

## 고지방식으로 비만을 유도한 생쥐에서 혈장 케모카인 발현 변화\*

김동환<sup>1\*\*</sup> · 조정민<sup>2\*\*</sup> · 서민준<sup>3,4</sup> · 임주현<sup>4</sup> · 배혜란<sup>1,4†</sup>

동아대학교 휴먼라이프리서치센터<sup>1</sup>, 동아대학교 의과대학 성형외과<sup>2</sup>, 동아대학교 의과대학 응급의학과<sup>3</sup>, 동아대학교 의과대학 생리학교실<sup>4</sup>

## Alteration in plasma chemokine profile in a high-fat diet-induced obesity mouse model\*

Kim, Dong-Hwan<sup>1\*\*</sup> · Cho, Jeong Min<sup>2\*\*</sup> · Seo, Min Joon<sup>3,4</sup> · Lim, Ju Hyun<sup>4</sup> · Bae, Hae-Rahn<sup>1,4†</sup>

<sup>1</sup>Human Life Research Center, Dong-A University, Busan 49315, Korea

<sup>2</sup>Department of Plastic Surgery, College of Medicine, Dong-A University, Busan 49201, Korea

<sup>3</sup>Department of Emergency Medicine, College of Medicine, Dong-A University, Busan 49201, Korea

<sup>4</sup>Department of Physiology, College of Medicine, Dong-A University, Busan 49201, Korea

### ABSTRACT

**Purpose:** Obesity is associated with a dysregulation of metabolic balance and is regarded as a low grade chronic inflammation. Western-style diet and physical inactivity are leading causes of obesity. This study examined the profiles of forty plasma cytokines and chemokines at the same time in the early stages of high-fat diet-induced obesity using a mouse model.

**Methods:** A total of 30 male CD1 mice, 12 ~ 14 weeks of age, were enrolled. The mice were fed a high-fat diet for 6 weeks to induce obesity. The plasma glucose and triglyceride concentrations were measured using a hexokinase colorimetric assay kit and a serum triglyceride determination kit, respectively. The relative levels of multiple cytokines and chemokines in the plasma were determined using a mouse cytokine array kit. **Results:** The mice exhibited significant weight gain after 6 weeks of a high-fat diet. The genital fat depot was enlarged along with an increase in the number and the mean size of white adipocytes as early as 4 weeks after a high-fat diet. In addition, the plasma glucose and triglyceride levels increased significantly after 4 weeks of a high-fat diet. Cytokine array analysis revealed a remarkable increase in the expression of both CXCL12 and CXCL13, whereas the proinflammatory cytokines remained low after 4 weeks of a high-fat diet. **Conclusion:** A significant increase in plasma levels of CXCL12 and CXCL13 was observed after 4 weeks of a high-fat diet, which might induce the migration of B lymphocytes, T lymphocytes, and monocytes from the blood to expanding adipose tissue or fat associated lymphoid clusters, playing a key role in adipose tissue remodeling and local immunity during the early stages of high-fat diet-induced obesity.

**KEY WORDS:** high-fat diet, obesity, CXCL12, CXCL13, mouse

## 서 론

현대사회에서 신체 활동량 부족 및 열량 섭취 증가로 인한 비만은 하나의 사회문제로 인식되고 있으며, 질병관리본부에서 시행한 2016년 국민건강영양조사 결과 우리나라 만 19세 이상 성인의 비만 유병률은 34.8%였다. 비만으로 인해 고혈당증, 인슐린 저항성, 제2형 당뇨병, 고혈압 및 여러 종류의 암을 포함한 비만 관련 질병 발생 위험이 증

가하기 때문에 비만은 치료가 필요한 만성질환으로 경고하고 있다.<sup>1-3</sup>

선천성 및 후천성 면역반응은 대사 항상성 조절에 중요한 역할을 담당하고 있으며, 대사 조절 이상으로 생기는 비만은 낮은 단계의 만성 염증질환으로 간주된다.<sup>4</sup> 지방조직은 렙틴 (leptin), 아디포넥틴 (adiponectin) 등 여러 호르몬을 분비하는 내분비 기능뿐 아니라 염증 및 종양세포에 영향을 주는 시토카인 (cytokine) 및 케모카인 (chemokine)

Received: August 31, 2018 / Revised: September 14, 2018 / Accepted: October 8, 2018

\* This work was supported by the Dong-A University research fund.

\*\* These authors contributed equally to this article.

† To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-51-240-2924, e-mail: hrbae@dau.ac.kr

© 2018 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

도 분비한다.<sup>5,6</sup> 비만으로 인해 지방조직이 과도하게 팽창하면 지방조직의 기능 이상 및 염증 유발로 인해 전신적으로 혹은 특정 조직별로 염증성 시토카인 (proinflammatory cytokine)이 증가하는 것으로 알려져 있다.<sup>7</sup> 최근 비만과 관련하여 지방조직 대식세포 (adipose tissue macrophage, ATM)가 비만으로 인해 유도되는 지방조직 재형성 (adipose tissue remodeling)을 매개하여 비만 관련 질병의 발생에 관여한다고 보고되었다.<sup>8,9</sup> 비만이 생기면 대식세포가 백색 지방조직으로 침투하고, M2형에서 M1형으로 분극화 (polarization)되어 Tumor necrotic factor (TNF)- $\alpha$ , Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6 등의 염증성 시토카인 (proinflammatory cytokine)을 분비하여 염증으로 인한 조직손상을 매개한다.<sup>10</sup>

이러한 지방조직 재형성을 담당하는 지방조직 대식세포는 골수에서 유래된 것으로 밝혀졌는데,<sup>11</sup> 골수에서 분화된 단핵구가 혈액으로 유입된 후 다시 혈관을 빠져나가 지방조직으로 화학주성을 통해 이동하기 위해서는 케모카인의 역할이 중요하다. 지금까지 비만과 관련하여 지방조직 대식세포의 화학주성에는 monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)과 그 수용체인 chemokine receptor 2 (CCR2)의 역할이 강조되고 있으며, 이에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다.<sup>12-14</sup> MCP-1/CCR2에 대한 대부분의 연구는 지방조직 안에서 발현, 농도 및 화학주성의 증가를 관찰한 것으로, 혈중 MCP-1의 농도를 조사한 연구는 많지 않지만, 혈중 MCP-1의 농도는 지방조직 내 MCP-1의 발현 및 농도와 연관되어 증가한다고 보고하였다.<sup>14,15</sup> 또한, 혈액으로 MCP-1을 주입한 후 단핵구의 이동을 직접 측정된 연구에서 혈중 MCP-1의 증가는 지방조직으로 단핵구의 이동을 증가시킨다고 보고하였다.<sup>15</sup> 따라서 혈액 내 케모카인의 농도 변화는 지방조직 내 케모카인의 변화와 협동하여 지방조직으로 면역세포의 이동을 유발하는 것으로 판단되나, 혈액 내 케모카인의 변화를 조사한 연구는 드물다. 더욱이 고지방식으로 유도한 비만 모델에서 케모카인의 연구는 대부분 10주 이상 고지방식을 섭취한 후 관찰하였는데, 이보다 더 이른 시기에 대식구뿐 아니라 다른 백혈구의 화학주성을 유도 할 수 있는 혈액 내 케모카인의 변화가 일어날 수 있으나 이를 조사한 연구는 거의 없다.

이에 본 연구는 비만을 유발하는 주요 원인 중 하나로 알려진 고지방식에 의해 유도된 비만 생쥐모델을 이용하여 지방조직의 형태학적 변화가 일어나기 시작하는 비만의 초기 단계에서 혈액 내 40 여종의 시토카인 및 케모카인의 상대적인 변화를 동시에 분석함으로써 비만 초기에 지방조직으로 면역세포의 이동과 활성화 기전을 밝히고자 하였다.

## 연구방법

### 실험동물

본 연구에는 생후 12~14주령의 CD1 수컷 생쥐를 사용하였다. 실험동물은 동아대학교 의과대학 동물사육실에서 항온 항습 (기온  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도  $50 \pm 2\%$ ) 환경에서 12시간 마다 밤낮이 교차하는 생리적 상태에서 사육하였다. 실험군은 각각 대조군 ( $n = 10$ ), 4주 고지방식이군 ( $n = 10$ ) 및 6주 고지방식이군 ( $n = 10$ )으로 나누어 실험을 진행하였다. 모든 실험은 동아대학교 동물실험윤리심의위원회의 (DIACUC- 15-2) 승인을 얻어 시행하였다.

### 고지방식이 유도 비만 생쥐 모델

비만의 유도는 (주)새론바이오에서 구입한 고지방식이 사료 (60% 지방 칼로리, 제품번호 D12492)를 이용하여 4~6 주간 자유 섭취토록 하였다. 일반 식이군은 일반 사료 (15% 지방 칼로리, 제품번호 #31)를 제공하였다. 섭취한 사료의 양은 매일 기록하였으며, 생쥐별 하루 섭취량은 제한하지 않았다. 비만 유발 여부를 확인하기 위하여 매일 생쥐의 몸무게를 측정하였다.

### 혈액 채취

고지방식이 유도 4주 혹은 6주 후 생쥐를 1% avertin (Tribromoethanol, 250 mg/kg, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) 복강 주사로 마취시킨 다음, 복강을 절개하여 하대정맥에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 2,500 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈구 및 혈장을 분리한 후  $-70^\circ\text{C}$ 에 냉동 보관하여 사용하였다.

### 조직 적출

고지방식이 유도 4주 혹은 6주 후 간, 심장, 골격근 및 지방조직을 적출하여 각각의 무게를 측정하였다. 지방조직은 지방 종류별 차이를 비교하기 위해 생식기 지방조직, 서혜부 지방조직 및 어깨사이 지방조직으로 나누어 각각의 무게와 형태학적 변화를 관찰하였다.

### 조직절편 제작

생쥐에서 채취한 지방조직은 10% neutral buffered formalin (NBF, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)에서 48시간 고정한 다음 흐르는 물로 하루 수세시키고 자동침투기 (TP 1020, Leica Biosystems, Nussloch, Germany)에 넣어서 조직 내 파라핀을 침투시켰다. 조직은 포매기 (EG 1150H, Leica Biosystems, Nussloch, Germany)를 이용하여 파라핀 블록을 만든 다음, 조직절편기 (RM 2125RT, Leica

Biosystems, Nussloch, Germany)로 5/㎜ 두께의 파라핀 절편을 제작하였다.

### 헤마톡실린 에오신 염색

파라핀 절편은 70°C 가열판 위에서 30분 동안 절편 조직 내 파라핀을 녹인 후 3단계 xylene 수세로 파라핀을 제거하고, 100%에서 80%까지 단계별 에탄올을 이용하여 흡수시킨 다음 흐르는 물로 세척하였다. 헤마톡실린 용액 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)에 5분간 담근 후 수세하고, 다시 1% 염산 에탄올 용액과 1% 암모니아수로 처리하고 수세하였다. 다시 에오신 Y 용액 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)에 3분간 담근 다음 단계적 탈수 및 투명 과정을 거쳐 봉입액 (Permount, Polysciences, Niles, IL, USA)으로 봉입하고 광학 현미경 (BX51, Olympus, Tokyo, Japan) 혹은 가상 현미경 (Aperio Scanscope CS, Leica Biosystems, Nussloch, Germany) 하에서 지방조직의 형태학적 변화를 관찰하였다.

### 혈장 포도당 및 중성지방 농도 측정

혈장 내 포도당 함량 측정은 glucose hexokinase assay kit (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)를 사용하였다. 이 분석법은 포도당이 ATP 존재하에서 hexokinase에 의해 glucose-6-phosphate로 전환된 후 다시 glucose-6-phosphate dehydrogenase에 의해 6-phosphogluconate로 산화되면서 생성되는 NADPH의 양을 분광광도계로 측정하는 방법이다. 포도당 시약 350 µL에 혈장 20 µL를 첨가하고 37°C에서 5분 동안 반응시킨 후 분광광도계로 340nm 파장의 흡광도를 측정하고 포도당 표준곡선을 이용하여 포도당 농도를 계산하였다.

혈장 내 중성지방 함량은 효소법을 이용한 serum triglyceride determination kit (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)로 측정하였다. 이 분석법은 중성지방이 지질단백질분해효소 (lipoprotein lipase)에 의하여 발색된 키노이드색소를 분광광도계로 측정하는 방법이다. 중성지방 시약 350 µL에 혈장 20 µL를 첨가하고 37°C에서 5분 동안 반응시킨 후 분광광도계로 540nm 파장의 흡광도를 측정하고, 중성지방 표준용액을 이용하여 얻은 표준곡선으로부터 중성지방 농도를 계산하였다.

### Cytokine array

고지방식이로 유도된 비만이 여러 종류의 시토카인 및 케모카인 분비에 미치는 영향을 동시에 조사하기 위해 mouse cytokine panel A array kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하였다. 고지방식이 유도 4주 후 채취한

혈장과 일반 사료를 섭취한 대조군 혈장 내 급성기 단백질 (acute phase protein), 시토카인 및 케모카인 40종 [B lymphocyte chemoattractant (BLC), complement component 5a (C5a), granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), I-309, eotaxin, soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-16, IL-17, IL-23, IL-27, IFN- $\gamma$ -inducible protein 10 (IP-10), interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant (I-TAC), keratinocyte chemoattractant (KC), macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), MCP-5, monokine induced by interferon- $\gamma$  (Mig), macrophage inflammatory proteins 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), MIP-1 $\beta$ , MIP-2, regulated upon activation normal T cell expressed and secreted (RANTES), stromal cell-derived factor 1 (SDF-1), thymus and activation-regulated chemokine (TARC), tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 및 triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1)]의 변화를 비교 분석하였다.

### 통계처리

본 연구에서 얻은 자료의 분석은 통계 프로그램 SPSS Window Version 20.0 (IBM Co., Armonk, NY, USA)을 이용하여 모든 측정항목에 대해 평균과 표준오차를 산출하였다. 집단 간에 지방 무게의 차이 검증은 일원배치분산분석 (One-way ANOVA)를 실시하였고, 집단과 시기 간의 유의성은 independent t-test를 실시하였다. 모든 통계적 유의수준은  $p < 0.05$ 로 설정하였다.

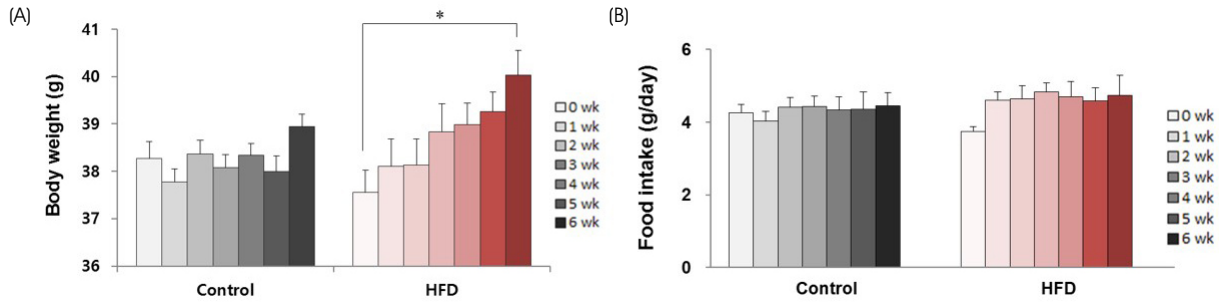
## 결 과

### 고지방식이에 의한 체중 및 섭취량의 변화

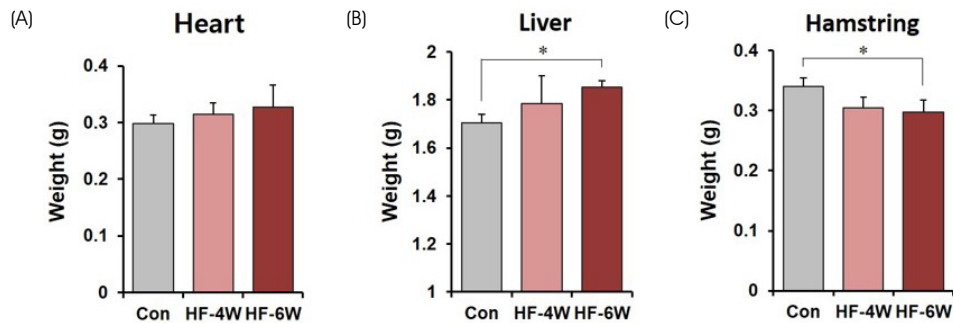
고지방식이에 의한 생쥐의 체중 변화를 분석한 결과 고지방식이 유도 4주까지는 대조군과 비교하여 유의한 체중 증가가 관찰되지 않았으나, 고지방식이 유도 6주 후에는 유의한 증가가 관찰되었다. 식이 유도 6주 후 시작 시점 기준 6.59%의 체중이 증가하여, 1.74%의 체중이 증가한 대조군과 비교하여 3.79배 증가하였다 (Fig. 1A). 하지만 생쥐 한 마리당 하루 동안 섭취하는 사료량은 두 군간 유의한 차이가 관찰되지 않았다 (Fig. 1B).

### 고지방식이에 의한 장기의 무게 변화

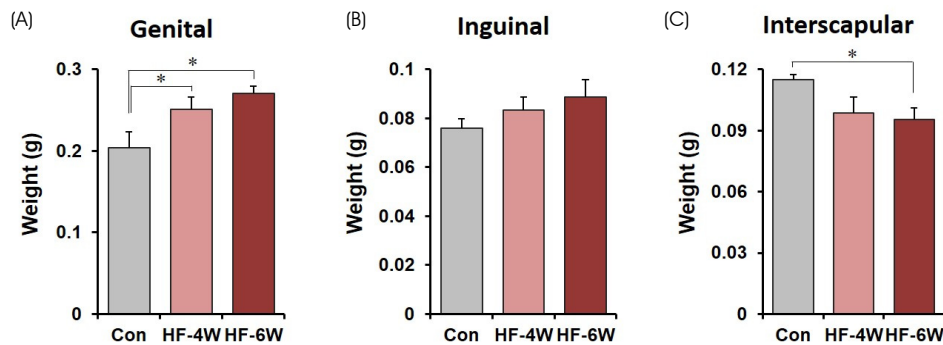
고지방식이 유도 4주 및 6주 후 적출한 생쥐의 장기 무



**Fig. 1.** Changes in body weights and food intake after a high-fat diet. The body weights (A) and the amount of food intake (B) of CD1 mice were measured for 6 weeks of normal (Control) or a high-fat diet (HFD). Note the significant weight gain after 6 weeks of a high-fat diet with no change in food intake (mean  $\pm$  SE, \*  $p < 0.05$ ).



**Fig. 2.** Changes in organ weights after a high-fat diet. Heart (A), liver (B) and hamstring muscle (C) of CD1 mice were extracted after 4 weeks (HF-4W) and 6 weeks (HF-6W) of normal (CON) or a high-fat diet and weighed. Note that the weight of liver increased while that of hamstring muscle decreased after 6 week high-fat diet (mean  $\pm$  SE, \*  $p < 0.05$ ).



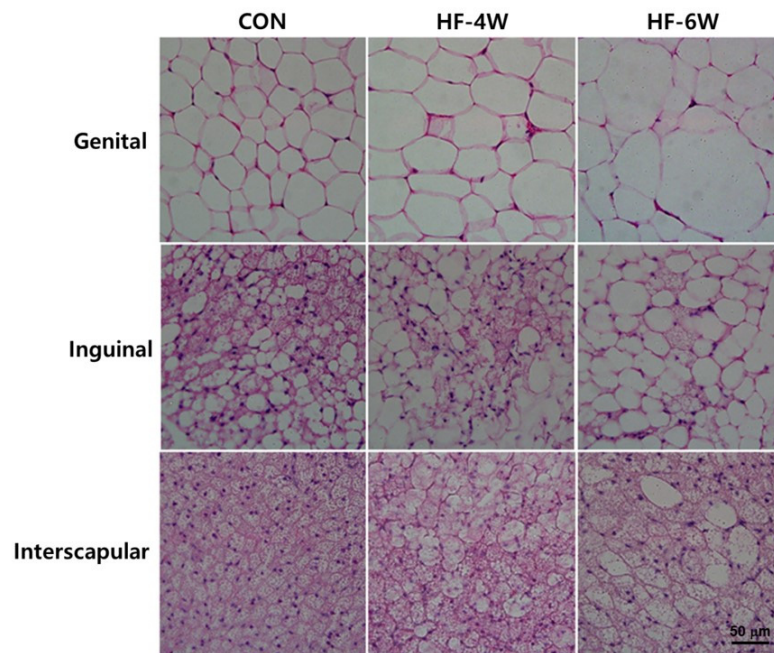
**Fig. 3.** Changes in adipose tissue mass after a high-fat diet. Genital (A), inguinal (B) and interscapular adipose tissues (C) of CD1 mice were extracted after 4 weeks (HF-4W) and 6 weeks (HF-6W) of normal (CON) or a high-fat diet and weighed. Note that weights of genital fat depots increased while those of interscapular fat depots decreased after 6 week high-fat diet (mean  $\pm$  SE, \*  $p < 0.05$ ).

계를 비교하였다. 고지방식이 유도 6주 동안 심장은 유의한 무게 변화가 관찰되지 않았으나 (Fig. 2A), 간의 무게는 대조군에 비해 고지방식이군에서 8.72% 증가하였고 (Fig. 2B), 골격근인 뒤다리넓적근 (hamstring)의 무게는 12.77% 감소하였다 (Fig. 2C).

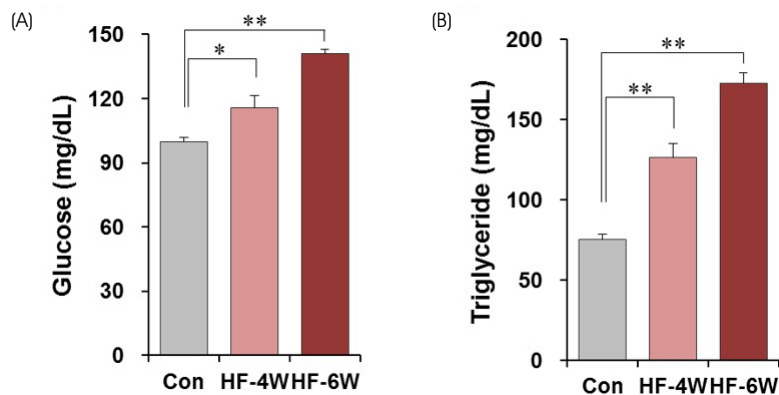
#### 고지방식에 의한 지방조직의 무게 변화

고지방식이 유도 4주 및 6주 후 생쥐 지방조직의 무게를 지방 부위별로 측정하여 비교하였다. 백색 지방조직인 생

식기 지방조직의 무게는 고지방식이 유도 4주부터 유의한 무게 변화가 관찰되었는데, 대조군에 비해 4주 후 22.86%, 6주 후 32.77%가 증가하였다 (Fig. 3A). 갈색 지방조직인 어깨사이 지방조직도 고지방식이 유도 6주 후부터 유의한 무게 변화가 관찰되었는데, 대조군에 비해 6주 후 17.01% 감소하였다 (Fig. 3C). 백색 및 베이지색 지방조직이 혼재된 서혜부 지방조직은 고지방식이 유도 6주 후 대조군에 비해 16.89% 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다 (Fig. 3B).



**Fig. 4.** Histological analysis of adipose tissues after a high-fat diet. Genital, inguinal and interscapular adipose tissues of CD1 mice were paraffin sectioned and stained with hematoxylin and eosin after 4 weeks (HF-4W) and 6 weeks (HF-6W) of normal (CON) or a high-fat diet. Note that the number and the mean size of white adipocytes increased as early as 4 weeks following a high-fat diet.



**Fig. 5.** Changes in plasma glucose and triglyceride levels after a high-fat diet. Concentrations of plasma glucose (A) and triglyceride (B) were measured after 4 weeks (HF-4W) and 6 weeks (HF-6W) of a high-fat diet or normal diet (CON). Note that the plasma glucose and triglyceride levels significantly increased after 4 weeks of a high-fat diet (mean  $\pm$  SE, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

#### 고지방식이에 의한 지방조직의 형태학적 변화

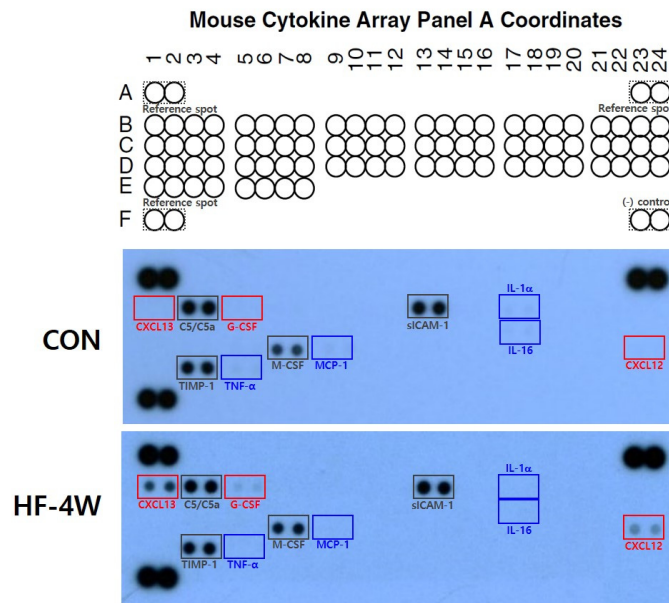
고지방식이 4주 및 6주 후 지방조직의 조직학적 변화를 헤마톡실린-에오신 염색으로 분석한 결과 모든 지방조직에서 고지방식이 4주부터 지방세포의 수와 크기가 증가하였다 (Fig. 4). 생식기 지방조직에서 고지방식이 후 지방세포의 크기가 가장 현저하게 증가하였고, 이로 인해 지방세포 주변 혈관을 포함하고 있는 세포외기질은 더 조밀하게 보였다. 서혜부 지방조직은 고지방식이 후 베이지색 지방세포의 비율이 줄어들었고, 백색 지방세포 비율이 증가함

에 따라 세포의 크기도 증가하였다. 어깨사이 지방조직도 고지방식이 후 갈색 지방세포가 베이지색 및 백색 지방세포로 전환되어 지방세포 내 지방 방울의 수는 감소하고 지방 방울의 크기는 증가하였으며 모세혈관과 미토콘드리아의 수도 감소하였다.

#### 고지방식이에 의한 혈장 포도당 및 중성지방의 농도 변화

고지방식이 유도 4주 및 6주 후 혈장 내 포도당 및 중성지방의 농도를 측정된 결과 모두 고지방식이 4주부터 유





**Fig. 6.** Representative blots of mouse plasma cytokine array after a high-fat diet. Plasma cytokine and chemokine profiles were assessed using a mouse cytokine array kit after 4 weeks of normal (CON) or a high-fat diet (HF-4W). The dots exhibiting stronger density in HF-4W than CON are boxed in red, whereas those exhibiting weaker density in HF-4W than CON are boxed in blue. The dots with gray boxes correspond to those showing similar densities between the two groups. Note that CXCL12 and CXCL13 spots remarkably increased after 4 weeks of a high-fat diet. Representative blots from 3 individual experiments.

의한 변화가 관찰되었다. 혈당치는 4주 후 16.26% 증가하였고 (대조군  $99.6 \pm 2.2$  mg/dL, 고지방식이군  $115.8 \pm 5.6$  mg/dL), 6주 후에는 41.47% 증가하였다 (대조군  $99.6 \pm 2.2$  mg/dL, 고지방식이군  $140.9 \pm 2.3$  mg/dL) (Fig. 5A). 고지방식이 유도 후 혈당치보다 중성지방 농도가 더 급격히 증가하였는데, 4주 후 67.59% 증가하였고 (대조군  $75.6 \pm 3.1$  mg/dL, 고지방식이군  $126.7 \pm 8.4$  mg/dL), 6주 후에는 128.57% 증가하였다 (대조군  $75.6 \pm 3.1$  mg/dL, 고지방식이군  $172.8 \pm 6.2$  mg/dL) (Fig. 5B).

### 고지방식이 유도에 의한 혈장 시토카인 및 케모카인의 변화

유의한 체중 변화가 나타나지는 않았지만, 지방조직의 무게와 형태학적 변화가 일어나는 시기인 고지방식이 4주 후 혈장 내 40종의 시토카인 및 케모카인의 변화를 동시에 관찰할 수 있는 cytokine array를 실시하였다. 실험 결과 총 11 종류의 혈장 시토카인 및 케모카인 반점이 발현되었는데, 이 중 CXCL12 (SDF-1)와 CXCL13 (BLC)의 반점들이 대조군과 비교하여 가장 큰 차이를 보였다 (Fig. 6). 대조군 혈장에서는 보이지 않던 CXCL12와 CXCL13의 반점들이 고지방식이 4주 후 선명한 반점으로 나타나 고지방식이 4주 후 발현량이 현저하게 증가하는 것으로 판단되었다. CXCL12와 CXCL13만큼 큰 차이가 나는 것은 아

니지만, G-CSF의 반점도 고지방식이군에서 발현이 증가하였다. 반면, IL-1α, MCP-1, IL-16 및 TNF-α는 대조군에서 희미한 반점으로 나타났으나 고지방식이군에서는 반점이 확인되지 않아 고지방식이 4주 후 발현이 감소하는 것으로 보이나, 낮은 혈장 농도로 인해 반점이 확실하지 않아 이 결과만으로는 정확한 판단을 내리기가 어려웠다. C5a, siCAM-1, IL-6 및 M-CSF은 혈중 농도가 높아 뚜렷한 반점들로 나타났으나 대조군과 비교하여 고지방식이군에서 유의한 차이를 보이지 않았다.

### 고 찰

고지방식이 유도 비만 생쥐모델은 제2형 당뇨 및 대사성 질환 연구에 흔히 사용되는 실험 모델이다. 생쥐에서 비만과 제2형 당뇨가 유발되는 데 걸리는 시간은 생쥐의 품종, 성별, 나이, 고지방식이 종류 등에 따라 다양하다.<sup>16</sup> 인슐린 저항성을 보이는 제2형 당뇨는 대개 일반 서양식이 기준 (45 kcal% 지방 함유)으로 섭취 후 16~20주에 발생하는 것으로 알려져 있다.<sup>17</sup> 본 연구에서는 일반 서양식보다 높은 60% 지방이 함유된 사료를 4주간 섭취시킨 후부터 내장 지방조직의 지방 방울의 크기와 백색 지방세포의 수가 증가하는 형태학적 변화와 함께 백색 지방조직의 무게 증가하고, 혈당과 중성지방의 수치가 급격히 증가

하였다. 고지방식이 6주 후에는 백색 지방조직의 무게뿐 아니라 간의 무게도 증가하면서 몸무게도 유의하게 증가하기 시작하였다. 따라서 본 연구는 아직 체중 증가는 나타나지 않으면서 내장 지방조직의 형태학적 변화가 일어나기 시작하는 고지방식이 유도 4주 시점에서 지방조직의 변화가 혈액 내 시토카인 및 케모카인 환경에 어떤 변화를 유발하는지 관찰하고자 하였다. Array 실험 결과에서 보듯이 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1, sICAM-1 등 염증성 시토카인 및 케모카인의 혈장 농도는 고지방식이 4주 시점에서 낮게 발현되었으며, 대조군과 비교하여 유의한 차이를 보이지 않았는데, 이는 array 실험의 방법적인 한계로 낮은 혈중 농도를 보이는 경우 그 차이를 판단하기가 쉽지 않은 점이나 생쥐의 품종 및 개별 차이 등에 기인할 수도 있다. 하지만 이런 관점보다는 3회의 반복 실험 결과 두 군에서 모두 감소되어 있었고, 대부분의 기존 연구들은 10주 이상의 고지방식이를 섭취한 후에 관찰한 점을 고려하면, 이러한 결과는 고지방식이 유도 시간의 차이에 기인한 것으로 판단되어 이 시점은 아직 비만으로 인한 염증이 시작되기 전 상태를 시사한다.

케모카인은 4개의 보존된 시스테인 (cysteine) 잔기가 1~2개의 disulfide bond를 형성하는 8-14 kDa의 작은 분자로 시스테인 잔기의 수와 연속된 두 시스테인의 간격에 따라 CC, CXC, CXXC (CX3C) 및 C 케모카인으로 구분한다.<sup>18</sup> 케모카인은 세포막의 G-protein coupled receptor (GPCR)를 통해 작용을 매개한다. 케모카인은 화학주성물질로 작용하여 혈액 내 백혈구를 염증 조직으로 동원시키는 작용으로 잘 알려져 있고,<sup>19</sup> 이러한 염증반응 및 면역계 조절 기능뿐 아니라 면역계의 발생, 태아 발생, 종양 형성, 암전이 등 다양한 생리적 및 병태생리적 현상에도 관여한다.<sup>20,21</sup> 본 연구에서 고지방식이에 의해 증가하는 것으로 밝혀진 CXCL12와 CXCL13은 CXC 케모카인 군 (family)에 속하며 각각 GPCR 수용체인 CXCR4과 CXCR5을 통해 작용을 나타낸다.

CXCL12는 골수 기질세포주 (stromal cell line)에서 분비되는 것이 처음 보고되었으며, 림프구 및 대식구의 화학주성, 조혈세포 (hematopoietic cells)의 골수 이동, 혈관 형성 등에 관여한다.<sup>22</sup> CXCL12의 수용체인 CXCR4은 말초 혈액에 존재하는 단핵구, B 세포 및 미접촉 T 세포 (naive T cell)의 세포막에 고농도로 발현되며, 골수에서는 초기 조혈전구세포에 발현된다.<sup>23</sup> 최근 CXCL12의 새로운 수용체로 밝혀진 CXCR7이 종양세포주 및 종양주변 혈관 내 피세포에 발현한다고 보고되고 있어 CXCL12/CXCR4/CXCR7이 종양의 증식과 전이에 중요한 역할을 할 것으로 추측하고 있다.<sup>24</sup> CXCL12는 피부, 골수, 림프절 등 여러

조직의 기질세포에서 발현된다. 특히 골수 기질세포 중 CXCL12을 고농도로 발현하는 세포군을 CXCL12-abundant reticular (CAR) cells라 부르며, 이 세포들은 골수에서 조혈줄기 및 전구세포 (hematopoietic stem and progenitor cells, HSPCs)의 유지에 중요한 역할을 한다.<sup>25</sup> 지방전구세포도 CXCL12를 분비하는 것으로 보고되는데, 인체 지방조직의 기질혈관분획 (stroma-vascular fraction) 내 CD34<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup> 세포가 CXCL12를 분비한다.<sup>26</sup> 최근 CXCL12는 지방조직에서 분비되어 인슐린 저항성을 유발시키는 주요 인자로 밝혀져 자가분비 인슐린 탈감작 인자 (autocrine insulin-desensitizing factor)로도 불린다.<sup>27</sup> 따라서, 본 연구 결과 고지방식이에 의해 혈장 내 증가된 CXCL12는 팽창된 지방조직에서 분비된 것으로 보이며, CXCL12의 증가는 단핵구 및 림프구가 화학주성으로 혈관을 빠져나가 팽창하는 지방조직으로 유인하는 데 기여할 것이다. 또한 CXCL12의 증가는 골수에서 HSPCs의 증식과 분화를 촉진시켜 지방조직으로 림프구와 단핵구를 지속적으로 동원할 수 있게 해 줄 것으로 생각된다.

Peng 등 및 Kim 등의 보고는 본 연구 결과와 해석을 뒷받침해준다.<sup>28,29</sup> Peng 등은 60% 지방 식이를 8주 동안 시행한 생쥐 지방조직에서 분리한 지방조직 대식세포는 정상 생쥐의 지방조직 대식세포보다 CXCR7의 발현이 높고, CXCL12에 의한 화학주성이 증가한다고 보고하였다.<sup>23</sup> 하지만 지방조직 대식세포에서 CXCR4의 발현은 증가하지 않아, 고지방식이에 의해 증가되는 지방조직 대식세포의 CXCL12 화학주성은 CXCR7이 매개한다고 보고하였다. Kim 등도 60% 지방 식이를 10주 이상 섭취한 생쥐의 백색 지방조직 내 지방세포는 정상 지방세포보다 CXCL12 발현이 높았고, CXCR4를 통한 CXCL12의 화학주성이 증가한다고 보고하였다.<sup>29</sup> Peng 등과 Kim 등은 모두 지방조직 내에서 CXCR7 및 CXCL12의 발현 증가와 CXCL12에 의한 지방조직 대식세포의 화학주성을 관찰하였지만, 혈액이나 지방조직액 내 CXCL12의 농도를 직접 측정하지는 않았다. 그러나 혈액 내 순환하고 있는 림프구와 단핵구가 지방조직으로 이동하기 위해서는 먼저 혈장 내 CXCL12의 증가와 이로 인한 림프구와 단핵구의 혈관 누출이 선행되어야 한다. 본 연구는 고지방식이의 이른 시기인 4주부터 CXCL12 농도가 혈액 내 현저하게 증가하는 것을 처음으로 밝혔다는 점에서 의미가 있다.

CXCL13 (BLC; B cell-attracting chemokine-1, BCA-1)은 B 세포의 화학주성물질로 림프조직으로 B 세포의 귀소 (homing) 및 림프조직의 형성에 관여하는 케모카인이다.<sup>30</sup> CXCL13은 전신홍반루푸스 (systemic lupus erythematosus, SLE), 류마티스관절염 (rheumatoid arthritis) 등 자가면역

성 질환의 발생기전에 관여하는 것으로 밝혀져 치료의 타겟이 되고 있다.<sup>31,32</sup> CXCL13은 비장, 림프절 및 페이어반(Peyer's patches)의 소포에서 고농도로 발현되는데, 특히 림프조직의 기질 세포인 fibroblastic reticular cells (FRCs)가 주된 CXCL13 분비세포이며, follicular B helper T cells (TFH)도 CXCL13을 분비한다.<sup>33</sup> CXCL13의 수용체인 CXCR5는 B 세포와 CD4<sup>+</sup> 기억 T 세포에서 발현된다.<sup>34</sup> CXCL13/CXCR5 유전자 결핍 생쥐는 서혜부 림프절이 없으며, 비장과 페이어반에서 일차 소포 및 배중심(germinal center) 형성 장애를 보인다고 한다.<sup>35</sup> 지방 조직에도 B 세포의 군집이 많이 존재하며, 최근에는 복강 및 흉강에 있는 내장지방에도 B 세포 군집이 포함되어 있다고 하여, Moro 등은 이러한 지방조직 내 림프구군집을 합쳐서 지방 연관림프구군집(fat associated lymphoid clusters, FALCs)라고 명명하였다.<sup>36,37</sup> 본 연구에서 고지방식에 의해 CXCL12와 함께 증가하는 것으로 처음 밝혀진 CXCL13는 비만으로 인한 염증 상태에 반응하여 FRCs를 포함한 림프조직에서 분비된 것으로 추측된다. 증가된 CXCL13은 혈액 내 B 세포를 림프조직으로 불러들여 복강 내 내장지방에 FALCs를 형성시키고, 형성된 FALCs 내 기질세포가 다량의 CXCL13를 분비하여 B 세포를 증식, 분화시킴으로써 복강 내 면역 강화에 관여할 것으로 생각된다. 지금까지 고지방식에 의해 혈액 내 CXCL13이 증가한다는 보고는 없었으나, 식이로 인한 비만 시 내장지방 내 B 세포의 침윤이 증가한다는 보고가 있고,<sup>38</sup> 최근 T 세포와 대식세포뿐 아니라 B 세포도 비만 및 인슐린 저항성에 중요한 역할을 하는 것이 제시되고 있어,<sup>39</sup> 본 연구 결과를 뒷받침해 주고 있다. B 세포에 의해 분비되는 lymphotoxin 등은 림프기관의 활성화와 형성에 중요한 역할을 하며, IL-6, IFN- $\gamma$  및 TNF는 CD4<sup>+</sup> 효과 및 기억 T 세포 반응에 관여하며, IL-10 및 IL-35를 통해 염증성 면역반응을 조절하는 등 B 세포는 항체 생산 이외에도 시토카인 분비를 통해 비만에 의해 유발되는 전신 및 국소 지방조직 면역을 조절하는 것으로 보고 있다.<sup>40</sup>

과립구집락자극인자(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)는 골수에서 호중구 및 단핵구등의 과립백혈구의 증식과 성숙을 촉진시키는 시토카인으로, 고지방식이와 비만에 의해 골수 줄기세포와 지방조직 내 T 세포에서 G-CSF의 분비가 증가된다는 보고들은 있으나,<sup>41,42</sup> 고지방식이 후 혈액 내 G-CSF의 농도를 측정한 보고는 아직 없다. 본 연구에서 G-CSF은 CXCL12와 CXCL13 반점과 같이 명확한 차이를 보이지는 않았지만, 동일한 노출 조건에서 대조군보다 고지방식이군에서 발현이 증가한 것으로는 보인다. 그러나 반점의 크기로 볼 때 혈액 내

G-CSF 농도는 아주 낮은 것으로 판단되어 미세한 농도도 정량적 분석할 수 있는 ELISA 등의 방법으로 측정하여야 정확한 판단을 내릴 수 있다.

본 연구에서 16주 이상의 장기간 고지방식을 진행하지 않았는데, 향후 인슐린 저항성을 보이는 장기간 고지방식에 의해 혈 중 시토카인 및 케모카인이 어떤 변화를 보이는지 이번 단기간의 고지방식이 결과와 비교해 보면 비만 진행 시기에 따른 전신 및 국소 지방조직 면역에 대한 유용한 정보를 얻을 수 있을 것으로 보인다. 또한, 본 연구에서 고지방식이 4주 후 현저하게 증가된 혈장 CXCL12와 CXCL13이 지방조직 및 지방조직 주변 림프조직에 어떤 변화를 가져오는지 조직학적 변화와 함께 면역세포 분포의 차이를 조사해보면 비만 초기 지방조직 재형성 과정에서 지방조직 면역기전을 더 심층적으로 이해하는데 도움이 될 뿐 아니라, CXCL12와 CXCL13 및 이들 수용체가 비만을 초기 단계에서 효과적으로 예방하고 치료할 수 있는 새로운 표적 분자로 활용 가능한지 검증해 볼 수 있다.

## 요 약

본 연구에서 고지방식으로 비만을 유도한 생쥐는 식이 4주 후 지방조직의 형태학적 변화가 관찰되었고 생식기 지방조직의 무게가 증가하였으며, 혈장 중성지방 및 혈당치도 현저하게 증가하였다. 고지방식이 6주 후 몸무게의 유의한 증가가 관찰되기 시작하였으며, 뒤다리넙적근과 어깨사이 지방조직의 무게는 감소하고, 생식기 지방조직 및 간의 무게는 증가하였다. 지방조직의 형태학적 변화가 시작되는 고지방식이 유도 4주 후 혈장 내 40종의 시토카인 및 케모카인의 변화를 동시에 관찰하여 대조군과 비교해 본 결과, CXCL12 (SDF-1)와 CXCL13 (BLC)의 발현이 가장 현저하게 증가하였으며, G-CSF의 발현도 다소 증가하였다. 혈장 내 염증성 시토카인의 발현은 전반적으로 낮았다. 이상의 결과를 종합하면 고지방식이 유도 비만 초기에 만성 염증 상태로 진입하기 전 혈장 내 CXCL12와 CXCL13의 발현이 현저히 증가하는 것을 밝혔으며, CXCL12와 CXCL13의 증가로 B 세포, T 세포 및 단핵구가 혈관을 빠져나가 지방조직 및 지방조직 주변 림프조직으로 이동하여 지방조직 재형성과 국소 지방조직 면역에 관여할 것으로 보인다.

## ORCID

김동환: <https://orcid.org/0000-0001-6708-645X>



조정민: <https://orcid.org/0000-0002-0547-3574>

서민준: <https://orcid.org/0000-0001-7626-8909>

임주현: <https://orcid.org/0000-0001-9079-7831>

배혜란: <https://orcid.org/0000-0002-4261-5666>

## References

- Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106(4): 473-481.
- Landsberg L, Aronne LJ, Beilin LJ, Burke V, Igel LI, Lloyd-Jones D, Sowers J. Obesity-related hypertension: pathogenesis, cardiovascular risk, and treatment: a position paper of The Obesity Society and the American Society of Hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2013; 15(1): 14-33.
- De Pergola G, Silvestris F. Obesity as a major risk factor for cancer. *J Obes* 2013; 2013: 291546.
- Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 2011; 121(6): 2111-2117.
- Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(6): 2548-2556.
- Makki K, Froguel P, Wolowczuk I. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm* 2013; 2013: 139239.
- Kanneganti TD, Dixit VD. Immunological complications of obesity. *Nat Immunol* 2012; 13(8): 707-712.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112(12): 1796-1808.
- Suganami T, Ogawa Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol* 2010; 88(1): 33-39.
- Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007; 117(1): 175-184.
- Ito A, Suganami T, Yamauchi A, Degawa-Yamauchi M, Tanaka M, Kouyama R, Kobayashi Y, Nitta N, Yasuda K, Hirata Y, Kuziel WA, Takeya M, Kanegasaki S, Kamei Y, Ogawa Y. Role of CC chemokine receptor 2 in bone marrow cells in the recruitment of macrophages into obese adipose tissue. *J Biol Chem* 2008; 283(51): 35715-35723.
- Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2011; 11(11): 762-774.
- Surmi BK, Hasty AH. Macrophage infiltration into adipose tissue: initiation, propagation and remodeling. *Future Lipidol* 2008; 3(5): 545-556.
- Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 2006; 116(6): 1494-1505.
- Takahashi K, Mizuarai S, Araki H, Mashiko S, Ishihara A, Kanatani A, Itadani H, Kotani H. Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice. *J Biol Chem* 2003; 278(47): 46654-46660.
- Heydemann A. An overview of murine high fat diet as a model for type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Res* 2016; 2016: 2902351.
- Wang CY, Liao JK. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods Mol Biol* 2012; 821: 421-433.
- Comerford I, McColl SR. Mini-review series: focus on chemokines. *Immunol Cell Biol* 2011; 89(2): 183-184.
- Bunting MD, Comerford I, McColl SR. Finding their niche: chemokines directing cell migration in the thymus. *Immunol Cell Biol* 2011; 89(2): 185-196.
- Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2001; 2(2): 108-115.
- Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(7): 540-550.
- Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(6): 2305-2309.
- Nagasawa T. CXCL12/SDF-1 and CXCR4. *Front Immunol* 2015; 6: 301.
- Sun X, Cheng G, Hao M, Zheng J, Zhou X, Zhang J, Taichman RS, Pienta KJ, Wang J. CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 2010; 29(4): 709-722.
- Nagasawa T, Omatsu Y, Sugiyama T. Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: the role of reticular cells. *Trends Immunol* 2011; 32(7): 315-320.
- Sengenès C, Miranville A, Maumus M, de Barros S, Busse R, Bouloumié A. Chemotaxis and differentiation of human adipose tissue CD34+/CD31- progenitor cells: role of stromal derived factor-1 released by adipose tissue capillary endothelial cells. *Stem Cells* 2007; 25(9): 2269-2276.
- Shin J, Fukuhara A, Onodera T, Kita S, Yokoyama C, Otsuki M, Shimomura I. SDF-1 is an autocrine insulin-desensitizing factor in adipocytes. *Diabetes* 2018; 67(6): 1068-1078.
- Peng H, Zhang H, Zhu H. Blocking CXCR7-mediated adipose tissue macrophages chemotaxis attenuates insulin resistance and inflammation in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 479(4): 649-655.
- Kim D, Kim J, Yoon JH, Ghim J, Yea K, Song P, Park S, Lee A, Hong CP, Jang MS, Kwon Y, Park S, Jang MH, Berggren PO, Suh PG, Ryu SH. CXCL12 secreted from adipose tissue recruits macrophages and induces insulin resistance in mice. *Diabetologia* 2014; 57(7): 1456-1465.
- Legler DF, Loetscher M, Roos RS, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5. *J Exp Med* 1998; 187(4): 655-660.
- Schiffer L, Worthmann K, Haller H, Schiffer M. CXCL13 as a new biomarker of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis - from bench to bedside? *Clin Exp Immunol* 2015; 179(1): 85-89.
- Klimatcheva E, Pandina T, Reilly C, Torno S, Bussler H, Scrivens M, Jonason A, Mallow C, Doherty M, Paris M, Smith ES, Zauderer M. CXCL13 antibody for the treatment of autoimmune disorders. *BMC Immunol* 2015; 16: 6.
- Fletcher AL, Acton SE, Knoblich K. Lymph node fibroblastic reticular cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2015;

- 15(6): 350-361.
34. Förster R, Emrich T, Kremmer E, Lipp M. Expression of the G-protein-coupled receptor BLR1 defines mature, recirculating B cells and a subset of T-helper memory cells. *Blood* 1994; 84(3): 830-840.
35. Förster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* 1996; 87(6): 1037-1047.
36. Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, Furusawa J, Ohtani M, Fujii H, Koyasu S. Innate production of T<sub>H</sub>2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> lymphoid cells. *Nature* 2010; 463(7280): 540-544.
37. Bénézech C, Luu NT, Walker JA, Kruglov AA, Loo Y, Nakamura K, Zhang Y, Nayar S, Jones LH, Flores-Langarica A, McIntosh A, Marshall J, Barone F, Besra G, Miles K, Allen JE, Gray M, Kollias G, Cunningham AF, Withers DR, Toellner KM, Jones ND, Veldhoen M, Nedospasov SA, McKenzie AN, Caamaño JH. Inflammation-induced formation of fat-associated lymphoid clusters. *Nat Immunol* 2015; 16(8): 819-828.
38. Shaikh SR, Haas KM, Beck MA, Teague H. The effects of diet-induced obesity on B cell function. *Clin Exp Immunol* 2015; 179(1): 90-99.
39. Winer DA, Winer S, Chng MH, Shen L, Engleman EG. B Lymphocytes in obesity-related adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71(6): 1033-1043.
40. Shen P, Fillatreau S. Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines. *Nat Rev Immunol* 2015; 15(7): 441-451.
41. do Carmo LS, Rogero MM, Paredes-Gamero EJ, Nogueira-Pedro A, Xavier JG, Cortez M, Borges MC, Fujii TM, Borelli P, Fock RA. A high-fat diet increases interleukin-3 and granulocyte colony-stimulating factor production by bone marrow cells and triggers bone marrow hyperplasia and neutrophilia in Wistar rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2013; 238(4): 375-384.
42. Yang H, Youm YH, Vandanmagsar B, Ravussin A, Gimble JM, Greenway F, Stephens JM, Mynatt RL, Dixit VD. Obesity increases the production of proinflammatory mediators from adipose tissue T cells and compromises TCR repertoire diversity: implications for systemic inflammation and insulin resistance. *J Immunol* 2010; 185(3): 1836-1845.