

원저

3T3-L1 지방전구세포의 분화에 미치는 영지약침의 영향

이재우* 윤현민* 강경화**

*동의대학교 한의과대학 침구학교실

**동의대학교 한의과대학 생리학교실

The effects of Ganoderma lucidum herba pharmacopuncture on 3T3-L1 preadipocyte differentiation

Chea-woo Lee*, Hyun-Min Yoon*, Kyung-Hwa Kang**

*Dept. of Acupuncture & Moxibustion College of Oriental Medicine, Dong-Eui University, Busan, 614-054, Republic of Korea

**Department of Oriental Physiology, College of Oriental Medicine, Dongeui University, Busan, 614-054, Republic of Korea

ABSTRACT

Objective	The purpose of this study is to investigate the effects of Ganoderma lucidum herba pharmacopuncture (GHP) on the adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes.
Methods	3T3-L1 preadipocytes were differentiated with adipogenic reagents by incubating for 2 days in the absence or presence of GHP ranging from 1 and 2%. The effect of GHP on cell proliferation of 3T3-L1 preadipocytes was investigated using MTT assay. The effect of GHP on adipogenesis was examined by Oil red O staining and measuring glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) and intracellular triglyceride(TG) content.
Results	Following results were obtained from the preadipocyte proliferation and adipocyte differentiation of 3T3-L1. We observed no effect of GHP on preadipocyte proliferation. GHP inhibited adipogenesis, the activity of GPDH and accumulation of intracellular TG content.
Conclusions	These results suggest that GHP inhibit differentiation of preadipocyte.

Key words

I. 서론

최근 비만의 빈도가 급속히 증가하는 추세에 있어 그 치료와 예방에 대한 중요성이 크게 증가하고 있다. 비만은 당뇨병이나 동맥경화증 등 각종 대사성 질환의 유발률을 증가시키고 사망률을 증가시킬 뿐 아니라 사회적, 정신적으로도 장애를 일으키는 원인인 것이 밝혀지면서 반드시

치료되어야 하는 ‘만성질환’이라는 인식이 확립되고 있다¹⁻⁵⁾.

세계보건기구(WHO)에 따르면, 현재 전 세계적으로 과체중 혹은 비만에 해당되는 사람들의 숫자는 12 억명에 이르며 미국의 경우 2000년 현재 성인 인구의 약 65%가 과체중에 해당된다고 한다⁶⁻⁷⁾. 또한 미국의 경우 매년 약 30만 명이 비만과 관련된 질환으로 사망한다고 보고되고

※ 교신저자 : 강경화, 부산광역시 부산진구 양정 2동 산 45-1 동의대학교 한의과대학 생리학교실

Tel : 051-850-7423, Fax : 051-853-4036, E-mail : ghkang@deu.ac.kr

이 연구는 2007년 대한약침학회 연구사업의 지원을 받아 수행하였음 / Received 2008.8.3, Accepted 2008.8.28

있다⁹⁾. 비만이 여러 가지 질병에 미치는 영향은 매우 심각하여 전 세계 당뇨병 환자의 80%, 심장 질환의 21%가 비만이 원인인 것으로 알려져 있다. 이외에도 자궁암, 신장암, 유방암 등 각종 암도 비만과 직·간접적으로 연관되어 있으며 비만이나 과체중의 경우 수면무호흡증, 골관절염, 담석증 등의 발병률도 정상인보다 높게 나타나는 것으로 알려져 있다⁹⁾.

그러므로 지방세포의 증식과 지방세포에서 분비되는 물질들에 대한 이해와 그 생체 내 조절 메커니즘에 대한 규명이 비만 및 그로 인한 여러 질병들을 이해하고 효과적인 치료제를 개발할 수 있는 밑거름이 될 것으로 여겨지고 있고 이에 따라 지방세포 조절에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

靈芝는 불로초, 만년버섯 등으로 불리우며 甘苦微溫하고 《神農本草經》, 《本草綱目》 등에 그 효능이 기록되어 있는데, 強壯, 鎮靜, 鎮咳, 消腫, 驅瘀血의 효능을 가지고 있으므로 虛勞, 神經衰弱, 心臟病, 動脈硬化症, 高血壓 등의 치료에 응용하였으며, 특히 관상동맥성 심질환의 치료에 응용하여 혈액 중 지방을 낮추는 효과가 임상보고 되었다¹⁰⁾.

영지를 응용한 비만 연구는 영지의 열수 추출액이 고지방식이에 의한 흰쥐의 혈장, 간 및 지방조직의 지질함량과 분변 Steroids에 미치는 영향¹¹⁾, 영지가 알코올 섭취한 흰쥐의 간기능 및 지질대사에 미치는 영향¹²⁾ 등이 있으나 약침에 대한 연구 성과가 미흡한 상태이다. 그러므로 본 연구에서는 영지약침이 지방세포의 분화에 억제효과가 있을 것으로 기대되어 이를 살펴보고자 3T3-L1 preadipocytes를 이용하여 지방세포의 분화와 분해에 미치는 영향을 관찰하였고 본 실험결과를 통해 영지약침이 비만 치료제로 사용될 수 있을지에 대한 근거 자료를 제시하고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 재료

3T3-L1 mouse preadipocytes는 American Type Culture Collection(ATCC, USA)에서 분양받아 사용하였고, Dulbecco's Modified Eagle Media(DMEM), bovine calf serum(BCS), fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin mixture 및 DMSO는 GibcoBRL(USA)로부터 구입하였다. Tetrazolium bromide salt(MTT) 및 dimethylsulfoxide(DMSO)는 Amresco(USA)로부

터 구입하였다. Insulin, isobutylmethylxanthine(IBMx), dexamethasone(DEX), bovine serum albumin(BSA) 등 세포분화 유도에 사용된 시약들은 Sigma(USA)로부터 구입하였다. glycerol-3-phosphate dehydrogenase(GPDH) kit(TAKARA, Japan), TG determination kit(Asan Pharm Co., Ltd., Korea)

2. 영지약침

(*Ganoderma lucidum herba pharmacopuncture*, 이하 GHP)의 준비

靈芝는 자연산 야생 靈芝(Korea)를 사용하였다. 300 g을 증류수로 水洗하여 1 L의 25% ethanol을 가하여 10시간 동안 실온에서 추출하였다. 추출된 용액을 원심분리를 통하여 상청액을 분리하고, 0.2 μ m 여과지에서 여과하여 rotary evaporator로 200 mL가 되도록 減壓濃縮하였다. 실온에서 냉각시킨 뒤 감압필터를 사용하여 불순물을 제거하고 고압멸균하여 -20°C에 보관하였다가 실험직전 DMSO에 희석하여 사용하였다. 최종 DMSO의 농도는 0.01%가 되도록 조절하였다.

3. 세포배양 및 분화

3T3-L1 Preadipocytes는 5% CO₂, 37°C 배양기에서 DMEM(10% FBS, 100 unit/mL of penicillin G sodium, 100 μ g/mL of streptomycin sulfate) 배양하였다. 100% confluent 해졌을 때 0.5 mM IBMx, 1 μ M DEX와 1 μ g/mL insulin의 분화유도물질이 포함된 DMEM으로 교환하여 2일 동안 분화를 유도하였으며, 그 후 매 2일 마다 1 μ g/mL insulin이 포함된 DMEM으로 교환하였다. 분화 10일 후 세포는 분석을 위해 사용되었다. 3T3-L1 Preadipocytes에 0.5 mM IBMx, 1 μ M DEX와 1 μ g/mL insulin을 처리하여 분화를 유도한 것을 대조군으로, 대조군에 영지약침을 분화유도 2일 동안 처리한 것을 시험군으로 하였다.

4. MTT assay

96 well plate(Corning, USA)에 1 × 10⁴ cells/well

의 농도로 세포를 DMEM 배양액에 분주하여 24시간동안 안정화시킨 후, GHP를 농도별(0%, 1% 및 2%)로 처리하여 24 및 48시간동안 반응시켰다. 배양액을 제거 한 후 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 MTT를 각 well에 넣고 잘 섞어 준 후 최대 4시간 37°C incubator에서 배양한 후 tetrazolium bromide salt를 제거하고 각 well에 DMSO를 200 μL 씩 분주하여 생성된 formazin이 잘 녹을 수 있게 충분히 흔들어 모두 녹인 후 ELISA(Molecular Devices, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 3회의 측정으로 그에 대한 평균값과 표준 오차를 구하였다. 세포 증식률은 대조군에 대한 세포증식률로 나타내었다.

$$\text{Cell proliferation(\%)} = \text{OD}_{540\text{nm}}(\text{GHP}) / \text{OD}_{540\text{nm}}(\text{control}) \times 100$$

5. Oil red O 염색 및 정량

세포내 지방구 생성을 확인하기 위하여 Oil red O 염색을 실시하였다. 배양된 세포는 phosphate-buffered saline(PBS)로 세척한 후 3.7% formalin으로 10분간 고정하고 deionized water로 세척하여 Oil red O를 처리한 후 실온에서 30분간 염색하였다. 그 후 염색액을 제거하고 deionized water로 3회 세척하여 염색된 세포를 microscopic image(Olympus, Tokyo, Japan)로 관찰하였다. 또한 정량을 위해 DMSO를 가하여 지방을 추출한 후 ELISA(Molecular Devices, USA)를 사용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase(GPDH) activity

세포는 PBS로 3번 세척한 후 lysis buffer를 첨가하여 4°C에서 30초간 sonication 한 후 원심분리(10,000 rpm, 20 min, 4°C)하여 상청액을 분리하였다. 상청액내의 GPDH 활성은 Wise와 Green의 방법¹³⁾에 따라 340 nm에서의 흡광도 변화를 측정하였다. GPDH 활성은 units/min/mg protein으로 표시하며, 1 unit 활성은 분당 1 mmol의 NADH 산화와 동등한 값을 나타낸다. 단백질 함량은 BSA를 표준시약으로 사용하여 Bradford 방법¹⁴⁾에 따라 측정하였다

7. Triglyceride(TG) 정량

세포내 TG의 정량은 TG determination kit(Asan Pharm Co., Ltd., Korea)를 사용하여 효소법으로 실시하였다. 세포는 PBS로 3번 세척한 후 lysis buffer(1% Triton X-100 in PBS)를 첨가하여 4°C에서 30초간 sonication 한 후 원심분리(10,000 rpm, 20 min, 4°C)하여 상청액을 분리하였다. 상청액 20 μL 에 3 mL의 효소용액을 첨가하여 37°C에서 10분 동안 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질 함량은 BSA를 표준시약으로 사용하여 Bradford 방법¹⁴⁾에 따라 측정하였다

8. 통계분석

통계분석은 SPSS 12.0K for Windows 통계 프로그램 패키지를 사용하여 평균치±표준오차로 나타내었고 유의수준은 P<0.05로 하였다. 각 실험군 간의 통계학적 분석은 one way-ANOVA와 Scheffe test 검정을 실시하였다.

III. 실험결과

1. Cell proliferation에 미치는 영향

영지약침의 세포증식에 대한 영향을 알아보기 위해 3T3-L1 preadipocytes에 1과 2 %의 영지약침을 24시간과 48시간동안 처리하였다. 그 결과 1% 영지약침 24시간 처리는 112.4 ± 6.9%, 48시간 처리는 114.1 ± 6.5%의 세포증식을 나타내었으며, 2% 영지약침 24시간 처리는 116.8 ± 4.5%, 48 시간 처리는 121.0 ± 5.6%의 세포증식을 나타내어 영지약침의 농도와 처리시간에 따라 대조군에 비해 세포의 증식이 저해되지 않았음을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과로 2%까지의 영지약침이 3T3-L1 preadipocytes에 독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다 (Fig.1).

2. 지방세포의 분화에 미치는 영향

3T3-L1 Preadipocytes를 배양하여 분화를 유도한 결

과 배양 10일째에 성숙된 지방세포(adipocytes)가 형성됨을 알 수 있었다. 지방세포의 형성을 확인하기 위하여 Oil red O를 이용하여 세포 염색을 시행하여 지방세포의 형태를 현미경으로 관찰하고 지방세포의 양을 정량하였다. Oil red O로 염색된 세포를 관찰한 결과 대조군에 비해 영지약침 1%와 2%의 농도에서 지방세포의 형성이 억제되어 있는 것으로 관찰되었다. 또한 지방세포의 양을 정량한 결과 분화를 유도하지 않은 3T3-L1세포에서 흡광도는 0.47 ± 0.02 로 나타났으며, 대조군에서 흡광도는 2.22 ± 0.02 로 나타났다. 영지약침의 첨가 농도에 따른 흡광도는 1%농도에서 2.00 ± 0.04 과 2% 농도에서 1.96 ± 0.02 으로 지방분화를 유의하게 억제하였다(Fig. 2).

3. GPDH activity에 미치는 영향

영지약침이 3T3-L1 preadipocytes에서 지방세포(adipocytes)로의 분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 GPDH 활성을 측정하였다. 그 결과 분화를 유도하지 않은 3T3-L1세포에서 GPDH활성은 0.04 ± 0.00 units/min/mg protein으로 나타났으며, 대조군에서 GPDH활성은 0.47 ± 0.01 units/min/mg protein으로 나타났다. 영지약침의 첨가 농도에 따른 GPDH 활성은 1% 농도에서 0.35 ± 0.02 units/min/mg protein과 2% 농도에서 0.31 ± 0.02 units/min/mg protein으로 지방합성을 유의하게 억제하였다(Fig. 3).

4. TG 함량에 미치는 영향

영지약침이 3T3-L1 지방세포내 TG 축적에 미치는 영향을 알아보기 위하여 TG 함량을 측정하였다. 그 결과 분화를 유도하지 않은 3T3-L1 preadipocytes에서 TG 함량은 45.7 ± 13.3 $\mu\text{g}/\text{mg protein}$ 으로 나타났으며, 대조군에서 TG 함량은 437.7 ± 52.2 $\mu\text{g}/\text{mg protein}$ 으로 나타났다. 영지약침의 첨가 농도에 따른 TG 함량은 1%농도에서 41.7 ± 17.4 $\mu\text{g}/\text{mg protein}$ 과 2% 농도에서 52.3 ± 23.4 $\mu\text{g}/\text{mg protein}$ 으로 세포내 중성지방의 축적을 유의하게 억제하였다(Fig. 4).

IV. 고찰

비만은 열량의 섭취와 소비의 불균형으로 발생하는 대사성 질환이며, 지방조직의 증가 상태로 정의 된다¹⁵⁾. 과거에 지방세포는 단순히 열량을 과다 섭취했을 때 잉여 에너지를 triglyceride의 형태로 저장하는 기관으로 인식되어 왔으나 최근에는 지방조직이 지방을 저장하여 필요에 따라 다른 기관에 에너지를 공급하는 역할을 담당하고 있을 뿐만 아니라 내분비 역할을 담당하여 체내의 에너지 항상성을 조절하는데 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다¹⁶⁾. 따라서 지방세포의 증식과 지방세포에서 분비되는 물질들에 대한 이해와 그 생체 내 조절 메커니즘에 대한 규명이 비만 및 그로 인한 여러 질병들을 이해하고 효과적인 치료제를 개발할 수 있는 밑거름이 될 것으로 여겨지고 있으며 이에 따라 지방세포 조절에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

최근 비만과 관련한 연구¹⁷⁻²³⁾가 활발히 진행되고 있으며, 비만에 관한 약침연구로는 창출 및 의이인 약침²⁴⁾, 황금약침²⁵⁾, 산사약침²¹⁾, 나복자약침²²⁾, 웅담과 우황약침²³⁾ 등 다양한 약침의 비만이나 지방세포 분화에 대한 연구가 보고되어 있다.

靈芝는 혈장콜레스테롤과 인지질 수치를 저하시켜 동맥벽의 동맥경화증을 방지하는 것으로 알려져 있으며 심근 수축력과 수축기 용량을 증가시키고 심기능을 개선시키는 것으로 알려져 있다²⁶⁾. 그러나 임상에서 항콜레스테롤제로 널리 응용되고 있으나, 아직까지 유효성이나 약리기전이 밝혀져 있지 않다. 영지와 관련한 연구는 영지의 열수 추출액이 고지방식이에 의한 흰쥐의 혈장, 간 및 지방조직의 지질함량과 분변 Steroids에 미치는 영향¹¹⁾, 영지가 알코올 섭취한 흰쥐의 간기능 및 지질대사에 미치는 영향¹²⁾ 등이 있으나 약침에 대한 연구성고가 미흡한 상태이다. 그러므로 본 연구에서는 영지약침이 지방세포의 분화에 억제 효과가 있을 것으로 기대되어 이를 살펴보고자 3T3-L1 preadipocytes를 이용하여 지방세포의 분화와 분해에 미치는 영향을 관찰하였다.

3T3-L1 Preadipocytes에서 영지약침의 세포증식에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 1%와 2%의 영지약침 농도를 24h과 48h동안 처리한 후 MTT assay를 실시하였다.

그 결과 영지약침의 농도와 처리시간에 따라 control에 비해 세포의 증식이 저해되지 않았음을 확인할 수 있었으며, 이와 같은 결과로 2%까지의 영지약침이 3T3-L1

preadipocytes에 독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다 (Fig.1).

3T3-L1 Preadipocytes에서 성숙된 지방세포로의 분화를 유도하여 Oil red O 염색을 실시하여 지방세포의 형성을 확인하였으며, 3T3-L1 preadipocytes에서 지방세포로 분화 유도되는 과정에서 1%와 2% 영지약침 농도를 처리한 후 농도별로 지방세포의 분화에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과 control 에 비해 영지약침 1%와 2%의 농도에서 지방세포의 형성이 억제되어 있는 것으로 관찰되었고 지방세포의 양을 정량한 결과 영지약침의 첨가 농도에 따른 지방분화 억제가 유의하게 관찰되었다(Fig. 2).

GPDH는 지방세포의 형성에 관여하여 중성지방의 합성에 중요한 효소로 영지약침이 3T3-L1 preadipocytes에서 성숙된 지방세포로의 분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 GPDH 활성을 측정하였다. 그 결과 control 에 비해 영지약침 1%와 2%의 농도에서 지방합성을 유의하게 억제하는 것으로 관찰되었다(Fig. 3).

영지약침이 3T3-L1 지방세포내 TG 축적에 미치는 영향을 알아보기 위하여 TG 함량을 측정하였다. 그 결과 control 에 비해 영지약침 1%와 2%의 농도에서 세포내 중성지방의 축적을 유의하게 억제하는 것으로 관찰되었다 (Fig. 4).

이상의 결과를 바탕으로 영지약침이 GPDH 활성의 억제를 통하여 지방세포 분화억제효과를 나타내는 것으로 추정되고 세포내 지방축적에 억제효과를 보여 비만치료에 유효할 것으로 사료된다.

V. 참고 문헌

- Manson JE, Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Hunter DJ, Hankinson SE, Hennekens CH, Speizer FE: Body weight and mortality among women. *N Engl J Med.* 333:677-685, 1995
- Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP: Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation* 67:968-977, 1983
- Pi-Sunyer FX: Medical hazard of obesity. *Ann Intern Med.* 119:655-660, 1993
- Huang Z, Willett WC, Manson JE, Rosner B, Stampfer MJ, Speizer FE, Colditz GA: Body weight, weight change, and risk for hypertension in women. *Ann Intern Med.* 128:81-88, 1998
- Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, Manson JE, Hennekens CH, Arky RA, Speizer FE: Weight as a risk factor for clinical diabetes in women. *Am J Epidemiol* 132:501-513, 1990
- World Health organization. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. Report of a WHO Consultation on Obesity, 3-5 Jun 1997
- Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Johnson CL: Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. *JAMA* 288:1723-7, 2002
- Allison DB, Fontaine KR, Manson JE, Stevens J, VanItallie TB: Annual Deaths Attributable to Obesity in the United States. *JAMA* 282:1530-1538, 1999
- Stein CJ, Colditz GA: The epidemic of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2522-2525, 2004
- 김창민 외. 중약대사전. 서울. 정담. 3009-3012, 1999
- 배만중, 성태수, 손규목, 영지의 열수 추출액이 고지방식이에 의한 흰쥐의 혈장, 간 및 지방조직의 지질 함량과 분변 Steroids 에 미치는 영향, *한국식품영양학회지*, 9(1):76-84, 1996
- 이준호, 영지가 알코올 섭취한 흰쥐의 간기능 및 지질대사에 미치는 영향, *한국영양학회지*, 32(5):519-525, 1999
- Wise, L.S. and Green, H. Participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate dehydrogenase in the adipose conversion of 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 254:273-275, 1979
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254, 1976.
- Spiegelman BM, Flier JS. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell.* 87(3):377-89. 1996, Review.
- Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 11(8):327-32. 2000. Review.
- 진철용, 변부형, 박지하, 이은숙, 최해운, 이병욱, 서부일.

- 길경이 고지방식으로 유발된 비만흰쥐의 체중및 혈청 중지질성분의 변화에 미치는 영향. 대한본초학회지. 17(2):19-28, 2002.
18. 김봉현, 서부일, 이은숙, 김미려, 신순식. 지각과 도인이 고지방식으로 유발된 비만흰쥐에 미치는 영향. 대한본초학회지. 18(3):69-78, 2003.
 19. 박지하, 서부일, 이은숙, 백정한, 서해경, 구덕모, 김종대. 체감대보탕이 고지방식으로 유발한 비만 흰쥐에 미치는 영향. 한약응용학회지. 1(1):110-134, 2001.
 20. 정선희, 남상수, 김용석, 이재동, 고흥균, 안병철, 박동석, 강성길, 김창환, 이운호. 비만환자의 전침치료 임상례. 대한침구학회지. 16(3):39-56, 1999.
 21. 정영표, 윤여충, 윤대환. 위수의 산사 약침이 고지방 식으로 유발된 비만백서에 미치는 영향. 대한침구학회지. 24(4):55-68, 2007.
 22. 강수우, 위통순, 윤대환. 비수에 대한 나복자 약침이 고지방 식으로 유발된 비만 백서에 미치는 영향. 대한침구학회지. 24(5):113-125, 2007.
 23. 조희철, 이시형, 신조영, 김강산, 조남근, 권기록, 임태진. 웅담과 우황약침이 지방세포 대사에 미치는 영향. 대한침구학회지. 24(4):125-142, 2007.
 24. 주준성, 윤대환, 나창수, 조명래, 채우석, 풍릉, 음릉 천에 대한 약침(창술, 의이인)이 고지방식으로 유발된 비만백서에 미치는 영향, 대한침구학회지, 21(2):131-153, 2004
 25. 김호경, 강은정, 고병섭, 다양한 황금약침제제가 전 지방세포 3T3-L1의 증식에 미치는 영향, 大韓韓醫學會誌, 19(1):358-367, 1998
 26. 김형균 외 편역, 한약의 약리, 서울, 고려의학, 109-110, 2000

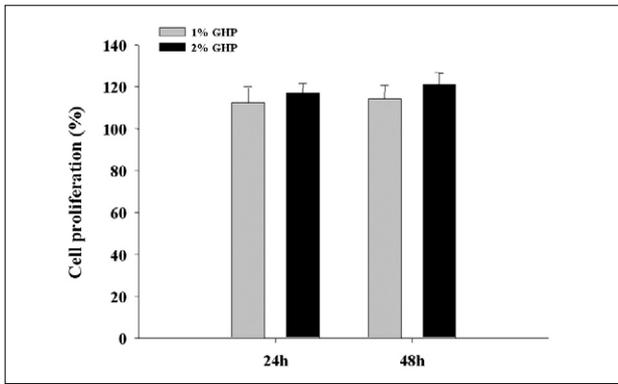


Fig. 1. Effect of GHP on 3T3-L1 preadipocytes proliferation. Preconfluent 3T3-L1 preadipocytes were treated with 1 and 2% GHP for 24 and 48 hours. Cells treated with 0.01% DMSO were used as controls. 3T3-L1 preadipocytes proliferation was measured by MTT assay method.

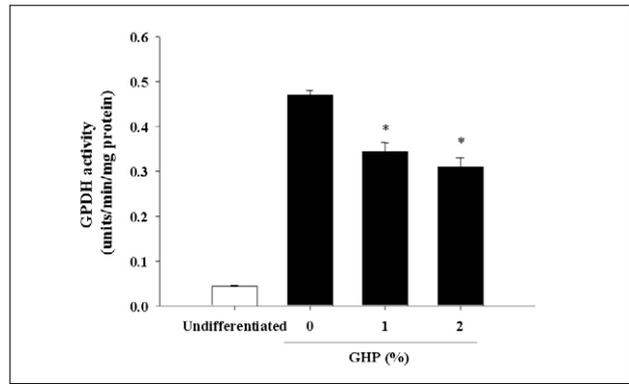


Fig. 3. Effect of GHP on GPDH activity in 3T3-L1 adipocytes. Two-day postconfluent 3T3-L1 preadipocytes(day 0) were treated with 1 and 2% GHP for 2 days. Cells treated with 0.01% DMSO were used as controls. The assay were performed on fully differentiated adipocytes(day 10). Values are means \pm SD. * $p < 0.05$ vs. control.

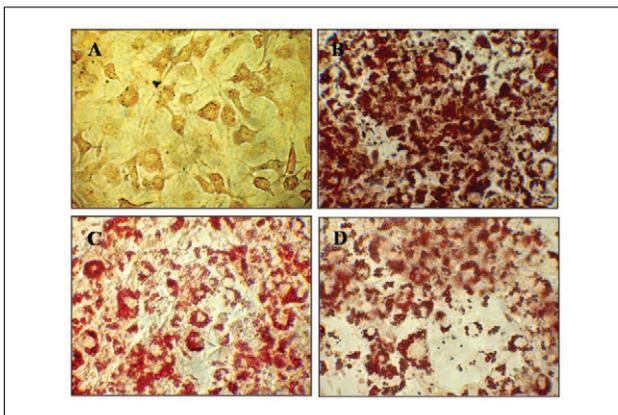
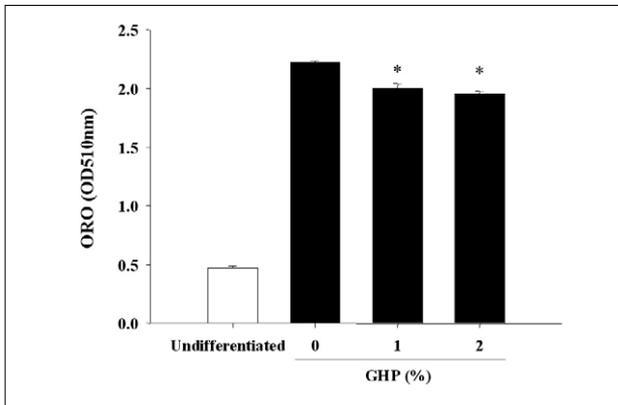


Fig. 2. Effect of GHP on Oil red O stained material in 3T3-L1 adipocytes. Two-day postconfluent 3T3-L1 preadipocytes(day 0) were treated with 1 and 2% GHP for 2 days. Cells treated with 0.01% DMSO were used as controls. The assay were performed on fully differentiated adipocytes(day 10). Intracellular lipid was stained with Oil red O. Values are means \pm SD. * $p < 0.05$ vs. control.
 A: Undifferentiated cell X 20
 B: Differentiated cell was treated with 0.01% DMSO
 C: Differentiated cell was treated with 1% GL
 D: Differentiated cell was treated with 2% GL

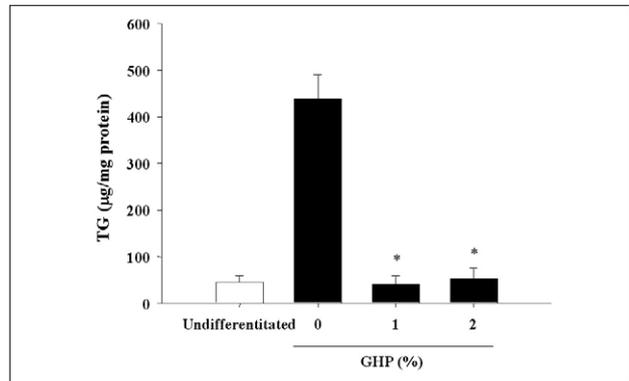


Fig. 4. Effect of GHP on intracellular TG contents in 3T3-L1 adipocytes. Two-day postconfluent 3T3-L1 preadipocytes(day 0) were treated with 1 and 2% GHP for 2 days. Cells treated with 0.01% DMSO were used as controls. The assay were performed on fully differentiated adipocytes(day 10). Values are means \pm SD. * $p < 0.05$ vs. control.