

알긴산이 3T3-L1세포의 분화에 미치는 영향

황혜정 · 변재형 · 남택정
부경대학교 식품생명공학부

The Effects of Alginic Acid on 3T3-L1 Cell's Differentiation

Hye-Jung HWANG, Jae-Hyeung PYEUN and Teak-Jeong NAM
Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University,
Pusan 608-737, Korea

This study examines the effects of alginic acid, a source of dietary fiber, in a glucose-derived media. In particular, we examined how the presence or absence of alginic acid affected the differentiation and triglyceride densities of 3T3-L1 cells. We established that the addition of insulin-like growth factor-I (IGF-I) to 3T3-L1 cells results in acceleration of differentiation. We sought to determine the role of alginic acid in the production of fat, by adding alginic acid to 3T3-L1 cells and examining its ability to limit or potentiate this stimulatory effects of IGF-I and IGF binding proteins. We have determined that alginic acid restricts 3T3-L1 cell differentiation and the creation of triglycerides, effectively attenuating 3T3-L1 cell metabolism and growth.

Key words: Alginic acid, Insulin, IGF-I, GPDH

서 론

지방세포는 triglyceride (TG)의 형태로 에너지를 합성, 저장, 분해하는데 중심적인 역할을 한다. 즉, 과잉 열량 시에 TG의 형태로 저장해두었던 열량을 열량소모가 많을 때 이를 분해하여 에너지로 사용하도록 하는 것이다. 이렇게 지방세포가 에너지 밸런스를 유지하는데는 lipogenesis와 lipolysis에 관여하는 많은 다양한 효소 및 조절인자들이 필요하다 (Kim and Spiegelman, 1996). 3T3-L1 세포는 성장이 진행되어 성장범위내 100%의 융합이 일어나면, 이 때부터 성장이 정지되고 지방세포로의 분화가 서서히 진행되게 된다. 3T3-L1 세포가 지방세포로 분화되는 과정은 배양액에 첨가한 혈청 중의 분화유도인자들에 의해 일어나는 현상이다. 그러므로 배양액 중에 분화촉진인자들 (insulin, 1-methyl-3-isobutylxanthine, prostaglandin F_{2α} 등)을 첨가함으로써 세포분화를 더욱 앞당길 수가 있으며, 반대로 분화억제인자들 (actinomycin D, tumor necrosis factor α, bromodeoxyuridine 등)을 첨가함으로써 분화를 억제할 수도 있다 (Ailhaud, 1992). 이렇게 해서 분화된 3T3-L1 세포는 세포 내 지방이 축적되는 등의 지방세포로서의 형태를 나타내게 되며, 지방세포 특유의 유전자발현 및 지방축적을 유도하는 효소의 활성화가 일어나게 된다. 지금까지 알려진 대표적인 지방세포 분화촉진인자들로는 insulin과 insulin-like growth factor-I (IGF-I)이 있다.

예전에는 비열량원으로써 그 영양적 가치를 인정받지 못했던 식이 섬유소에 대한 관심이 높아지면서 이를 이용한 체중감량식이, 다이어트 식품이 다양하게 개발되었으며 여기에 관한 연구도 활발히 진행되었다. 그러나 그 대부분이 *in vivo* 연구 (Kang et al.,

1994; Yang et al., 1996)이며 *in vitro*에서 식이섬유소가 가지는 생리적 작용에 관한 연구는 대단히 부족하다. 따라서 본 연구에서는 앞에서 언급한 3T3-L1 세포의 특성을 이용하여 해조류에 많이 함유되어 있는 알긴산이 지방세포로의 분화과정에 어떤 효과를 가질 것인가를 검토하고자 한다. 즉, 지방세포 분화에 알긴산의 영향을 확인하고자 하는 것이다.

재료 및 방법

1. 3T3-L1 세포배양

3T3-L1 세포는 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)을 함유한 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) [1.2 g/l sodium bicarbonate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.), 10 ml penicilline/streptomycin (Sigma), pH 7.0]으로 37°C 5% CO₂가 유지되는 CO₂ 배양기에서 배양하였다.

세포가 거의 성장하게 되면 0.5 mM methylisobutylxanthine (Sigma), 0.25 μM dexamethasone (Sigma), 1 μg/ml insulin (Sigma)이 함유된 10% FBS-DMEM (Sigma)으로 배양하였다. 48 시간 후 1 μg/ml insulin만 포함한 10% FBS-DMEM으로 교환하고 이때부터 2일에 한 번씩 배지를 교환하였다. 이와 같이 처리하여 6~10일경이 지나면 80% 정도의 세포들에서 작은 지방구들이 생긴 것을 확인 할 수가 있었다. 세포 내 지방구 염색은 Miller et al. (1996)의 방법을 일부 변형한 방법으로 phosphate buffered saline (PBS)으로 2회 세척 후, 10% buffered neutral formalin으로 5분간 고정, 다시 PBS로 1회 세척한 다음 5 ml Oil red O로 1시간 동안 염색한 후 마지막으로 PBS로 2회 세척하였다.

알긴산에 의한 3T3-L1 세포의 분화 현상을 관찰하기 위한 실험에서는, 3T3-L1 세포가 90% 자랐을 때 대조군과 0.5 mM methylisobutylxanthine, 0.25 μ M dexamethasone, 1 μ g/ml insulin 처리군 (MDI 처리군), 0.5% alginate (Sigma)-MDI 처리군, MD-100 ng/ml IGF-I 처리군, MD-100 ng/ml IGF-I-0.5% alginate 처리군으로 구분하여 배양하였다. 그 다음 배양액과 세포추출물, 그리고 triglyceride (TG)를 채취하여 각각 glucose 소모량과 효소활성, 그리고 세포 내 TG함량을 다음과 같이 측정하였다.

2. Triglycerides (TG) 농도 측정

Monolayer를 PBS로 2회 세척한 후 trypsin 처리로 세포를 취한 다음 4°C 1,200 g로 3분간 원심분리하여 세포를 채취하였다. 그 다음 methanol : chloroform : H₂O = 2 : 1 : 0.8인 용액으로 세포 내 TG를 채취하였다. TG농도는 TRIGLYZYME-V Kit의 설명서에 따라 kit 시약 내 표준액을 이용하여 505 nm에서 흡광도를 duplicate로 측정하였다.

3. Cell lysate 채취 및 total protein 농도 측정

먼저 배양액을 제거한 후, PBS로 세척하였다. 그런 다음 100 mM NaF (Sigma), 10 mM EDTA (Sigma), 1 mM benzamidin (Sigma), 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF, Sigma), 50 mM Tris-HCl (Sigma)을 함유한 cell lysisation buffer를 이용하여 세포단백질 추출물을 취하였다.

채취한 단백질추출물 (400 μ l)을 취해 Biuret 법으로 세포 내 총단백질량을 측정하였다. Biuret 시약을 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정 후 단백질 함량을 계산하였다.

4. Glycophosphate dehydrogenase (GPDH) activity 측정

GPDH 활성측정은 Wise et al. (1979)의 방법을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 100 mM triethanolamine-HCl buffer (Sigma), pH 7.5, 2.5 mM EDTA, 0.12 mM NADH (Sigma), 0.2 mM dehydroxy acetone phosphate (Sigma), 0.1 mM β -mercaptoethanol (Sigma), 1~100 μ g 세포단백질이 포함된 1 ml 반응액을 340 nm에서 흡광도를 측정하여 GPDH의 활성을 계산한다. 효소활성 1 unit은 1 nmol NADH/min이 산화되는 정도로 하였다.

5. Insulin like-growth factor-I (IGF-I) ligand blot 및 immunoblots에 의한 IGF binding proteins (IGFBPs)의 분석

24시간동안 알긴산을 처리한 후 무혈청 배양액 (SFM)에서 24시간 배양한 3T3-L1 세포의 cell lysate와 세포배양액 (conditioned media, CM)을 채취하여 12.5% acrylamide gel에 전기영동을 실시하였다. 그런 다음 분리된 단백질을 Immobilon filter (Millipore Corp., MA, U.S.A.)로 Semidry electroblotter를 이용하여 옮겼다. 이때 표준 분자량은 Rainbow marker (Amersham, U.K.)를 이용하였다. Membrane을 건조한 후 ¹²⁵I-IGF-I과 반응 (4°C, overnight)시킨 후, Ligand Blot Buffer (LBB, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.5 mg/ml Na azide; pH 7.4)와 LBB+0.1% Tween 20으로 세척하여 건조시켰다. 건조된 membrane을 autoradiography로

IGF Binding proteins의 밴드를 확인하였다.

분화 전과 분화 후 24시간동안 알긴산을 처리한 3T3-L1 세포의 CM을 채취하여 1% BSA 처리한 centricon 3으로 농축하고 12.5% acrylamide gel에 전기영동한 후 각 IGFBPs의 항체를 이용하여 immunoblot을 실시하였다. 즉, 농축된 CM 각각의 농축배율을 10 배로 맞추기 위해 2X sample buffer와 혼합하여 17% acrylamide gel에 전기영동을 실시하였다. 그런 다음 분리된 단백질을 Immobilon filter (Millipore Corp., MA, U.S.A.)로 Semidry electroblotter를 이용하여 옮겼다. 이때 표준 분자량은 Rainbow marker (Amersham, U.K.)를 이용하였다. Membrane을 1X TBS로 세척하고, 3% BSA로 15분간 blocking 시킨 후 1 : 1000으로 희석한 1차 항체를 넣어 비닐 주머니에 봉하여 하룻밤 방치하였다. 1X TBS+0.1% IGEPAL-630+0.03% Triton X-100으로 세척하고 1X TBS로 세척 후 1 : 2000으로 희석한 2차 항체 (anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)를 넣고 봉한 후 3시간 반응시켰다. 1X TBS+0.1% IGEPAL-630+0.03% Triton X-100으로 세척하고 1X TBS로 세척 후 color substrate solution (NBT/BCIP, Promega)으로 발색하였다. 보라색의 밴드를 확인한 후 stop buffer (20 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8.0)로 반응을 종결시켰다.

6. Glucose 농도 분석

1 ml의 세포배양액을 취해 GLZYME kit의 설명서에 따라 kit에 포함된 표준액을 이용하여 500 nm에서 배양액 내 함유된 glucose 양을 spectrophotometer (Ultrospec 2000, Pharmacia)를 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

이번 연구에서는 세포분화에 따른 형태변화 및 효소활성을 측정하여 분화를 확인하였다. 세포 내 지방구 생성여부에 대해서는 현미경관찰과 Oil red O 염색으로 확인하였다 (Fig. 1). 즉 세포가 100% 자랐을 때, 5~6일이 지나면 세포 내에 작은 지방구들이 생긴 것을 확인할 수 있었다.

알긴산이 3T3-L1 세포의 분화에 어떠한 영향을 미치는 지를 알아보기 위해 세포배양액을 채취하여 IGF-I ligand blot을 실시하였다 (Fig. 2). Fig. 2에서 보는 바와 같이, 대조군, 0.01% alginate acid, 0.1% alginate acid, 0.5% alginate acid 처리군에서 모두 26 kDa의 BP-4가 많이 발견되었다. 반면, 대조군에서는 앞서 언급한 26kDa 밴드의 BP-4외에 34kDa (IGFBP-2)와 31kDa (IGFBP-5)가 발견되었다. 이를 각각 IGFBP immunoblot을 실시하였으며, 그 결과 34kDa 밴드는 IGFBP-2, 31kDa의 밴드는 IGFBP-5인 것으로 밝혀졌다 (Fig. 3). 한편, Boney et al.의 연구 (1994)에서는 분화 이후에 3T3-L1 세포의 CM에서 IGFBP-2, 3, 4와 30kDa의 밴드가 나타난다고 하였다. 그러나 이번 연구에서의 IGF-I ligand blot 결과, Boney et al.의 연구결과와 같이 IGFBP-2, 3, 4와 30 kDa의 밴드가 나타났으며, 이후의 immunoblot 결과에서 이 30 kDa의 밴드가 IGFBP-5임을 증명하였다. 또한, 알긴산 첨가에 따른

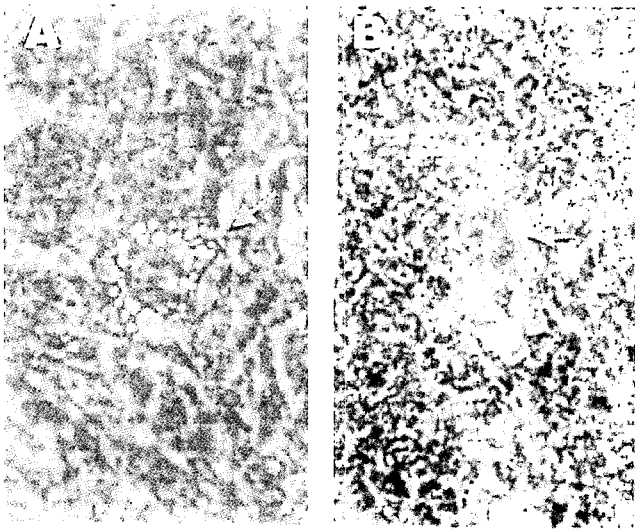


Fig. 1. Photomicrographs of 3T3-L1 cells. A: photographed before Oil Red O staining B: photographed after Oil Red O staining. The '←' is the symbol of fat droplets.

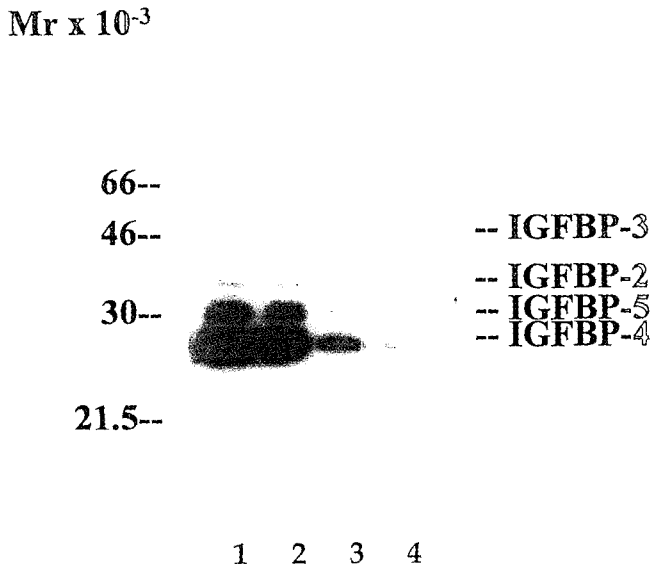


Fig. 2. Effect of alginate on insulin-like growth factor binding proteins levels in 3T3-L1 cell-conditioned media. A representative ligand blot of conditioned media. lane 1: control, lane 2: 0.01% alginate, lane 3: 0.1% alginate, lane 4: 0.5% alginate.

IGFBP의 분비는 농도 의존적으로 감소되는 것으로 나타났다. 지방세포는 그 에너지원을 주로 glucose에서 얻는다 (Moustaid et al., 1996). 따라서 본 실험에서는 알긴산이 3T3-L1 세포의 배양액 중에 첨가한 glucose를 이용한 대사 및 triglyceride (TG) 합성과정을 추정하기 위해 배양액을 채취하여 glucose의 세포이용정도 및 세포 내 TG 축적량을 알아보았다. Fig. 4를 보면, 알긴산에

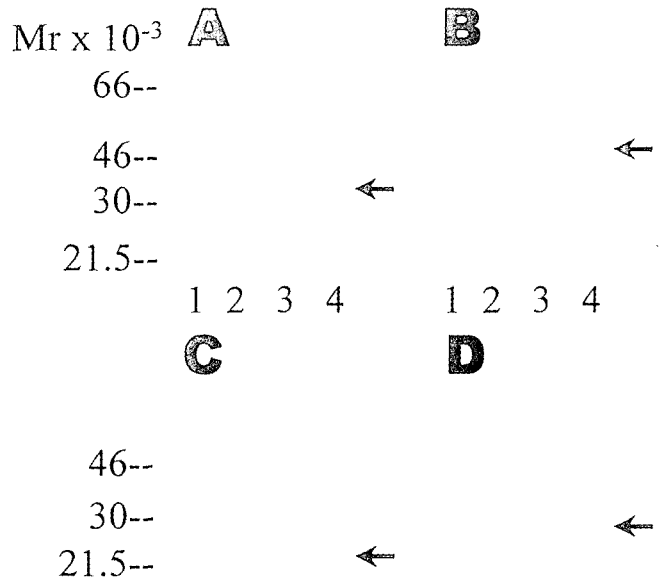


Fig. 3. Effect of alginate on insulin-like growth factor binding proteins levels in 3T3-L1 cell-conditioned media. A representative immunoblot of conditioned media. Confluent cell were treated with 0% (control, lane 1), 0.01% (lane 2), 0.1% (lane 3), 0.5% (lane 4) alginate for 24hrs. (A: IGFBP-2, B: IGFBP-3, C: IGFBP-4, D: IGFBP-5)

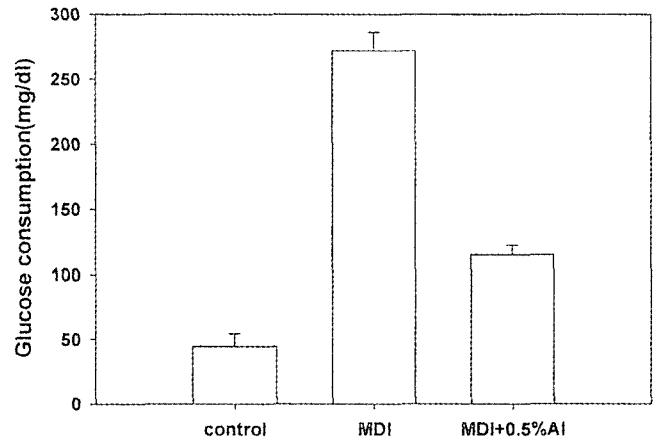


Fig. 4. Glucose consumption of 3T3-L1 cell. 3T3-L1 cell was refed serum free media (SFM, control), 0.5 mM methylisobutylxanthine, 0.25 μ M dexamethasone and 10 μ g/ml insulin containing SFM (MDI), MDI and 0.5% alginate containing SFM (MDI+0.5%Al).

의해 배양액중의 glucose 이용이 매우 억제된 것을 알 수 있다. Moustaid et al. (1996)의 연구 결과에서는 사람의 지방조직에서 추출한 지방세포의 배양액중에 insulin을 첨가하여 세포의 glucose 소비를 살펴보았으며, 그 결과 insulin에 의해 배양액중의 glucose 이용이 insulin 처리군에서 매우 증가된 것으로 나타났다. 본 실험에서는 insulin 단독으로 세포를 처리한 실험을 하지는 않았

나, MDI 처리 시 control군의 glucose 소모량에 비해 약 5배 정도의 증가를 나타내고 있었으므로, 이러한 glucose 이용의 증가는 insulin 첨가가 그 이유인 것으로 생각된다. Insulin 처리 시 알긴산을 함께 첨가하여 glucose 이용정도를 살펴본 실험에서는 알긴산이 insulin의 glucose 이용 촉진 작용을 약 50% 억제하는 것으로 나타났다. 이로써 배양액 중에 첨가한 알긴산이 3T3-L1 세포의 glucose 이용을 억제한다는 사실을 알 수 있었다.

알긴산에 의한 세포 내 TG 축적량 변화를 관찰한 실험에서는 Fig. 5에 나타난 바와 같이 알긴산 첨가에 의해 세포 내 TG 축적량이 감소하는 것으로 나타났다. 이는 그림 4에서의 배양액중의 glucose 이용정도 실험결과에서 예상할 수 있었던 결과이며 이를 더욱 확인하기 위해 glucose로부터 TG로 전환되는 과정에 관여하는 효소인 glycerolphosphate dehydrogenase (GPDH)의 활성을 측정하였다 (Fig. 5). 그 결과는 Fig. 4의 glucose 소모량과 Fig. 5의 TG 축적량 결과와 일치하였으며, 이로써 알긴산은 세포가 배양액중의 glucose를 이용하지 못하도록 이를 억제하여 그 결과 세포 내 TG 축적을 저하시킨다는 것을 알 수 있다.

Insulin과 그 작용이 유사한 IGF-I (100 ng/ml)의 glucose 대사에 미치는 영향에 대한 연구들이 계속되어 왔다 (Zapf et al., 1981; Boney, et al., 1994; Wabitsch, et al., 1995). 분화되지 않은 3T3-L1 세포의 경우, IGF-I receptor 농도가 insulin receptor 농도에 비해 2배 정도 높다. 즉 이 시기에는 IGF-I에 대한 IGF-I receptor의 친화력이 insulin receptor에 비해 더 크다고 할 수 있다. 그러나 세포가 분화되면서 IGF-I receptor의 수나 친화력은 그대로 남아 있는 반면, insulin receptor의 수가 약 25배나 증가된다. 즉, 세포 분화의 결과로 insulin receptor의 수가 증가되는 것이다. Insulin은 분화 이후의 insulin receptor 수의 증가로 insulin에 의한 glucose 산화작용은 지방세포로의 분화 이후에만 영향을 미치며 (Reed, et al., 1977), IGF-I의 adipogenesis 촉진작용은 insulin receptor와 IGF-I receptor를 통해 일어난다고 하였다 (Wabitsch, et al., 1995). 또한 *in vitro*에서 IGF-I이 growth hormone (GH)의 lypolysis를 억제하여 adipogenesis를 촉진한다는 보고도 있었다 (Pairault and Green, 1979). 따라서 본 연구에서는 insulin의 adipogenesis 촉진 작용과 함께 IGF-I에 의한 adipogenesis 촉진작용을 비교 관찰하였다. 실험은 10 µg/ml insulin 첨가 시의 GPDH 활성을 내는 데는 100 ng/ml의 IGF-I이 필요하다고 한 Boney et al. (1994)의 연구 결과를 토대로 실시하였으며, 본 실험결과와 Boney et al.의 실험 결과가 일치하였으므로 100 ng/ml 농도의 IGF-I으로 10 µg/ml의 insulin 작용과 비교하였다. 그 결과, 저농도의 (100 ng/ml) IGF-I으로도 고농도의 (10 µg/ml) insulin과 같은 adipogenesis 효과를

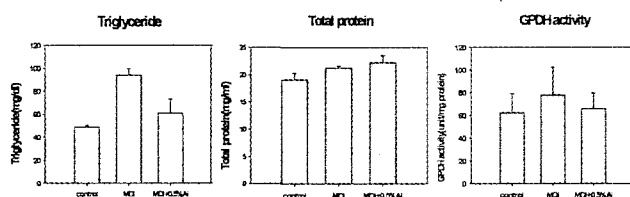


Fig. 5. The effects of alginic acid on adipose conversion.

Table 1. Influence of insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I) and alginate on adipose conversion of 3T3-L1 cells

Sample	GPDH ²⁾ activity (unit/mg protein)
Control	62.2
MDI ¹⁾	77.9
MDI+0.5% AI	65.6
MD+IGF-I	76.7
MD+IGF-I+0.5% AI	70.4

¹⁾ 0.5 mM methylisobutylxanthine, 0.25 µM dexamethasone and 10 µg/ml insulin

²⁾ glycerolphosphate dehydrogenase

나타내었다. 또한 IGF-I의 adipogenesis 촉진작용에 대한 알긴산의 영향을 살펴 보았다. Insulin의 경우, 알긴산에 의해 insulin의 adipogenesis 작용이 억제됨을 GPDH 활성측정결과에서 알 수 있었다. 그러나 IGF-I의 경우, insulin 실험에서와 동일한 농도의 알긴산을 배양액 내로 첨가하였을 때 알긴산에 의해서 IGF-I의 adipogenesis 촉진작용이 억제되긴 하였으나 그 정도가 insulin의 1/2정도로 낮게 나타났다 (Table 1). 즉, 알긴산의 경우 insulin의 adipogenesis 작용에 특이적으로 작용하여 이를 억제하는 것이다. 따라서 본 연구실에서는 알긴산이 IGF-I receptor가 아닌, insulin receptor에 작용하여 insulin-binding을 억제할 것으로 생각되며 이에 관한 더 많은 연구가 있어야 할 것이다.

요 약

알긴산은 3T3-L1 세포의 분화를 억제하였다. 3T3-L1 세포의 분화를 촉진시키는 인자로 밝혀진 IGF-I과 insulin을 이용하여 알긴산의 분화에 미치는 영향을 검토한 결과, 알긴산은 insulin의 분화촉진작용을 특이적으로 억제하였다. 본 연구는 알긴산을 이용하여 알긴산의 지질 감소효과를 세포의 수준에서 검증하고자 하였다. 그 의의가 있으며, 이에 알긴산의 분화억제효과가 일어나는 메카니즘에 관한 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Ailhaud, G., P. Grimaldi and R. Negrel. 1992. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu. Rev. Nutr.*, 12, 207~233.
- Boney, C.M., B.M. Staats, A.D. Stiles and A.J. D'ercole. 1994. Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins during adipogenesis. *endocrinology.*, 135, 1863~1968.
- Choi, J.H., C.H. Rhim, J.Y. Kim, J.S. Yang, J.S. Choi and D.S. Byun. 1986. Basic studies on the development of diet for the treatment of obesity. 1. The inhibitory effect of alginate as a diet fiber on obesity. *J. Kor. Fish. Soc.*, 19(4), 303~311.
- Kang, H.J., M.J. Suh, E.H. Kim and Y.S. Song. 1994. Effects of sodium alginate and cellulose on fasting plasma lipoprotein composition and cholesterol metabolism in rats (I). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 23(6), 879~863.
- Kang, H.J., M.J. Suh and Y.S. Song. 1994. Effects of sodium alginate

- and cellulose on postprandial plasma lipoprotein and cholesterol metabolism in rats (II). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 23(6), 887~893.
- Kim, J.B. and B.M. Spiegelman. 1996. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Gene & Development*, 10, 1096~1107.
- Miller, C.W., D.A. Casimir and J.M. Ntambi. 1996. The mechanism of inhibition of 3T3-L1 preadipocyte differentiation by prostaglandin F_{2a}. *Endocrinology*, 137, 5641 ~5650.
- Moustaid, N., B.H. Jones and J.W. Taylor. 1996. Insulin increases lipogenic enzyme activity in human adipocytes in primary culture. *J. Nutr.*, 126, 865~870.
- Pairault, J. and H. Green. 1979. A study of the adipose conversion of suspended 3T3-L1 cells by using glycerophosphate dehydrogenase as differentiation marker. *Cell Biology*, 76(10), 5138~5142.
- Pascual, M., J. Larrale and A. Martinez. 1995. Insulin-like growth factor I (IGF-I) affects plasma lipid profile and inhibits the lipolytic action of growth hormone (GH) in isolated adipocytes. *Life Science*, 57(12), 1213~1218.
- Peter, M.A., K.H. Winterhalter, M.B. Schnetzler, E.R. Froesch and J. Zapf. 1993. Regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins by growth hormone in rat white adipose tissue. *Endocrinology*, 133, 2624~2631.
- Reed, B.C., S.H. Kaufmann, J.C. Mackall, A.K. Student and M.D. Lane. 1977. Alterations in insulin binding accompanying differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74(11), 4847~4880.
- Rubin, C.S., A. Hirsch, C. Fung and O.M. Rosen. 1978. Development of hormone receptors and hormonal responsiveness *in Vitro*. *The Journal of Biological Chemistry*, 253(20), 7570~7578.
- Ruttf, G.A., A.C. Borthwick and R.M. Denton. 1991. Effects of protein phosphatase inhibitors on the regulation of insulin-sensitive enzymes within rat epididymal fat-pad and cells. *Biochem. J.*, 276, 649~654.
- Smith, P.J., L.S. Wise, R. Berkowitz, C. Wan and C.S. Rubin. 1988. Insulin-like growth factor-I Is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(19), 9402~9408.
- Wabitsch, M., H. Hauner, E. Heinze and W.M. Teller. 1995. The role of growth hormone/insulin-like growth factors in adipocyte differentiation. *Metabolism*, 44(10), 45~49.
- Wise, L.S. and H. Green. 1979. Participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate dehydrogenase in the adipose conversion of 3T3-L1 cells. *J. Bio. Chem.*, 254(2), 273~275.
- Yang, J.L., M.J. Suh and Y.S. Song. 1996. Effects of dietary fibers on cholesterol metabolism in cholesterol-fed rats. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 25(3), 392~398.
- Zapf, T., E. Schoenle, M. Waldvogel, I. Sand and E.R. Froech. 1981. Effect of trypsin treatment of rat adipocytes on biological effects and binding of insulin and insulin-like growth factors. *FEBS*, 605~609.

2000년 9월 25일 접수

2000년 11월 18일 수리