

# 지방세포 분화중인 3T3-L1 세포에서 영지추출물에 의한 지방관련 유전자와 전사인자의 발현 조절

이재우\* 윤현민\* 강경화\*\*

\* 동의대학교 한의과대학 침구학교실

\*\* 동의대학교 한의과대학 생리학교실

Received : 09. 04. 29

Accepted : 09. 05. 19

**Key Words:**

*Ganoderma lucidum* (GL), adipocytes, differentiation, energy expenditure

## Adipocyte-Related Genes and Transcription Factors were affected by *Ganoderma lucidum* during 3T3-L1 Differentiation

Chae-Woo Lee\*, Hyun-Min Yoon\*, Kyung-Hwa Kang\*\*

\*Dept. of Acupuncture &amp; 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**

In this study, the effects of *Ganoderma lucidum* (GL) on fat metabolism were performed in 3T3-L1 adipocytes.

The effects of GL on 3T3-L1 preadipocytes differentiation were also examined. Our results showed that GL decreased the TG content by ORO staining. To elucidate the mechanism of the effects of GL on lowering TG content in 3T3-L1 adipocytes, we examined whether GL modulate the expressions of transcription factors and adipokines related to control of energy expenditure process because adipokines regulate adipocyte mass and increased expenditure may consume much TG in adipocytes.

As a result, the expression of *C/EBPβ*, *C/EBPδ*, *C/EBPα*, and *PPARγ*, genes, which induce the adipose differentiation and adipose-specific *FAS*, *aP2*, and *adipsin* genes, which compose fat formation were decreased. In addition, GL increased the expression of *leptin*, *UCP2*, *adiponectin* in 3T3-L1 adipocytes, resulting in energy homeostasis.

In conclusion, GL could regulate transcript factor related to induction of adipose differentiation and control TG content by up-regulation of adipokines related to fat burn.

**I. 서론**

비만은 직접적 또는 간접적인 원인으로 다양한 만성질환과 관련되어 있으며, 매년 비만으로 인한 경제적 부담과 사망률이 증가하고 있다<sup>1)</sup>. 비만은 열량의 섭취와 소비의 불균형으로 발생하는 대사성 질환으로, 지방조직의 증가 상태로 정의되나, 그 원인은 유전적, 환경적, 식습관, 건강 상태 등 다양한 원인이 복합적으로 작용하고 있다<sup>2)</sup>. 지방조직은 우리 몸의 주 에너지원인 지방을 합성하고 저장하

며 이를 분해하여 필요에 따라 다른 기관에 에너지를 공급하는 역할을 담당하고 있을 뿐만 아니라 다양한 호르몬, 사이토카인, 성장요소 등을 분비하는 내분비기관으로서의 역할을 담당하여 체내의 에너지 항상성을 조절하는데 있어 중추적인 기능을 담당하는 것으로 알려져 있다<sup>3)</sup>. 따라서 지방세포의 증식과 지방세포에서 분비되는 물질들에 대한 이해와 그 생체 내 조절 기전에 대한 규명이 비만 및

※ Corresponding author : Kyung-Hwa Kang, Dong-Eui Univ. Department of Oriental Physiology, College of Oriental Medicine, Dongeui University, San 45-1, Yangjung 2-Dong, Busanjin -Gu Busan, Korea, 614-710, Tel : (82)51-850-7423 Fax : (82)51-853-4036, E-mail : ghkang@deu.ac.kr

\* This research was supported by KPI(Korea Pharmacopuncture Institute) in 2007.

그로 인한 여러 질병을 이해하고 효과적인 치료제를 개발할 수 있는 근거가 될 것으로 여겨지고 있으며 이에 따라 지방세포 조절에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 현재 FDA의 승인을 받아 시판되고 있는 식욕억제제와 지방의 소화흡수억제제의 경우, 기름변이나 복부 팽만감, 어지러움, 구갈, 변비, 혈압상승 등의 부작용을 동반하는 것으로 알려져 있다<sup>4, 5)</sup>. 이에 따라 생체에 부작용이 적고 안전도가 높은 천연물을 이용한 치료제 및 기능성 소재 개발이 더 절실하고 활발히 진행되고 있다<sup>6)</sup>.

영지(靈芝)는 중국, 한국, 일본을 중심으로 생산되고 있으며, 『본초강목』에서 청지, 적지, 황지, 백지, 흑지, 자지의 6종으로 대별하고 있으며 "久食輕身不老 延年神仙"이라 기재하고 있는 不老長壽의 靈藥으로 여기고 있으며 이노, 보간, 강장, 정신안정, 관절염 및 기관지염 등에 효과가 있다고 언급되어 있다<sup>7)</sup>. 많은 연구자들에 의해 영지의 성분 분석과 약리 활성이 보고되고 있는데, 영지 성분 중 polysaccharide 등의 고분자물질과 triterpene 등의 저분자 물질이 다양한 약리활성을 나타내고 있는 것으로 주목받고 있으며, 항염·항알러지<sup>8)</sup>, 혈압강하<sup>9)</sup>, 고지혈증 개선<sup>10)</sup>, 혈당강하<sup>11)</sup>, 면역<sup>12)</sup>, 항종양<sup>13)</sup> 등의 효과가 보고되었다.

약침요법은 현재 임상에서 질병에 대한 정확한 경락, 경혈과 약물을 선택하여 한의학적 치료방법인 침의효과와 한약의 효과가 동시에 나타나게 함으로써 적은 양의 약물 처치로 우수한 치료효과를 나타내고 있으며 각종 질환에 광범위하게 응용되고 있다<sup>14)</sup>. 저자의 선행연구에서 임상에서 활용되고 있는 영지약침의 비만조절에 응용가능성과 근거를 제시하기도 하였다<sup>15)</sup>.

이에 본 연구에서는 영지추출물의 지방세포의 분화와 증식기전 조절효과와 지방세포에서 분비되는 물질에 대한 조절 효과를 알아보고자 3T3-L1 지방전구세포를 이용하여 실험하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 재료

3T3-L 1 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. Insulin,

Isobutylmethylxanthine(IBMX), Dexamethasone (DEX), bovine serum albumin (BSA) 등 세포분화 유도에 사용된 시약들은 Sigma (USA)로부터 구입하였다.

### 2. 영지 추출물 (Ganoderma lucidum, 이하 GL)의 준비

靈芝는 자연산 야생 靈芝 (Korea)를 사용하였다. 300g을 증류수로 水洗하여 1 L의 25% ethanol을 가하여 10시간 동안 실온에서 추출하였다. 추출된 용액을 원심분리를 통하여 상층액을 분리하고, 0.2 $\mu$ m 여과지에서 여과하여 rotary evaporator로 200ml이 되도록 減壓濃縮하였다. 실온에서 냉각시킨 뒤 감압필터를 사용하여 불순물을 제거하고 고압멸균하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다가 실험직전 사용하였다.

### 3. 세포배양 및 분화

3T3-L1 Preadipocytes는 5% CO<sub>2</sub>, 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 DMEM (10% FBS, 100 unit/ml of penicillin G sodium, 100  $\mu$ g/ml of streptomycin sulfate) 배양하였다. 100% confluent 해졌을 때 0.5mM IBMX, 1 $\mu$ M DEX와 1 $\mu$ g/ml insulin의 분화유도물질(MDI)이 포함된 DMEM으로 교환하여 3일 동안 분화를 유도하였으며, 그 후 매 2일 마다 1 $\mu$ g/ml insulin이 포함된 DMEM으로 교환하였다. 분화 4일째와 9일째 세포는 분석을 위해 사용되었다. 3T3-L1 Preadipocytes에 0.5mM IBMX, 1 $\mu$ M DEX와 1 $\mu$ g/ml insulin을 처리하여 분화를 유도한 것을 대조군으로, 대조군에 1%, 2% 및 3%의 영지약침을 분화유도 3일 동안 처리한 것을 실험군으로 하였다.

### 4. 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 추출

한 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 5. RNA 분리

Cell에 TRizol을 넣고 2분간 방치하였다가 세포를 떼어낸 후 chloroform을 넣고 10초간 강하게 vortexing하고 4℃ 14,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리 후, 상층액을 취하여 동량의 isopropanol을 혼합하여 흔들어서 준 후 실온에 10분간 방치하였다. 그 후 4℃ 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 75% ethanol을 넣고 섞어 준 후 4℃ 7,500 rpm에서 5분간 원심분리하였다. RNA pellet은 10분간 실온에서 건조시키고 DEPC (diethyl pyrocarbonate)-DW에 녹여 260nm에서 흡광도를 측정하여 RNA 농도를 계산하였다.

### 6. RT-PCR

각 1 $\mu$ g의 RNA를 취하여 RT-PCR kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 45℃에서 30분, 94℃에서 5분간 반응시킨 후 94℃에서 30초간 denaturation시키고, 55 ~ 62℃에서 30초간 annealing시킨 다음, 72℃에서 1분간 extension시키는 cycle을 30~35회 반복한 뒤, 마지막 extension은 72℃에서 5분간 PCR machine (GeneAmp, PCR system 9700, USA)에서 수행하였다. 각 PCR products는 0.5 $\times$ TBE buffer (45 mM Tris-borate, 1mM EDTA)를 사용하여 2% agarose gel에 loading하여 100V 조건에서 30분간 전기영동한 후 etidium bromide 염색을 한 후 분석하였다. 각각의 primer는 Bioneer (Bioneer Co., Korea)에 의뢰하여 합성하였다 (Table 1).

### 7. 통계분석

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

## III. 실험결과

### 1. 지방분화 초기 단계에 미치는 영향

영지추출물이 3T3-L1 전구지방세포의 분화 과정에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 전구지방세포가 confluent되었을 때 (0 day), MDI를 처리한 대조군에 영지추출물을 1%, 2%와 3%의 농도로 처리하여 3일 동안 분화를 유도한 후 날짜 경과에 따른 분화 양상을 현미경으로 관찰하였으며 4일째와 9일째 세포를 Oil red O로 염색하여 현미경으로 관찰한 후 지질량을 정량하였다. MDI를 첨가하지 않은 정상군에서는 느린 속도로 분화가 진행되는 것에 비하여 MDI를 첨가한 대조군에서는 날짜 경과에 비례하여 지질량이 증가하였으며 4일째 이후 지방구가 관찰되었고 9일째에는 90% 이상이 분화되었다 (Figure. 1). Oil red O염색법에 의해 분화 4일째와 9일째 지질량을 정량해 본 결과 MDI를 처리하지 않은 정상군의 값은  $0.37 \pm 0.01$ 과  $0.37 \pm 0.03$ 이었으며, MDI를 처리하여 분화시킨 대조군은  $0.55 \pm 0.04$ 와  $0.97 \pm 0.05$ 로 나타난 반면, 1%의 영지추출물을 MDI와 동시 처리한 군은  $0.50 \pm 0.02$ 와  $0.86 \pm 0.04$ , 2%의 영지추출물을 MDI와 동시 처리한 군은  $0.46 \pm 0.01$ 와  $0.77 \pm 0.07$ , 3%의 영지추출물을 MDI와 동시 처리한 군은  $0.41 \pm 0.03$ 과  $0.54 \pm 0.04$ 로 나타나 대조군에 비하여 지질량이 유의성있게 감소되었다 (Figure. 2).

### 2. 지방분화 관련 전사인자 발현에 미치는 영향

영지추출물이 3T3-L1 adipocytes의 분화조절인자들 중 전사인자들의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MDI를 처리하지 않은 정상군과 MDI를 처리한 대조군에 각각 1%, 2% 및 3%의 영지추출물을 처리하여 분화시킨 후 4일째와 9일째 각 전사인자의 발현 정도를 측정하였다.

지방전구세포는 적당한 분화 자극과 C/EBP $\beta$ 와 C/EBP $\delta$ 의 발현에 의해 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 발현을 유도하고 분화를 진행한다고 알려져 있다. C/EBP $\beta$ 와 C/EBP $\delta$ 의 발현 양상을 살펴보면 C/EBP $\beta$  mRNA의 경우 분화 4일째와 9일째 대조군은 정상군에 비하여 발현이 증가하였고 영지추출물 처리군은 대조군에 비해 농도에 의존적으로 발현 감소를 보였다. C/EBP $\delta$  mRNA의 경우 분화 4일째 대조군은 정상군에 비해 발현 증가가 보이지 않았으나 영지추출물 처리군은 농도에 의존적으로 발현 감소를 보였으며 분화 9일째 대조군은 정상군에 비해 발

현증가를 보였고 영지추출물 처리군은 농도의존적으로 발현 감소를 보였다 (Figure 3A). C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 의 전체적인 발현 양상을 살펴보면 C/EBP $\alpha$  mRNA의 경우 대조군은 분화 4일째와 9일째 정상군에 비하여 현저히 발현이 증가하였고 영지추출물 처리군은 농도에 의존적으로 발현 감소를 보였다. PPAR $\gamma$  mRNA의 경우 분화 4일째 대조군은 정상군에 비해 발현이 증가하였고 영지추출물 처리군에서 약간 감소하였으나 대조군에 비해 발현 차이가 크지 않았으며, 분화 9일째 대조군은 정상군에 비해 발현이 증가하였고 농도에 비례하여 발현 감소를 보였으며 특히 3% 영지추출물 처리군에서 대조군에 비해 현저한 발현 감소를 보였다 (Figure 3B).

### 3. 지방합성 유전자 발현에 미치는 영향

영지추출물이 3T3-L1 adipocytes의 지방합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MDI를 처리하지 않은 정상군과 MDI를 처리한 대조군에 각각 1%, 2% 및 3%의 영지추출물을 처리하여 분화시킨 후 4일째와 9일째 지방합성 효소인 fatty acid synthase (FAS) mRNA와 지방세포 특이적인 fatty acid binding protein인 aP2와 adipsin mRNA의 발현 정도를 측정하였다. FAS mRNA와 aP2 mRNA의 경우 분화 4일째 정상군과 대조군과 영지추출물 처리군 모두에서 발현에 차이가 보이지 않았고, 분화 9일째는 2%와 3%의 영지추출물 처리군에서 대조군에 비해 발현이 점차 감소하는 것을 보였다. 반면 adipsin mRNA는 분화 4일째와 9일째 대조군은 정상군에 비해 현저한 발현 증가를 보였고 영지추출물 처리군은 농도 의존적으로 발현 감소를 보였다 (Figure 4).

### 4. 에너지 소비 관여 유전자의 발현에 미치는 영향

영지추출물이 3T3-L1 adipocytes에서 발현되어 에너지 대사를 조절한다고 알려진 adipokines의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MDI를 처리하지 않은 정상군과 MDI를 처리한 대조군에 각각 1%, 2% 및 3%의 영지추출물을 처리하여 분화시킨 후 4일째와 9일째 leptin, UCP2, 및 adiponectin 등의 adipokines 발현 정도를 측정하였다. Leptin mRNA의 경우 분화 4일째 정상군과 대조군과 영지추출물 처리군 모두에서 발현되지 않았고, 분화 9일째는 정상군에 비해 대조군에서 약간 증가를 보였고 1%와 2%의 영지추출물 처리군에서 대조군에

비해 발현이 증가하는 것을 보였다(Figure 5). 그러나 3%의 영지추출물 처리군에서 leptin 발현이 거의 되지 않은 것은 더 연구가 필요하다고 생각된다. 에너지 소비 단백질인 UCP mRNA의 경우 분화 4일째와 9일째 정상군에 비해 대조군에서 발현 증가를 보였으며, 영지추출물 처리군에서 대조군에 비해 발현 증가를 보였다(Figure 5). Adiponectin mRNA의 경우 분화 4일째와 9일째 정상군에 비해 대조군에서 발현 증가를 보였으며, 영지추출물 처리군에서 대조군에 비해 발현 현상의 차이를 보이지 않았다(Figure 5).

## IV. 고찰

최근 대사질환 합병증이 동반된 비만이 증가함에 따라 식욕억제로 인한 체중 감소뿐 아니라 대사 변화를 함께 조절하는 항비만 효과는 높고, 부작용이 적은 새로운 작용 기전을 가진 약물의 개발이 절실히 요구되어지고 있다. 또한 지방조직이 단순히 에너지를 저장하는 수동적인 조직이 아니라 다양한 호르몬과 성장 인자, 사이토카인 등을 분비하는 내분비 기관으로 인식되어짐에 따라 지방세포에서 분비되는 물질과 지방세포의 전사조절인자를 조절하는 방법을 통해 비만을 치료하려는 연구가 진행되고 있다.

본 연구는 이러한 차원에서 영지추출물이 지방세포의 분화과정 및 지방세포 산물들을 조절하는지 알아보고자 하였다. 본 실험에서 사용한 3T3-L1 세포주는 분화된 3T3-L1 adipocytes가 in vivo adipocytes의 생화학적 형태학적 성질들과 사실상 동일하다는 보고<sup>16)</sup>에 따라 지방 대사를 연구하는데 적절하다고 판단되어 3T3-L1 전구 지방 세포를 분화시켜 사용하였다.

인간 및 포유동물의 지방조직은 백색지방조직과 갈색지방조직이라는 기능적으로 서로 다른 두 종류의 지방조직으로 나뉘며 이들의 주기능은 각각 에너지 저장과 에너지 소모이다<sup>17)</sup>.

백색지방조직은 전신에 넓게 분포하며 에너지를 Triglycerol (TG)의 형태로 저장하였다가 필요에 따라서 지방산으로 전신에 재공급하는 역할을 하는 곳으로 다른 조직과는 다르게 지방세포에서는 음식물 섭취 등 환경적인 요인에 의해 그 크기가 변하기 때문에 지방세포 용적이 늘어나는 것은 인간의 발육, 발달상의 한정된 시기 뿐 아니라 식사나 운동 정도에 따라 평생 일어난다. 이렇

계 체내에서 가장 큰 유연성을 가지는 지방조직의 특성으로 인해 지방세포는 직경을 20배까지 증가시킬 수 있으며 그 결과 세포 용적은 수천 배까지 증가된다<sup>18)</sup>.

본 연구에서 지방전구세포에서 지방세포로 분화되어 생성되는 지방구 형성에 미치는 영향을 관찰한 결과 영지추출물은 3T3-L1 지방전구세포가 지방세포로 분화되는 것을 억제하고 지방구 형성을 억제하는 것으로 나타났다 (Figure 1 and 2).

전구지방세포에서 형태학적, 생화학적으로 완전히 성숙된 지방세포로 분화되는 과정은 호르몬, 사이토카인 그리고 전사인자 등의 여러 인자들의 상호조절을 통해 이루어지며<sup>19)</sup>, 전구 지방세포가 cAMP 같은 adipogenic signal을 받으면 전사인자 CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) $\beta$ 와 C/EBP $\delta$ 의 발현이 유도되고 이들이 adipogenesis의 주요조절자인 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\gamma$ 의 발현을 유도하여 분화를 진행시키는 것으로 알려져 있다<sup>20)</sup>. 분화과정에 관여하는 전사인자들 중 가장 잘 알려진 C/EBP family와 PPAR family는 지방세포 유전자 조절 부위와 상호 작용함으로써 지방세포분화를 촉진시킨다. 분화과정 초기에 C/EBP $\beta$ 와 C/EBP $\delta$ 의 발현이 증가되었다가 분화말기에 감소하는데, 이들의 기능은 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 를 유도하는 것으로 C/EBP $\alpha$ 는 분화 말기에 여러 지방조직 특이성 유전자들이 발현되기 전에 증가하여 에너지 항상성을 조절하며<sup>21)</sup>, PPAR $\gamma$ 는 adipogenesis의 주요 조절자로서 leptin, fatty acid synthase (FAS) 및 fatty acid binding protein (aP2) 등의 adipogenic gene들의 발현을 조절한다. PPAR는 핵수용체이며, 스테로이드 호르몬 수용체나 활성형 지용성 비타민 수용체와 유사한 구조를 가지며  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  등의 여러 아형이 알려져 있는데, 이 중 PPAR $\alpha$ 는 지방산 산화에 관여하고, PPAR $\gamma$ 는 지방분화에 관여하여 지방대사 관련 유전자들의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다<sup>22)</sup>.

본 연구에서 지방세포의 분화에 관여하여 분화를 유도하는 것으로 알려진 C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$ , C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$  mRNA의 발현을 관찰한 결과 영지추출물이 전사인자인 C/EBP $\beta$ 와 C/EBP $\delta$  mRNA의 발현억제를 통해 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$  mRNA의 발현을 억제하는 것으로 나타났다 (Figure 3). 또한 영지추출물이 지방합성에 관여하는 FAS mRNA와 지방특이 단백질인 aP2와 adipin mRNA의 발현을 억제하였는데 (Figure 4), 이러한 전사인자들의 발현양상은 영지추출물이 지방세포의

분화과정에서 지질 생성에 미치는 영향과 일치하여 분화 관련 전사인자들의 발현을 조절하여 지방합성을 조절하고 있음을 제시하였다.

한편 이러한 지방세포의 분화산물로 지방대사를 조절하는 것으로 알려진 leptin, UCP 및 adiponectin mRNA의 발현 양상을 관찰하였다. Leptin은 지방세포에서 생성하고 혈관으로 분비되어 시상하부의 포만 중추를 자극하는 식욕조절인자이며, 발열반응과 활동량을 증가시키고 섭취량을 감소시켜 체중과 체지방량을 감소시키는 생리적 작용을 가지고 있는데 이는 지방산 산화에 관여하는 효소들의 발현을 증가시켜 지방의 산화를 증진시키고 UCP (uncoupling protein)의 발현을 유도하여 열발생을 증가시켜 에너지를 소모시키는 작용을 하며, 지방의 형성을 방해하고 지방의 소모를 촉진함으로써 혈액 내의 포도당 농도를 낮추게 하여 인슐린 생산 세포의 기능을 향상시키고 인슐린에 대한 세포의 민감성을 증가시킴으로 제2형 당뇨병을 개선시킨다고 보고되고 있다<sup>23)</sup>. Adiponectin은 혈액 내에 가장 풍부한 호르몬중의 하나로 비만이나 제2형 당뇨병을 가진 환자에서 감소되어 인슐린 저항성을 증가시키고 에너지항상성에 이상을 초래하는 것으로 보고되었으며<sup>24)</sup>, 혈중 adiponectin 농도가 증가하면 인슐린 기능과 에너지 소비 항상성이 개선되는 것으로 알려져 있다<sup>25)</sup>.

본 연구에서 영지추출물이 지방세포의 분화산물인 leptin 등의 에너지 조절 adipokines 및 에너지 산화 관련 효소의 발현을 증진시켜 이들의 작용으로 지방 분해가 증진될 뿐 아니라 성숙한 지방세포의 dedifferentiation을 유도하여 궁극적으로 지질량을 감소시키는 것으로 사료된다.

## V. 결론

지방세포 분화중인 3T3-L1 세포에서 영지추출물에 의한 지방관련 유전자와 전사인자의 발현 조절에 대해 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 지방분화 초기 단계에서 영지약침이 3T3-L1 지방전구세포가 지방세포로 분화되는 것을 억제하고 지방구 형성을 억제하였다.
2. 영지약침이 전사인자인 C/EBP $\beta$ 와 C/EBP $\delta$

mRNA의 발현억제를 통해 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$  mRNA의 발현을 억제하는 것으로 나타났다. 또한 영지약침이 지방합성에 관여하는 FAS mRNA와 지방특이 단백질인 aP2와 adipsin mRNA의 발현을 억제하였는데, 이러한 전사인자들의 발현 양상은 영지약침이 지방세포의 분화과정에서 지질 생성에 미치는 영향과 일치하여 분화 관련 전사인자들의 발현을 조절하여 지방합성을 조절하고 있음을 제시하였다.

3. 영지약침이 지방세포의 분화산물인 leptin, UCP 및 adiponectin mRNA의 발현을 증진시킴을 관찰하였고, 이로 인해 지방 분해가 증진될 뿐 아니라 성숙한 지방세포의 dedifferentiation를 유도하여 궁극적으로 지질량을 감소시키는 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- Stein CJ, C.G., *The epidemic of obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. 89: p. 2522-5.
- Kopelman, P., *Obesity as a medical problem*. Nature, 2000. 404: p. 635-43.
- Ahima RS, F.J., *Adipose tissue as an endocrine organ*. Trends Endocrinol Metab., 2000. 11(8): p. 327-32.
- Kim, M., *Updates in treating obesity*. Korean J Health Psychol., 2004. 9: p. 493-509.
- Reddy P, C.M., *Focus on orlistat: A nonsystemic inhibitor of gastrointestinal lipase for weight reduction in the management of obesity*. Formulary, 1998. 33: p. 943-959.
- Seo, Y., *Patent trend of anti-obesity supplementary food*. Food World, 2005. 8: p. 116-122.
- Lee SZ. *Compendium of Materia Medica*. 2007, Yeoil. 166-172.
- Nogami M, I.M., Kubo M, Takahashi M, Kimura H, Matsuike Y., *Studies on Ganoderma lucidum. VII. Anti-allergic effect. (2)* Yakugaku Zasshi., 1986. 106(7): p. 600-604.
- Futrakul N, B.M., Patumraj S, Siriviriyakul P, Tosukhowong P, Futrakul P., *Treatment of glomerular endothelial dysfunction in steroid-resistant nephrosis with Ganoderma lucidum, vitamins C, E and vasodilators*. Clin Hemorheol Microcirc., 2003. 29(3-4): p. 205-210.
- Chen WQ, L.S., Li HZ, Yang H., *Effects of ganoderma lucidum polysaccharides on serum lipids and lipoperoxidation in experimental hyperlipidemic rats*. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2005. 30(17): p. 1358-1360.
- Qi G, H.H., Gao Y, Lin Q, Yu GY, *Effects of Ganoderma lucidum spores on sialoadenitis of nonobese diabetic mice*. Chin Med J (Engl), 2009. 122(5): p. 556-560.
- Lin, Z.B., *Cellular and molecular mechanisms of immuno-modulation by Ganoderma lucidum*. J Pharmacol Sci., 2005. 99(2): p. 144-153.
- Jiang J, G.B., Thyagarajan A, Sliva D, *Ganoderic acids suppress growth and invasive behavior of breast cancer cells by modulating AP-1 and NF-kappaB signaling*. Int J Mol Med., 2008. 21(5): p. 577-584.
- Lee DH. *Incurable Disease and herbal pharmacopuncture therapy*. Journal of Korean pharmacopuncture institute, 2003. 6(1): p. 9-11.
- Lee CW, Yoon HM, Kang KH, *The effects of Ganoderma lucidum herba pharmacopuncture on 3T3-L1 preadipocyte differentiation*. Journal of Korean pharmacopuncture institute, 2008. 11(3): p. 47-53.
- MacDougald OA, H.C., Fan H, Lane MD *Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes*. Proc Natl Acad Sci USA, 1995. 92(20): p. 9034-9037.
- Klaus, S., *Adipose tissue as a regulator of energy balance*. Curr Drug Targets., 2004. 5(3): p. 241-50.
- Koldovský O, D.M., Drahotka Z, Hahn P., *Developmental aspects of lipid metabolism*. Physiol Res. , 1995. 44(6): p. 353-6.
- Gregoire FM, S.C., Sul HS, *Understanding adipocyte differentiation*. Physiol Rev.,

1998. 78: p. 783-809.

20. Camp HS, R.D., Leff T., *Adipogenesis and fat-cell function in obesity and diabetes*. Trends Mol Med., 2002. 8(9): p. 442-447.
21. Long SD, P.P., *Lipid mediators of insulin resistance: ceramide signalling down-regulates GLUT4 gene transcription in 3T3-L1 adipocytes*. Biochem J., 1996. 319: p. 179-184.
22. Hwang CS, L.T., Mandrup S, Lane MD, *Adipocyte differentiation and leptin expression*. Annu Rev Cell Dev Biol., 1997. 13: p. 231-259.
23. Ceddia RB, W.W.J., Lima FB, Flandin P, Curi R, Giacobino JP, *Leptin stimulates uncoupling protein-2 mRNA expression and Krebs cycle activity and inhibits lipid synthesis in isolated rat white adipocytes*. Eur J Biochem.,

2000. 267(19): p. 5952-5958.

24. Berg AH, C.T., Du X, Brownlee M, Scherer PE., *The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action*. Nat Med., 2001. 7(8): p. 945-953.
25. Antuna-Puente B, F.B., Fellahi S, Bastard JP., *Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity*. Diabetes Metab., 2008. 34(1): p. 2-11.

Table 1. Primers for RT-PCR

Target mRNA		SEQUENCE(5'-3')			
C/EBP $\alpha$	F	GTGTGCACGCTATGCTAA	R	GCCGTAGTGAAGAGTCTC	
C/EBP $\beta$	F	GTTTCGGGAGTTGATGCAA	R	AACAACCCCGCAGGAACAT	
C/EBP $\delta$	F	GATCTGCACGGCCTGTTGT	R	CTCCACTGCCACCTGTCA	
PPAR $\gamma$	F	CGCTGATGCACTGCCTATG	R	TGCGAGTGGTCTTCCATCA	
FAS	F	TGGTGGGTTTGGTGAATTG	R	GCTTGTCTGCTCTAACTG	
$\alpha$ 2	F	CCAATGAGCAAGTGGCAAG	R	GATGCCAGGCTCCAGGATA	
Leptin	F	CCAAAACCCCTCATCAAGAC	R	CTCAAAGCCACCACCTCTG	
Adiponectin	F	GGAGATGCAGGTCTTCTTGG	R	TCCTGATACTGGTCTAGGT	
UCP2	F	AACAGTTCTACACCAAGGGC	R	AGCATGGTAAAGGGCAGATG	
Adipsin	F	CTGCTGGACGAGCAGTGG	R	GATGACACTCGGGTATAGT	
1&S	F	GTAACCCGTTGAACCCCAAT	R	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	

F: forward, R: reverse

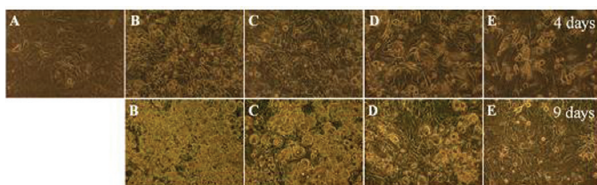


Figure 1. Effects of GL on the 3T3-L1 preadipocytes differentiation. 3T3-L1 adipocytes were observed 4 and 9 days after the initiation of differentiation and were treated with 1-3% of GL (B) for 72 h at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator. [A] undifferentiated cells, [B] Control was treated with MDI to induce differentiation, [C, D, and E] MDI and 1%, 2%, and 3% of GL were treated

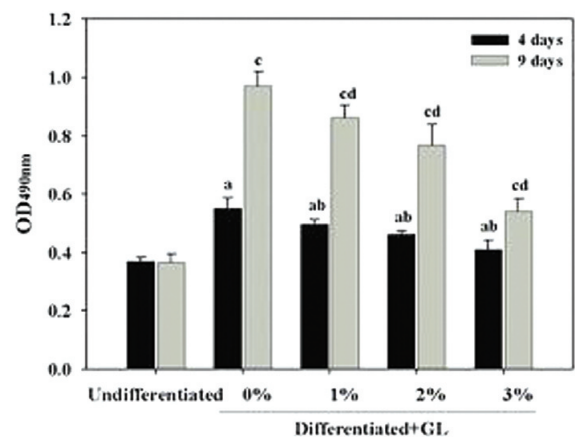
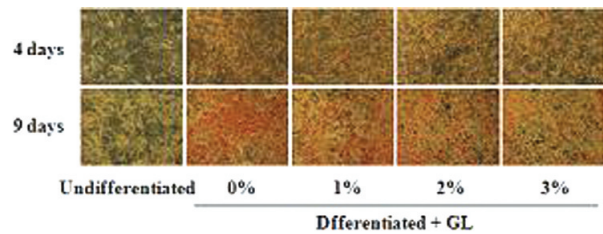


Figure 2. Effects of GL on oil red O stained material in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes were harvested 4 and 9 days after the initiation of differentiation and were stained with oil red O (A). Cells were treated with 1-3% of GL (B) for 72 h at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator. Cells were stained with oil red O. The reported values are the means  $\pm$  SD (n = 4). a; p < 0.05 vs undifferentiated cells, b; p < 0.05 vs differentiated cells

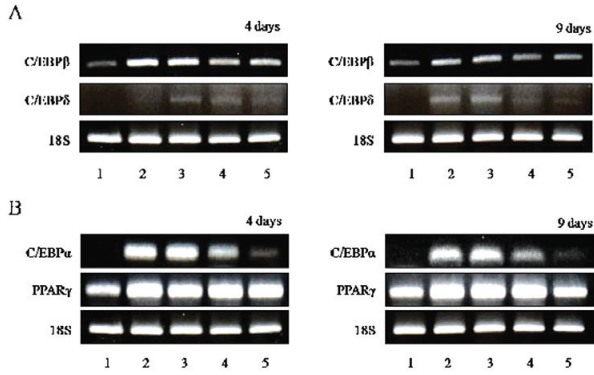


Figure 3. Effect of GL on mRNA levels of C/EBP $\beta$  and C/EBP $\delta$  (A), and C/EBP $\alpha$  and PPAR $\gamma$  (B) in 3T3-L1 adipocytes.

3T3-L1 adipocytes were harvested 4 and 9 days after the initiation of differentiation. Cells were treated with 1-3% of GL for 72 h at 37° C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator. 1: undifferentiated cells, 2: Control was treated with MDI to induce differentiation, 3, 4, and 5: MDI and 1%, 2%, and 3% of GL were treated

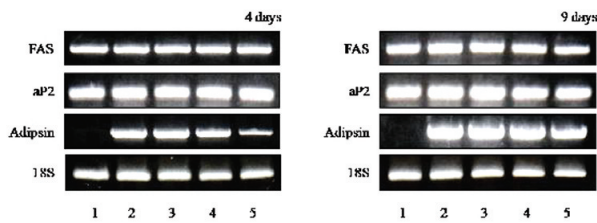


Figure 4. Effect of GL on mRNA levels of FAS, aP2 and adipsin in 3T3-L1 adipocytes.

3T3-L1 adipocytes were harvested 4 and 9 days after the initiation of differentiation. Cells were treated with 1-3% of GL for 72 h at 37° C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator. 1: undifferentiated cells, 2: Control was treated with MDI to induce differentiation, 3, 4, and 5: MDI and 1%, 2%, and 3% of GL were treated

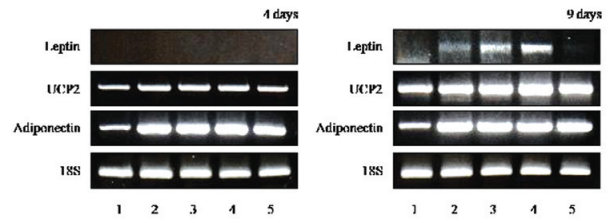


Figure 5. Effect of GL on mRNA levels of Leptin, UCP2, and Adiponectin in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes were harvested 4 and 9 days after the initiation of differentiation. Cells were treated with 1-3% of GL for 72 h at 37° C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator. 1: undifferentiated cells, 2: Control was treated with MDI to induce differentiation, 3, 4, and 5: MDI and 1%, 2%, and 3% of GL were treated