 하는지를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 시약 및 처리

Troglitazone, rosiglitazone, pioglitazone (Cayman, Ann Arbor, MI), wy14,643 (Calbiochem, La Jolla, CA)은 각각 10 M의 농도로 48시간 동안 분화된 근육세포에 처리하였다. Intralipos (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany)는 400 mg/dL의 농도로 48시간 처리하였다.

2. 실험동물

실험동물은 7주령의 수컷 C57BL/6J와 C57BLKS/J *db-db* 마우스들을 사용하였고(SLC, Japan), 실험 기간 동안 사료와 물은 자유로이 섭취하게 하였다. *db/db* 마우스는

rosiglitazone (Avandia[®], GlaxoSmithKline, Brentford, Middlesex, UK)을 30 mg/kg 농도로 물에 녹여 투여하였고 대조군들은 위약(물)을 투여하였다. 동물 사육실은 온도 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 5\%$, 12 hr dark-light cycle로 조절하고, 체중, 혈당 및 식이 섭취량은 약물 투여 직전과 투여 후 3, 7, 14, 21, 28일에 측정하였다. 공복혈당 및 혈중 중성 지방(Triacylglycerol, TG)은 2주 투여 후 6시간 금식 후 측정하였다. 4주간의 약물 투여가 끝난 후 6시간 동안 금식시키고 염산 케타민을 이용하여 마취 시킨 후 심장에 cold PBS (pH 7.4)를 관류 시켜 대퇴근육조직(quadriceps muscle) 취했다. 조직들은 액체 질소에 즉시 동결 시켜 -70°C 초저온 냉동고에 보관하였다.

3. 사람 골격근 세포 배양

대퇴근 골격근 100~200 mg을 Ham's F-10 배지에서 혈액을 최대한 제거한 후 잘게 자르고 spinner flask에서 0.05% trypsin/EDTA로 처리하여, 근육아세포를 분리하였다. 분리된 근육아세포는 SkGM (Lonza, Walkersville, MD)에 2% FBS를 첨가한 배지에서 배양하였으며, 분화는 80% 정도 세포가 찻을 때, 2% FBS와 penicillin-streptomycin이 함유된 α -MEM 배지로 갈아주고 5일 정도 배양하였다.

4. 재조합 아데노바이러스 제작 및 처리

pAdTrackCMV 서플 벡터에 HA가 N-terminal에 붙은 ADRP를 cloning 해서 넣은 다음, AdEasy 벡터에 homologous recombination 방법으로 삽입하였다. 이후 제한효소 PacI으로 자른 다음 HEK293 세포에 transfection 시킨 후, cytopathic effect (CPE)가 나타나면 지속적으로 증식시켜서 CsCl-ultracentrifugation 방법으로 농축된 바이러스를 분리하여 분화된 근육세포에 15 moi (multiplicity of infection)로 36시간 동안 처리하였다.

5. 포도당 수송능 측정

12 well plate에 배양된 세포를 무혈청 배지로 2회 세척한 다음 200 ng/mL의 인슐린을 1시간 동안 배양한 후 10 μL 의 기질(2 mM L-glucose, 2 mM [^3H]-deoxyglucose of 20 uCi)을 0.1%의 BSA가 첨가된 hepes buffer (130 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.25 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgSO_4 , 2.5 mM NaH_2PO_4 , and 10 mM HEPES)에 첨가한 후 15분간 반응시킨 후 PBS로 5번 씻어주었다. 다음으로 0.5 mL의 0.5 N의 NaOH를 넣고 30분간 흔들어 준 후, 0.4 mL을 scintillation tube로 옮겨서 1 N HCl 200 μL 과 2 mL의 ULTIMA GOLDTM scintillation fluid (Perkin-elmer, Boston,

MA)를 첨가한 후 β -counter로 측정하였다.

6. siRNA

ADRP siRNA SMRT pool (Dharmacon, Lafayette, CO)를 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 troglitazone 및 intralipos 처리 12시간 전에 75 nM의 농도로 세포 내로 전달하였고, northern blot 및 western blot을 통해 발현억제 효과를 확인하였다.

7. Northern Blot Analysis 및 RT-PCR

Total RNA는 RNeasy kit (Qigen, Hilden, Germany)를 사용하여 추출하여, 10 μ g의 RNA를 MOPS-formaldehyde-agarose gel에 loading하여 분리한 다음, nylon membrane (Whatman, Dassel, Germany)으로 이동시켰다. UV로 crosslink를 시킨 다음, QuickHyb[®] solution (Stratagene, La Jolla, CA)으로 68°C에서 회전시키며, blocking을 하였다. DECAPrime II probe labeling kit (Ambion, Austin, TX)를 이용하여 ADRP 및 GAPDH를 [³²P]-dATP (perkin-elmer)로 표지하여, 95°C에서 5분간 가열하고, hybridization 용액에 담긴 membrane에 첨가하여 68°C에서 12시간 정도 반응시켰다. Washing 용액 (2X SSC, 0.1% SDS)으로 3번 씻어 준 다음, autoradiography를 시행하였다.

Reverse Transcriptase-PCR은 total RNA를 분리하여 시행하였다. 1 μ g의 RNA를 M-MLV (Invitrogen)에 buffer, oligo (dT), 0.1 MDTT, dNTP mix, RNase inhibitor와 혼합하여 37°C에서 1시간, 72°C에서 10분 동안 반응시킨 후 ADRP 및 GAPDH specific primer로 PCR 반응을 진행하였다. Primer 서열은 ADRP forward 5'-CCAATACCTATGCCTGCAAGG-3', reverse 5'-TTGACCAGGACAGTCTGGCAT-3', GAPDH forward 5'-ATCACCATCTTCCAGGAGCGA-3', reverse 5'-CATACTTGGCAGGTTTCTCCAGG-3'이었다. 95°C에서 5분간 초기 열변성을 시킨 후, 95°C 30초, 58°C 30초, 72°C 조건으로 25번 반복(ADRP) 혹은 17번 반복(GAPDH)을 시행하고 72°C에서 5분간 최종 신장 과정을 진행하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.2% agarose gel에서 ethidium bromide로 검출하였다.

8. Western Blot Analysis

실험에 사용한 마우스의 근육조직 50 mg을 취해 lysis buffer (Tris pH7.4 20 mM, EDTA: 5 mM, Na₂P₂O₇ 10 mM, NaF 100 mM, Na₃VO₄ 2 mM, NP-40 1%, PMSF 1 mM, Aprotinin 5 mg/mL, leupeptin 5 mg/mL)에 넣어준 후 균질화 시킨 다음, 원심분리하고 상층액을 취하였다.

BCA 방법으로 단백질을 정량 한 후 10 μ g의 단백질을 8% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) gel에 loading하여 nitrocellulose membrane (Whatman, Dassel, Germany)에 이동시켜 5% skim milk (in TBS-T: 0.1% Tween-20 in Tris buffer saline, pH7.5)로 blocking한 다음 ADRP (Fitzgerald, Concord, MA) primary antibody를 TBS-T에 희석하여 3시간 동안 incubation시킨다. Membrane을 TBS-T로 다섯 번 세척한 후 각각의 1차 항체에 대항하는 이차항체를 1시간 동안 반응시키고 ECL (Pierce, Rockford IL)을 통해 감광하여 autoradiography로 밴드를 확인하였다. 감광된 특이 밴드는 TINA 2.10e를 이용하여 정량하였다. 각 단백질의 발현 수준은 GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)에 맞추어 표준화하였다.

9. 통계 분석

결과는 모든 측정 수치는 평균 \pm 표준오차로 표시하였다. 각 실험군 간의 비교는 SPSS 통계프로그램(SPSS 11.0 for windows version)을 사용하여 Mann-Whitney U 검정이나 Kruskal-Wallis 다중 비교용 비모수 검정을 사용하여 비교하였으며, Kruskal-Wallis 검정상 통계학적으로 차이가 있는 경우 Mann-Whitney U 검정으로 확인하였다. P값이 0.05 미만인 경우를 유의한 것으로 분석하였다.

결 과

1. Rosiglitazone 투여 후 혈당, 체중, 혈중 중성지방 및 식이 섭취량의 변화

db/db 마우스에 rosiglitazone을 투여하였을 때, 투여 3일째부터 혈당 저하 효과를 보였고, 7일 이후로는 정상 대조군과 유사한 정도의 혈당 수치를 보였다. 또한 7일째부터 체중이 증가하여 정상 대조군뿐만 아니라, rosiglitazone을 처리하지 않은 *db/db* 마우스에 비해서도 통계적으로 유의하게 높은 수준을 보였다. Rosiglitazone을 처리한 *db/db* 마우스는 4주 내내 정상 대조군에 비해 음식 섭취량이 많았으며, 28일째에는 처리하지 않은 *db/db* 마우스에 비해서는 유의하게 적은 양상을 보였다. 또한 물 섭취량은 3일째부터 감소하기 시작하여 14일째부터는 대조군과 비슷한 수준을 나타냈다. 공복혈당 및 혈중 중성지방은 대조군에 비해 *db/db* 마우스에서 유의하게 증가하였으며, 이에 비해서 rosiglitazone을 처리한 마우스에서 유의하게 감소하였다 (Fig. 1).

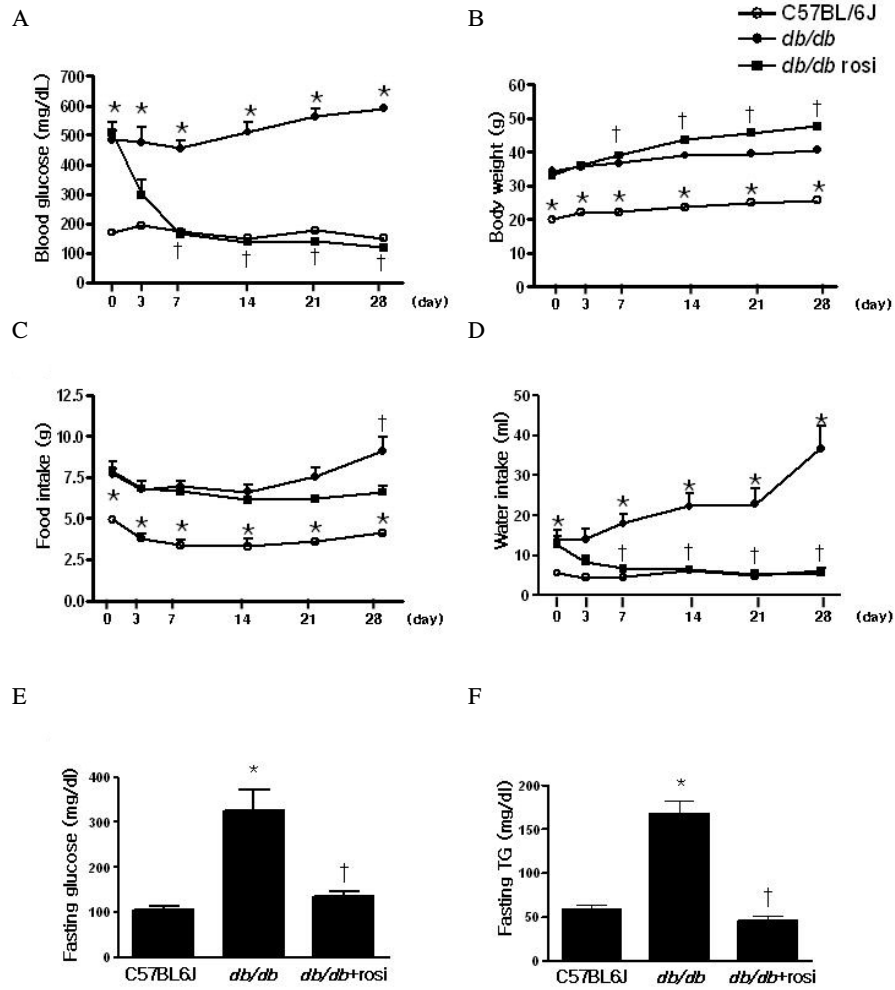


Fig. 1. Effect of rosiglitazone treatment on blood glucose, body weight and triglyceride (TG) in *db/db* mice. A. Blood glucose level. B. Body weight. C. Food intake. D. Water intake. E. Fasting plasma glucose. F. Fasting TG level at 14 days after rosiglitazone treatment. *db/db* + rosi: *db/db* + rosiglitazone treatment, * $P < 0.01$ vs. C57BL6J, † $P < 0.01$ vs. *db/db* mice.

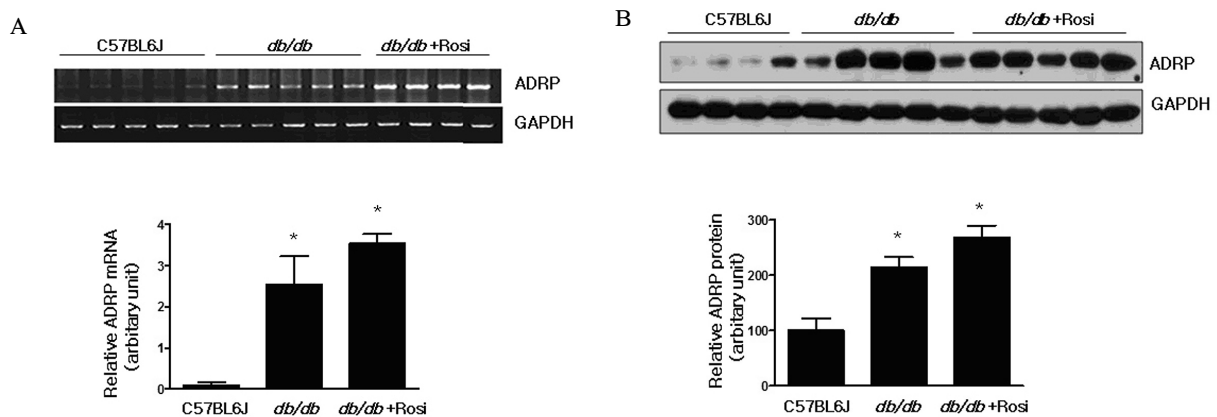


Fig. 2. Effect of rosiglitazone on skeletal muscle ADRP expression in *db/db* mice. A. RT-PCR. B. Western blotting. *db/db* + rosi: *db/db* + rosiglitazone treatment. * $P < 0.01$ vs. C57BL6J.

2. 근육에서 ADRP 발현 수준

근육의 ADRP mRNA 수준은 C57BL/6J 마우스에 비해 *db/db* 마우스에서 유의하게 증가되었지만 *db/db* 마우스에 rosiglitazone을 처리하였을 때에는 증가되는 경향은 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig. 2A). ADRP 단백질

수준 역시 C57BL/6J 마우스에 비해 *db/db* 마우스에서 유의하게 증가되었으나, rosiglitazone을 처리하였을 때에 더 증가하는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 확인할 수 없었다(Fig. 2B).

배양된 사람 근육세포에서도 PPAR γ agonist에 의해서 ADRP mRNA의 발현이 유의하게 증가하였다(Fig. 3).

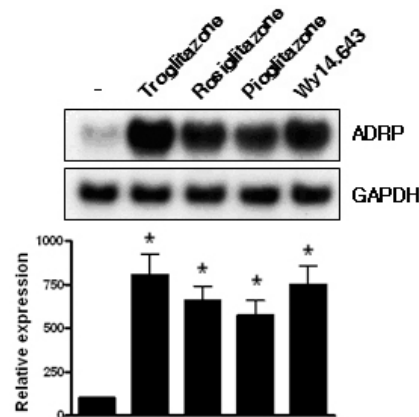


Fig. 3. Effect of PPAR γ agonists on ADRP expression in cultured human skeletal muscle cells. Human skeletal muscle cells were differentiated and treated with 10 μ M of troglitazone, rosiglitazone, pioglitazone, or wy14,643 for 48 h. * $P < 0.01$ vs. vehicle only.

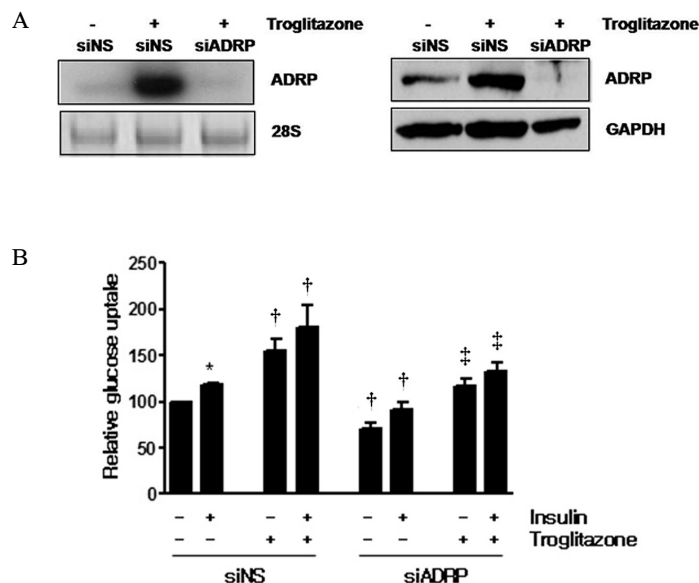


Fig. 4. Effect of ADRP knockdown on glucose uptake. Human skeletal muscle cells (HSkMC) were transfected with siRNAs of negative control (siNS) or ADRP (siADRP) for 12 h and treated with troglitazone for an additional 48 h. Prior to perform glucose uptake assay, cells were incubated with or without insulin (100 nM) for 30 min. (A) siADRP decreased both mRNA and protein expression of ADRP in HSkMC (B) glucose uptake in HSkMC. * $P < 0.05$: vs. basal value of control cells not treated with troglitazone; † $P < 0.05$: vs. corresponding value of control cells not treated with troglitazone, ‡ $P < 0.05$ vs. corresponding value of cells treated with troglitazone and siNS.

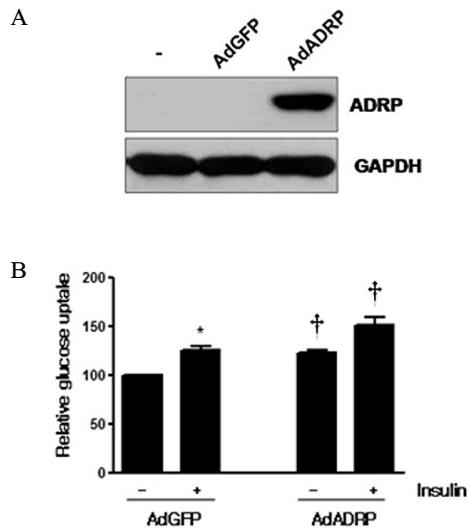


Fig. 5. Effect of ADRP overexpression on glucose uptake. A. Human skeletal muscle cells were transfected with adenovirus which expresses ADRP for 36 h. The increase in ADRP protein was determined by western blot. B. Glucose uptake in HSkMC. * $P < 0.05$ vs. the basal value of GFP adenovirus treated cells. † $P < 0.05$ vs. the corresponding value of GFP adenovirus transfected cells.

3. ADRP가 골격근의 포도당 수송(Glucose Uptake)에 미치는 영향

배양된 사람 근육세포에서 인슐린 자극에 의해 포도당 수송이 유의하게 증가되었고 troglitazone처리에 의해 더욱 증가되었다(Fig. 4).

siADRP를 처리하여 ADRP mRNA 및 단백질 양을 감소시키면 기저 및 인슐린 자극에 의한 포도당 수송이 유의하게 감소하였는데 troglitazone에 의해 증가되었던 포도당 수송 또한 유의하게 감소하였다(Fig. 4).

반대로 아데노바이러스를 이용하여, ADRP를 과발현시켰을 때, 근육세포에서 포도당 수송이 통계적으로 유의하게 증가되었다(Fig. 5).

4. 고지방상태에서 ADRP의 발현 및 포도당 수송에 미치는 역할

Intralipos를 근육세포에 처리 하였을 때, ADRP의 발현이 유의하게 증가하였고(Fig. 6A), Intralipos에 의한 ADRP 증가를 siRNA로 억제 하였다(Fig. 6B). 그 결과 고지방상태에서 ADRP를 발현을 억제 하였을 때 포도당 수송이 유의하게 억제되었다(Fig. 6C).

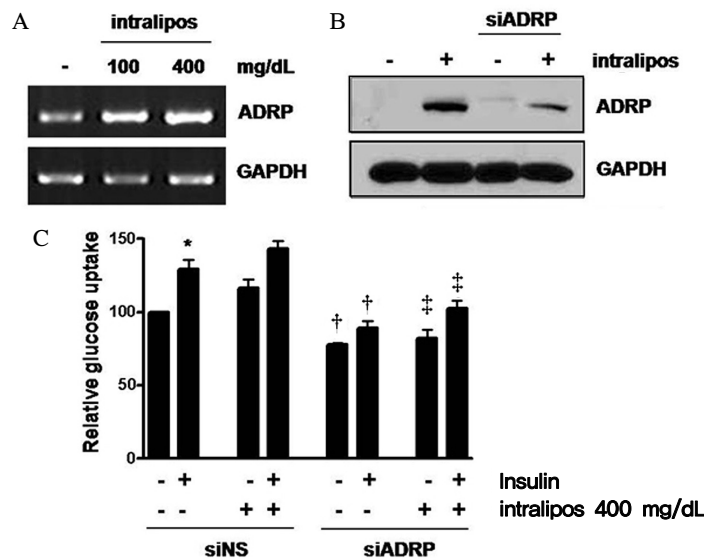


Fig. 6. Role of ADRP on glucose uptake in cultured human skeletal muscle cells exposed to high lipid concentration. A. High lipid (intralipos 400 mg/dL) induces ADRP mRNA expression in HSkMC. B. Human skeletal muscle cells were transfected with siNS or siADRP for 12 h and treated with high lipid for 48 h. siADRP inhibited high lipid-induced ADRP protein expression. C. Glucose uptake in siADRP transfected HSkMC with or without high lipid. * $P < 0.05$: vs. basal value of siNS treated cells. † $P < 0.05$: vs. corresponding value of siNS transfected cells not treated with high lipid, ‡ $P < 0.05$: vs. corresponding value of cells treated with siNS and high lipid.

고 찰

Lipid droplet 은 세포 내에서 중성지방의 저장고 역할을 한다. ADRP는 lipid droplet의 표면에 존재하는 단백질로서, lipid droplet의 양이 많은 곳에서 발현이 증가되어 있으면서, lipid droplet의 구조를 안정화시키고, 중성지방의 세포 내 이동에 관여한다^{9,11,13}.

설치류 및 사람의 지방간에서 정상간에 비해 ADRP 발현이 증가되어 있음이 알려져 있다^{14,15}. 또, 최근 연구에서는 간세포에서 PPAR γ 의 발현이 증가되어 있는 것이 지방간의 정도와 연관이 있는 것으로 확인되었다¹². Motomura 등은 간세포에서 PPAR γ agonist인 troglitazone에 의해 ADRP mRNA와 단백질의 양이 증가되고, 이는 troglitazone을 처리한 양과 시간에 비례한다고 하였다¹⁴. PPAR γ agonist뿐만 아니라, PPAR α agonist와 ADRP의 발현에 대한 연구들도 진행되었으며, 마우스 간세포에서 PPAR α agonist인 Wy14,643에 의해 ADRP의 mRNA 및 protein의 발현이 증가된다는 보고가 있었다^{16,17}. PPAR γ 에 의해 ADRP의 발현이 증가하는 기전은 설치류 및 사람의 ADRP 유전자에서 PPAR response element (PPRE)가 확인되어 이를 통해서 조절이 이루어지는 것으로 생각되고 있다. 설치류에서는 ADRP 유전자의 프로모터 부분에 PPAR α γ δ 의 3가지 아형 모두로부터 직접적인 조절을 받는 부분이 발견되었다¹⁸. 이 부분은 설치류의 ADRP 프로모터에 존재하는 PPRE로서, -2004에서 -1992 bp 부분에 위치한다(5'-AGGTGA A AGGGCA-3')¹⁸. 사람에서도 사람의 ADRP 유전자의 프로모터 부분에서 설치류와 유사하나 3' 부분의 염기가 차이가 있는 PPRE (5'-AGGTGA A AGGGCG-3')가 확인되었는데, 사람의 간 유래 세포주에서 ADRP PPRE는 특히 PPAR α 및 δ agonist에 의해 활성화되어 전사가 증가하는 것이 확인되었다¹³. ADRP의 발현이 고지방 상태에서 증가(Fig. 6A, B)됨을 보였는데, Gao J 등은¹⁹ 장쇄 지방산(long-chain fatty acids)에 의해 ADRP의 발현이 전사적 수준에서 증가됨을 보고하였다. 이는 ADRP 발현이 고지방 상태에서 증가되었던 결과와 일치하며, 이는 지방산을 TG로 변환되는 과정에서 lipid droplet을 형성하기 위해 증가되었을 것으로 생각된다.

골격근의 ADRP의 발현에 대해서는 잘 알려져 있지 않은데, Phillips 등²⁰은 비만한 제2형 당뇨병 및 비만한 비당뇨병인의 골격근에서 ADRP 발현량의 차이는 없었으며, rosiglitazone이나 메트포르민을 사용하여 혈당조절을 하면 ADRP 발현이 증가 한다고 보고하였다. *db/db* 마우스의 골

격근 ADRP의 발현은 *db/db* 마우스의 신장²¹ 혹은 지방간 상태^{14,15} 증가되어 있다고 알려져 있는데, 본 연구에서 *db/db* 마우스의 골격근에서 ADRP 발현이 증가되어 있는 것을 관찰하였다. ADRP 발현은 지방전구세포에서 지방세포로 성숙되는 동안 증가²²된다고 알려져 있다. 또한 in vitro 연구에서 고지방상태에서 ADRP 발현이 증가한 점, 그리고 *db/db* 마우스에서 혈중 중성 지방이 같이 증가한 점 등을 미루어 볼 때, 아마도 지방의 증가로 lipid droplet을 생성하는 과정이 ADRP 발현의 중요한 인자라고 생각되며, 골격근에서도 비슷한 이유로 ADRP 발현이 증가되었을 것으로 생각된다. 한편, ADRP 발현이 당뇨병이 발병된 *db/db* 마우스 골격근과 Phillips 등의 연구에서 당뇨병환자의 ADRP 발현에 관한 불일치성 보이는데, 이러한 차이는 비만한 당뇨병환자 및 비만한 비당뇨인에서 체질량지수의 차이가 없음에 기인한다고 생각되나, 당뇨병과 ADRP 발현과의 관계는 추가 연구가 필요하다고 생각된다.

ADRP가 인슐린작용에 미치는 영향에 대해서는 잘 알려져 있지 않지만, ADRP가 세포 내 지방산을 lipid droplet 안에 안정되게 저장하는데 기여하기 때문에 ADRP의 발현이 증가되면 지방산이 인슐린저항성을 야기하는 작용으로부터 보호하는 효과가 있을 것이라고 여겨지고 있다²⁰. 본 연구에서는 siADRP 및 ADRP 발현 억제제 바이러스를 이용하여 ADRP가 골격근의 포도당 수송에 미치는 효과를 평가하여 보았는데, ADRP를 과발현 시키면 약 20%의 포도당 수송능이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 PPAR γ agonist나 고지방식에 의해 ADRP 발현이 증가되어 있는 상황에서 siADRP를 이용하여 ADRP 발현을 감소시키면 포도당 수송능이 유의하게 감소하여 이 두 가지 조건에서의 포도당 수송능에 ADRP 발현이 관여하고 있음을 확인할 수 있었다. 특히 통계적으로 유의하지는 않았지만 고지방에 의한 기저상태의 포도당 수송능이 오히려 증가 하는 경향을 보였다(Fig. 6C). 지방산이 포도당 수송에 미치는 영향에 대해서는 논란이 있는데 지방산에 노출된 시간이나 농도 등에 따라 다른 결과를 보일 수 있다고 보고되고 있다^{23,24}. 지방산에 단기간 노출 시 인슐린자극에 의한 당원합성 및 포도당 산화가 오히려 증가되어 포도당 수송이 증가될 수 있다고 하는데²⁴, 본 연구에서 지방산 노출 시 ADRP가 보상적으로 증가하는 것도 이런 현상에 기여할 것으로 판단된다.

요약하면, ADRP는 고지방에 노출된 경우 혹은 PPAR γ agonist에 의해 골격근에서 발현이 증가되며, 증가된 ADRP는 골격근으로의 포도당 수송능을 증가시키는 효과를 보였다. 이는 골격근에서 PPAR γ 활성화가 직접적으로 인슐린감

수송을 개선시키는 한 가지 기전으로 생각되며, 또한 세포 내 지방 축적 시 인슐린저항성을 유도하는데, 이때 ADRP가 세포 내 지방으로부터 보호하는 역할을 하는 것으로 생각된다.

요 약

연구배경: 골격근은 양적으로 인슐린저항성의 가장 중요한 조직이다. 최근의 연구결과들은 골격근 내의 지질 축적에 따라 인슐린저항성이 증가하는 것을 보여주고 있다. 이에 따라 골격근의 지질수송, 저장 및 대사에 관여하는 단백질들이 인슐린작용에 미치는 영향에 대한 관심도 증가되고 있다. Adipose differentiation-related protein (ADRP)는 lipid droplet의 표면에 존재하는 단백질의 하나로 peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ)에 의해 조절되며 인슐린저항성과 관련이 있을 것으로 주목 받고 있으나 골격근에서 ADRP가 포도당 대사에 대해 어떤 역할을 하는지는 잘 알려져 있지 않다.

방법: db/db 마우스의 골격근에서 ADRP의 발현을 조사하고 PPAR γ agonist투여 후의 ADRP의 발현의 변화를 비교하였다. 또한, 사람의 골격근 세포를 배양하여 PPAR γ agonist 혹은 고지방배지를 처리하였을 때 ADRP의 발현을 조사하고, siRNA를 이용하여 ADRP를 knockdown 혹은 아데노바이러스를 이용하여 과발현 시킨 후 포도당 수송의 변화를 측정하였다.

결과: db/db 마우스는 정상 대조군에 비해 골격근에서 ADRP의 발현이 증가되어 있었으며, PPAR γ agonist를 처리하면 더욱 증가하는 경향을 보였다. 또한 사람의 근육세포에서도 PPAR γ agonist 혹은 고지방배지 처리에 의해 ADRP의 발현이 증가함을 확인하였다. ADRP를 knockdown시키면 기저 및 인슐린 자극에 의한 포도당 수송이 유의하게 감소하였으며, 과발현 시키면 유의하게 증가하였다.

결론: ADRP는 고지방에 노출된 경우 혹은 PPAR γ agonist에 의해 골격근에서 발현이 증가되며, 증가된 ADRP는 골격근으로의 포도당 수송능을 증가시키는 효과를 보였다. 이는 골격근에서 PPAR γ 활성화가 직접적으로 인슐린감수성을 개선시키는 한 가지 기전으로 생각되며, 또한 세포 내 지방 축적 시 인슐린저항성을 유도하는데, 이때 ADRP가 세포 내 지방으로부터 보호하는 역할을 하는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. DeFronzo RA: *Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Med Clin North Am* 88:787-835, 2004
2. Bouzakri K, Koistinen HA, Zierath JR: *Molecular Mechanisms of Skeletal Muscle Insulin Resistance in Type 2 Diabetes. Curr Diabetes Rev* 1:167-74, 20
3. Krssak M, Falk Petersen K, Dresner A, DiPietro L, Vogel SM, Rothman DL, Roden M, Shulman GI: *Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ¹H NMR spectroscopy study. Diabetologia* 42:113-6, 1999
4. Phillips DI, Caddy S, Ilic V, Fielding BA, Frayn KN, Borthwick AC, Taylor R: *Intramuscular triglyceride and muscle insulin sensitivity: evidence for a relationship in nondiabetic subjects. Metabolism* 45:947-50, 1996
5. Pan DA, Lillioja S, Kriketos AD, Milner MR, Baur LA, Bogardus C, Jenkins AB, Storlien LH: *Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. Diabetes* 46:983-8, 1997
6. Lu X, Gruia-Gray J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Londos C, Kimmel AR: *The murine perilipin gene: the lipid droplet-associated perilipins derive from tissue-specific, mRNA splice variants and define a gene family of ancient origin. Mamm Genome* 12:741-9, 2001
7. Brasaemle DL, Barber T, Wolins NE, Serrero G, Blanchette-Mackie EJ, Londos C: *Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. J Lipid Res* 38:2249-63, 1997
8. Shaw CS, Sherlock M, Stewart PM, Wagenmakers AJ: *Adipophilin distribution and colocalisation with lipid droplets in skeletal muscle. Histochem Cell Biol* 131:575-81, 2009
9. Heid HW, Moll R, Schwetlick I, Rackwitz HR, Keenan TW: *Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. Cell Tissue Res* 294:309-21, 1998
10. Bell M, Wang H, Chen H, McLenithan JC, Gong DW, Yang RZ, Yu D, Fried SK, Quon MJ, Londos C,

- Sztalryd C: Consequences of lipid droplet coat protein downregulation in liver cells: abnormal lipid droplet metabolism and induction of insulin resistance. Diabetes 57:2037-45, 2008*
11. Listenberger LL, Ostermeyer-Fay AG, Goldberg EB, Brown WJ, Brown DA: *Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover. J Lipid Res 48:2751-61, 2007*
12. Schadinger SE, Bucher NL, Schreiber BM, Farmer SR: *PPARgamma2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. Am J Physiol Endocrinol Metab 288:E1195-205, 2005*
13. Targett-Adams P, McElwee MJ, Ehrenborg E, Gustafsson MC, Palmer CN, McLauchlan J: *A PPAR response element regulates transcription of the gene for human adipose differentiation-related protein. Biochim Biophys Acta 1728:95-104, 2005*
14. Motomura W, Inoue M, Ohtake T, Takahashi N, Nagamine M, Tanno S, Kohgo Y, Okumura T: *Up-regulation of ADRP in fatty liver in human and liver steatosis in mice fed with high fat diet. Biochem Biophys Res Commun 340:1111-8, 2006*
15. Mak KM, Ren C, Ponomarenko A, Cao Q, Lieber CS: *Adipose differentiation-related protein is a reliable lipid droplet marker in alcoholic fatty liver of rats. Alcohol Clin Exp Res 32:683-9, 2008*
16. Edvardsson U, Ljungberg A, Linden D, William-Olsson L, Peilot-Sjogren H, Ahnmark A, Oscarsson J: *PPARalpha activation increases triglyceride mass and adipose differentiation-related protein in hepatocytes. J Lipid Res 47:329-40, 2006*
17. Dalen KT, Ulven SM, Arntsen BM, Solaas K, Nebb HI: *PPARalpha activators and fasting induce the expression of adipose differentiation-related protein in liver. J Lipid Res 47:931-43, 2006*
18. Chawla A, Lee CH, Barak Y, He W, Rosenfeld J, Liao D, Han J, Kang H, Evans RM: *PPARdelta is a very low-density lipoprotein sensor in macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A 100:1268-73, 2003*
19. Jun Gao, Hong Ye, Ginette Serrero: *Stimulation of adipose differentiation related protein (ADRP) expression in adipocyte precursors by long-chain fatty acids. J Cell Physiol 182:297-302, 2000*
20. Phillips SA, Choe CC, Ciaraldi TP, Greenberg AS, Kong AP, Baxi SC, Christiansen L, Mudaliar SR, Henry RR: *Adipocyte differentiation-related protein in human skeletal muscle: relationship to insulin sensitivity. Obes Res 13:1321-9, 2005*
21. Björn Magnusson, Lennart Asp, Pontus Boström, Michel Ruiz, Pia Stillemark-Billton, Daniel Lindén, Jan Borén, Sven-Olof Olofsson: *Adipocyte Differentiation-Related Protein Promotes Fatty Acid Storage in Cytosolic Triglycerides and Inhibits Secretion of Very Low-Density Lipoproteins. Arterioscler Thromb Vasc Biol 26:1566-71, 2006*
22. Jiang HP, Serrero G: *Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein. Proc Natl Acad Sci USA 89:7856-60, 1992*
23. Jenkins AB, Storlien LH, Chisholm DJ, Kraegen EW: *Effects of nonesterified fatty acid availability on tissue-specific glucose utilization in rats in vivo. J Clin Invest 82:293-9, 1988*
24. Hirabara SM, Silveira LR, Abdulkader F, Carvalho CR, Procopio J, Curi R: *Time-dependent effects of fatty acids on skeletal muscle metabolism. J Cell Physiol 210:7-15, 2007*