ISSN : 1225-9918
Journal of Life Science **2011** Vol. 21. No. 3. 358~367 DOI : 10.5352/JLS.2011.21.3.358

Suppressive Effects of By-Product Extracts from Soybean on Adipocyte Differentiation and Expression of Obesity-Related Genes in 3T3-L1 Adipocytes

Misun Choi[1], Jee-In Kim[1,3], Jin-Boo Jeong[2], Subok Lee[1†], Jae-Nam Jeong[1], Hyung-Jin Jeong[2], Eul-Won Seo[1], Taek-Yoon Kim[4], Oh-Jun Kwon[5] and Jae-Hwan Lim[1]*

[1]*Department of Biological Science,* [2]*Department of Medicinal Plant Resource, Andong National University, Andong 760-749, Korea*
[3]*Department of Biochemistry and Cell Biology, Skeletal Diseases Genome Research Center, School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu 700-422, Korea*
[4]*Quality Control Section, Hahoefood Co. Andong, 760-812, Korea*
[5]*Industrial Evaluation Agency for Gyeongbuk Province, Gyungsan 712-210, Korea*

Received October 27, 2010 /Accepted December 9, 2010

Soybean is known to contain various phytochemicals that are related to anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-obesity effects in mice and humans. The anti-obesity effect of by-product extracts from soybean on the differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes to adipocytes was investigated by suppressing adipocyte differentiation and lipid accumulation with Oil Red-O assay and quantitative PCR. In inducing differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes in the presence of an adipogenic cocktail, isobutylmethylanthine (IBMX), dexamathasone, and insulin, treatment with filtrated soybean soaked water, soybean milk, and soycurd residue from soybean curd processing significantly decreased mRNA expression of obesity-related gene such as PPARɣ, Fabp4, and Scd1, adipsin, apolipoprotein (APOE) and adiponectin (ADIPOQ) without any significant cytotoxicity. We also determined the well-known isoflavones in soybean, such as daidzein and genistein, in the by-product extracts. Taken together, we suggest that soybean by-product extract showed anti-obesity effect by suppressing adipocyte related gene expression, and that by-products collected during soybean curd processing may be a good candidate as an ingredient in health care products.

Key words : Soybean by-product, adipocytes differentiation, obesity-related-gene expression

서 론

비만은 지방세포의 과다한 증식과 에너지 축적의 결과로서 불균형적인 에너지 대사를 유발하며 대사성 및 심혈관, 뇌혈관 질환, 암과 같은 다양한 질병의 원인이 되고 있다[14,32]. 지방세포 형성과정은 초기 전사인자인 CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs)와 후기 전사인자 peroxidase proliferator-activated receptor-γ (PPARγ)에 의해 조절된다. 3T3-L1 pre-adipocytes cell (전지방세포)은 세포분화유도물질과 호르몬의 신호에 의해 지방세포로의 분화가 시작되며 분화 초기에 C/EBPs의 발현이 증가되고 후기 지방세포 형성과정의 핵심적인 기능을 하는 PPARγ의 발현이 증가됨으로써 지방세포형성 분화조절이 이루어진다[16,29]. 분화조절 전사인자인 PPARγ의 발현량의 증가는 adiponectin (ADIPOQ), apolipoprotein E (APOE), resistin (RETN)과 같은 adipocyte-specific gene들의 발현을 유도하며[30], 특히 apolipoprotein E (APOE), stearoyl-coenzyme A desaturase 1 (Scd1) 등은 지방조직에 저장되는 지질 생성에 중요한 기능을 하며 지방세포로의 분화가 시작되면 지방세포 내에서 그 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다[35]. 또한 adipokine은 성숙된 지방세포로 분화되었을 때 그 발현량 증가와 함께, 지방산 산화와 당 대사, 식욕조절을 포함한 체내 에너지 대사를 총체적으로 조절하는 것으로 알려져 있다[23,32].

두유, 순물, 침지수는 두부 제조 공정 시에 발생되는 부산물로서 현재 순물과 침지수는 두부의 제조과정에서 폐기되고 있다. 두부의 주 원료인 대두에는 유용한 생리활성물질들이 존재함이 밝혀졌으며, 이 중에서도 isoflavone에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 대두 내 isoflavone은 daidzein과 genistein이 잘 알려져 있으며 혈중 콜레스테롤 저하작용, 항산화작용, estrogen 유사작용 등의 효과가 보고되었다[4,9,20,27]. 특히 호르몬과 관련된 유방암의 경우 genistein은 암세포성장억제 효과를 포함한 뛰어난 항암효과를 가지고 있음이 *in vivo, in vitro* 실험 등을 통해 보고된 바 있다[1,31,34]. 대두에 포함된 단백질인 lunasin역시 피부암이 유발된 동물에서 종양의 생성을 억제하는 항암효과를 보이는 것으로 알려져 있다[15]. 대두

†Present address.
Division of Zoonoses, National Institute of Health, Chungcheongbuk-do, 363-951, Korea
*Corresponding author
Tel : +82-54-820-5797, Fax : +82-54-820-7729
E-mail : jhlim@andong.ac.kr

추출물과 함께 두부 순물과 그 고형분에 포함된 단백질과 아미노산 조성에 대한 연구보고에서 glutamic acid, aspartic acid의 높은 함량이 밝혀졌으며, 대두를 열수에 침지한 액인 침지수에는 대두의 올리고당과 대두 단백질 등이 함유되어있는 것으로 분석된 바 있다[10,17,21]. 최근 체내 지방을 감소시킬 수 있는 천연대체물들의 효과와 기능성 식품들이 보고되었고[2,3,8], 각종 식품생산 후에 폐기되는 부산물의 기능성 소재의 탐색과 활용방법 등에 대한 연구가 진행되고 있으나 두부제조 시에 부산물로 발생되는 대두부산물을 활용한 지방세포 생성분화억제효과에 대한 분자생물학적 기전 연구는 아직 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 두부의 제조공정 시 발생하는 대두부산물인 두유, 순물, 침지수 추출물에 의한 지방세포생성분화억제 및 지방생성억제 효능을 확인하고 분화 조절 및 지방생성에 관련된 조절 유전자들의 발현을 분석하였다.

재료 및 방법

시료 제조

대두를 100℃에서 열수 침지한 침지수는 열수가열 없이 여과, 농축, 동결건조 하여 사용하였다. 두유와 순물은 12,000 rpm으로 10분간 원심분리 후 여과지(Whatman No.1)로 거른 다음 농축, 동결 건조한 후 4℃ 냉장실에 보관하며 본 실험의 시료로 사용하였다.

대두부산물 내 isoflavone함량 측정

분석을 위한 시료는 각 공정별 시료 0.1 g을 ddH_2O 3 ml에 녹인 후 4℃, 15,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 각 공정별 상등액으로부터 genistein과 daidzein을 분석하기 위해 상등액 3 ml을 1M HCl 3 ml과 혼합한 후 98-100℃에서 약 2시간 동안 반응시켰다. 2시간 후 methanol 6 ml을 첨가하고 수 분간 상온에서 반응시킨 후 corning syringe filter (nylon 0.2 μm)를 사용하여 여과하였다. HPLC 분석 column은 Bondapak C18 (Waters Co, MA, USA)을 사용하였으며, 이동상 용액은 0.1% acetic acid가 포함된 acetonitrile과 0.1% acetic acid가 포함된 증류수를 3:7 비율로 15분간 5:5 비율로 15분간 분석되었다. 모든 분리시료는 UV detector (254 nm)에서 분석되었으며 시료와 표준시료물질의. retention time을 비교하여 genistein과 daidzein을 확인하였으며 그 함량은 peak area로 비교하였다.

대두부산물의 항산화 활성 측정

공정별 항산화 활성은 DPPH radical과 hydroxyl radical 소거능을 이용하여 측정하였다. 공정 별 추출물은 각 시료 2 g을 각각 30 ml MeOH로 24시간 동안 추출한 후 evaporator로 농축한 후 80℃에 보관하였다. 공정별 추출물의 DPPH에 대한 전자 공여능은 Bondet 방법[6]에 의해 측정하였다. 농도 별 추출물(40 mg/ml MeOH) 40 μl를 300 μM DPPH 760 μl에 첨가한 후 30분간 37℃에 반응시킨 후 UV/Visible spectrophotometer (Beckman, USA) 을 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아래 식을 이용하여 공정별 추출물의 전자 공여능을 계산하였다.

소거능(%)=[1-(추출물 첨가구의 흡광도/추출물 무 첨가구의 흡광도)]×100

Hydroxyl 라디칼 소거 능은 $FeSO_4$와 H_2O_2의 Fenton 반응에 의해 생성된 Hydroxyl 라디칼에 의해 sodium salicylate가 가수분해 되는 정도를 통해 측정되었다. 1.5 mM $FeSO_4$와 6 mM H_2O_2 (3.5:5)의 37℃에서 Fenton 반응에 의해 생성된 hydroxyl 라디칼 760 μl와 농도별 시료 40 μl를 혼합한 후 37℃에서 약 30 분간 반응시켰다. 반응 후 200 mM sodium salicylate 200 μl를 첨가 한 후 UV/Visible spectrophotometer (Berkman, USA)을 이용하여 562 nm에서 흡광도를 측정하였으며 위의 식을 이용하여 공정 별 hydroxyl radical 소거능을 계산하였다.

세포 배양

실험에 사용한 3T3-L1 pre-adipocyte cell (전지방세포)은 American Type Culture Collection (ATCC) 로부터 구입하여 사용하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco Inc., USA) 배지에 10% fetal bovine serum과 1% antibiotics-antimycotic을 첨가하여 5% CO_2가 존재하는 37℃ 세포 배양기에서 2~3일에 한 번씩 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

세포생존율 측정

대두부산물 처리에 의한 농도 의존적 세포생존율은 MTT assay로 측정되었다[12]. 배양된 3T3-L1 전지방세포를 96 well plate에 5×10^3 cells/well 가 되도록 분주하였다. 24시간 배양 후 상등액을 제거하고 배지와 함께 대두부산물 추출시료를 10 ppm, 25 ppm, 100 ppm 농도로 처리하였다. 대두부산물을 농도 별로 처리하고 24시간을 배양한 후 MTT 시약(5 mg/ml)을well 당 10 μl 첨가하고 3시간 동안 추가 배양하였다. 그 후 상등액을 제거하고 DMSO 150 μl를 각 well에 분주하여 30분 교반한 뒤 microplate reader (Infinite® 200, Tecan Trading AG, Switzerland)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 흡광도는 MTT가 세포에 의해서 환원된 양을 나타내며, 각 well에 생존한 세포수와 비례한다.

Cell viability (%)=(시료처리군의 흡광도/대조군의 흡광도)×100

Adipogenesis 유도

2×10^5 cells/ml을 6 well-plate에 세포 밀도가 100%가 될 때까지 배양한 후 배지를 바꿔 37℃, 5% CO_2의 환경에서 48시간 더 배양하였다. 1 μM dexamethasone, 0.5 mM IBMX, 1 μg/ml insulin등 세포분화유도에 사용된 시약은 Sigma (USA)에서 구입하였다. 지방세포로 분화를 유도하기 위해 adipogenic cocktail이 포함된 분화유도배지에서 48시간 배양한 후 insulin 1 μg/ml이 포함된 분화유지배지로 교체하였다. 이후 48시간 간격으로 배지를 2회 교체한 후 분화유도 상태를 확인하였다. 분화유도과정 중에 대두부산물의 분화 억제 효능을 확인하기 위해 분화유도배지에 대두부산물을 함께 처리하였으며, 대두부산물을 처리하지 않고 분화 유도한 것을 대조군으로 하였다.

Oil Red O 염색

세포배양배지를 제거하고 PBS (WelGENE Inc., Korea) 용액으로 2회 세척한 후 4% formaldehyde (Sigma, USA) 를 처리하여 20분 간 상온에 두었다. 이 후 ddH_2O와 60% isopropanol로 1분간 각각 2회 세척하고 Oil Red O solution (Sigma, USA) 으로 10분간 염색한 후 위상차 현미경을 이용하여 지방세포 분화를 확인하였다. 또한 정량을 위해 isopropanol을 가하여 염색된 시약을 용출시켜 회수한 후 microplate reader (Infinite® 200, Tecan Co, Switzerland)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다[19].

Total RNA 분리 및 RT-PCR

TRIzol (Gibco Inc., USA)을 이용하여 total RNA를 추출한 후 Total RNA Clean up kit (Ambion, USA) 를 사용하여 정제하였다. 정제된 RNA를 template로 SuperScript™ kit (Invitrogen, USA)를 이용하여 single stranded cDNA를 제조하였다. 지방세포분화와 관련된 유전자들을 특이적으로 증폭하기 위해 primer (Table 1) 를 제작하였으며 각 유전자의 발현정도를 GAPDH 유전자의 발현과 비교하여 확인하였다. 유전자의 발현정도는 전기영동 후 ImageQuant 5.2 (GE Healthcare, USA) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

대두부산물 내 daidzein과 genistein함량 비교

대두에 함유되어 있는 isoflavone인 daidzein과 genistein은 항암효과와 항산화 효과로 주목을 받아 왔으며 각종 성인병의 예방 효과가 높다고 알려져 있다. daidzein은 세포 내 신호전달에 관여하는 단백질 인산화 효소를 저해하고 혈중 콜레스테롤을 낮춰 각종 만성 질환의 예방과 치료에 효과적인 것으로 알려져 있다[5]. genistein은 항산화 기능, 항암작용, 아테롬성 동맥경화, 골다공증을 억제한다고 보고되었다[20].

본 실험에서는 두부의 제조 공정 과정에서 나오는 부산물들에 포함된 isoflavone을 정성적, 정량적으로 확인하기 위해 HPLC를 이용하여 daidzein과 genistein의 함량을 측정하였다. 대두부산물의 isoflavone 함량을 측정한 결과 침지수에서 daidzein과 genistein의 함량이 각각 4,035 μg/g extract, 106 μg/g extract 로 가장 높았으며 두부공정이 진행될수록 함량이 감소하였다. 침지수와 두유 그리고 순물에서 isoflavone의 함량을 비교하였을 때 순물에서는 침지수 함유 daidzein양의 약 17.5%, genistein 양의 약 9.3% 정도이며 두유에는 daidzein 양의 약 9.3%, genistein 양의 약 4.9% 만을 함유하고 있는 것으로 확인되었다. 결과적으로 두부의 제조 공정 시 발생하는 부산물들은 대두에 포함된 주요 효능인자로 알려진 isoflavone을 함유하고 있으며, 공정이 진행될수록 그 함량이 감소함을 확인하였다(Fig. 1).

대두부산물 내 항산화 활성평가

세포대사과정 중 발생된 활성산소는 세포의 구성 성분인 지질, 단백질, 당 및 DNA 등을 비가역적으로 파괴하여 세포손상을 야기하며 암을 비롯한 뇌 질환 그리고, 피부 및, 소화기 질환, 염증, 류마티스, 면역 질환 등의 각종 질병의 원인이 되는 것으로 알려져 있다[18]. 대두 부산물, 즉 공정별 추출물의 항산화 활성을 확인하기 위하여 Hydroxyl radical과 DPPH radical 소거능을 확인하여 분석하였다. Hydroxyl radical 소거능을 평가한 결과, 침지수 추출물은 Hydroxyl radical을 거의 소거하지 못하였으나 순물과 두유 추출물은 2,000 μg/ml

Table 1. Selected genes related adipocyte differentiation and primer sequences used in RT-PCR

Gene	Forward sequence	Reverse sequence
PPARγ	5'-ATGGAAGACCACTCGCATT-3'	5'-TGGCCATGAGGGAGTTAGA-3'
APOE	5'-TCGAGCCAATAGTGGAAGAC-3'	5'-TGGATATGGATGTTGTTGCA-3'
Fabp4	5'-AGTGGGCTTTGCCACAA-3'	5'-GGTGATTTCATCGAATTCCA-3'
Adipsin	5'-CCTTGCAATACGAGGACAAA-3'	5'-GCATCCCCGCACACTAG-3'
Scd1	5'-CGCCCCTACGACAAGAAC-3'	5'-ACACCCCGATAGCAATATCC-3'
LEP	5'-AGCAAGCCATCAGCTTTTTC-3'	5'-GATCCTTCACCCTCCCTCTA-3'
RETN	5'-CGTACCCACGGGATGAA-3'	5'-GAAGCGACCTGCAGCTTAC-3'
ADIPOQ	5'-CTGCCTGTCCCCATGAGTA-3'	5'-TGACTGGGCAGGATTAAGAG-3'
mGAPDH	5'-ATGCCCCCATGTTTGTG-3'	5'-GATGCAGGGATGATGTTCTG-3'

A.

Isoflavones	μg/ g extracts		
	Soaking water	Soybean-curd whey	Soybean milk
Daidzein	4035.4	706.3	376.2
Genistein	106.0	22.4	5.2

B.

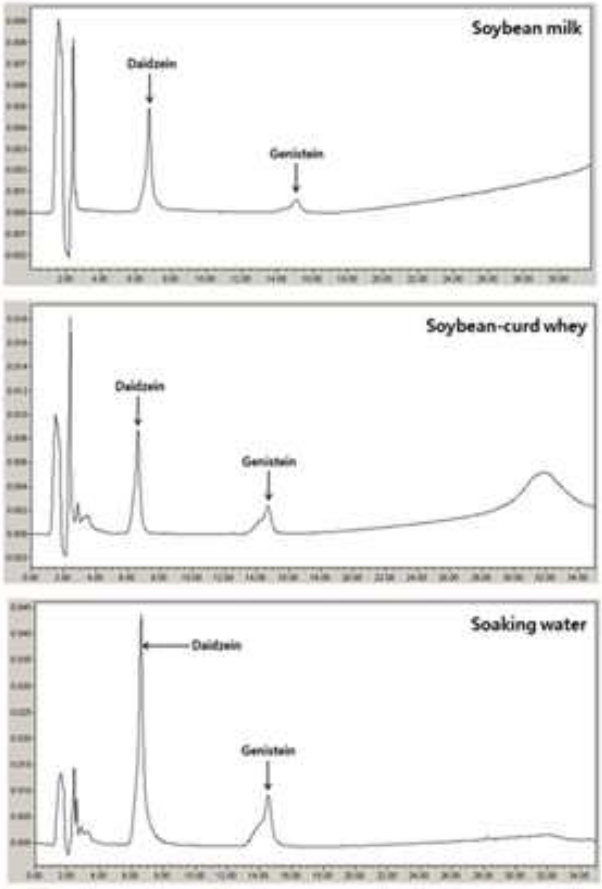

Fig. 1. Isoflavones contained in by-products of soybean. (A) Contents of isoflvones in by-product of soybean were calculated with peak areas. (B) HPLC chromatogram of by-products of soybean. Each isoflavone content in by-product of soybean was determined by comparing with analytical curves with reference substances, daidzein and genistein. Running buffer A was 0.1% acetic acid in acetonitrile and buffer B was 0.1% acetic acid in water.

농도 처리 시 각각 58% 그리고 35%의 hydroxyl radical 소거능을 확인하였다. 또 공정 별 추출물의 DPPH radical 소거능을 평가한 결과, 침지수에서는 거의 소거활성이 없었으나, 순물과 두유 추출물은 2,000 μg/ml 농도 처리시 각각 43.2% 의 유사하게 DPPH radical을 소거하였다(Fig. 2). 따라서, 공정별 추출물의 Hydroxyl radical 소거능은 두유>순물>침지수 순이었으며, DPPH radical 소거능은 두유=순물>침지수 순이었다. 결과적으로 두유 및 순물에는 daidzein과 genistein에 비해 더욱 높은 항산화능을 가진 다른 종류의phytochemical을 함유하고 있음을 의미한다. 실험적으로 대두 내 phytoestrogen인 equol은 daidzein과 genistein에 비해 높은 항산화 활성 및 항염 활성이 보고된 바 있다[19].

대두부산물의 세포 생존율 측정

두부부산물 처리에 따른 3T3-L1 adipocytes 세포 생존율을 조사하기 위하여 10 ppm, 25 ppm, 100 ppm 농도의 대두부산물을 처리 한 후, 대조군과 비교하여 MTT분석을 하였다(Fig. 3). 두유와 침지수는 고농도인 100 ppm농도 처리 시에 95% 이상의 cell viability를 보였으며 순물 처리시에는 10 ppm에서 95.21%, 25 ppm에서 92.12%, 100 ppm에서 88.65%의 cell viability ($p<0.05$) 를 보여 높은 농도 처리시에 세포 생존율이 일부 감소하는 것을 확인하였다.

지방 분화 억제 효능에 미치는 영향

3T3-L1 adipocytes의 분화 억제 효능에 미치는 영향을 분석하기 위하여 배양된 세포에 분화유도물질과 함께 침지수, 두유 및 순물 추출물을 각각 10 ppm, 25 ppm, 100 ppm의 농도로 처리하였다. 분화유도과정이 끝난 후 세포를 Oil Red O 염색하여 현미경으로 관찰한 후 지방함량을 정량하였다. 분화유도물질을 처리하지 않은 세포와 분화유도물질을 처리한 세포를 대조군으로 하였다. 분화유도물질을 처리한 세포와 비교하여 두유추출물을 처리한 군은 10 ppm에서 92.77%, 25 ppm에서 87.62%, 그리고100 ppm에서 85.59%, 순물 추출물을 처리한 군은 10 ppm에서 94.42%, 25 ppm에서 87.09%, 100 ppm에서 79.14%로 나타나 처리 농도가 증가함에 따라 지방세포 내 지방함량이 유의성 있게 감소되었다(Fig. 4A). 마찬가지로 Oil Red O 염색 후 현미경 관찰 시에도 추출물 농도가 증가함에 따라 염색된 지방함량이 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 4C). 따라서 두유와 순물의 경우 처리농도가 증가할수록 지방세포 분화 억제 효능이 나타남을 확인하였으며, 침지수의 경우는 10 ppm의 저농도 처리 시에도 85.54%의 지방세포 분화 억제 효능이 나타남을 확인하였다. 또한 대두의 daidzein과 genistein을 10 μM, 25 μM을 처리한 결과 대두에 함유된 isoflavone은 농도 의존적으로 분화억제 효능이 감소함을 확인하였다(Fig. 4B, Fig. 4C). 결과적으로 두부부산물에 포함되어진 isoflavone이 전지방세포의 지방세포 분화와 지방세포 형성을 억제하는 주요 인자임을 확인하였으며 위의 두 성분이 상대적으로 적은 두유 및 순물에서도 유사한 분화억제효능이 있음으로 보아 daidzein과 genistein 외에 또 다른 phytochemical이 존재하고 있음을 의미한다.

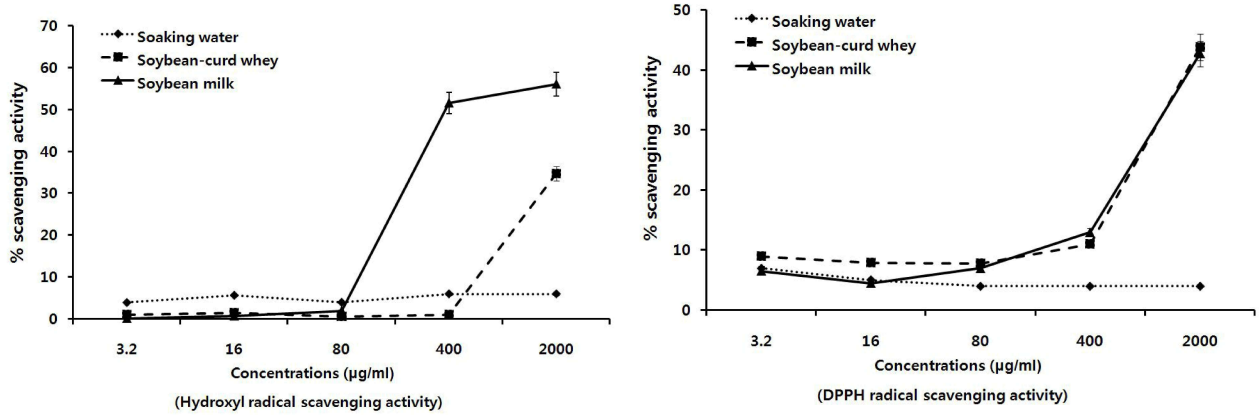

Fig. 2. Hydroxyl radical scavenging activity and DPPH radical scavenging of extracts from by-products of soybean. Concentration-response curve for the radical-scavenging activity of extracts from by-product of soybean. Hydroxyl, DPPH Radical-scavenging rate (%)=[1-(A_{sample}/$A_{control}$)]×100.

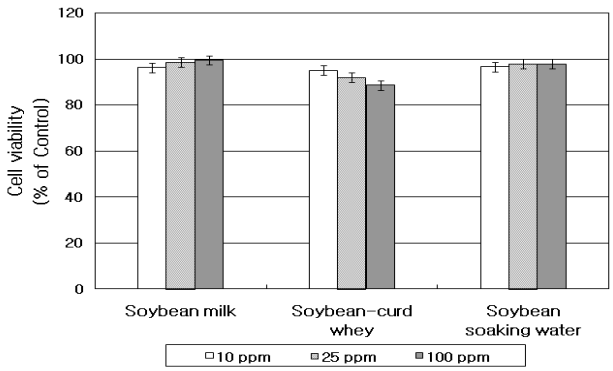

Fig. 3. Cell viability of 3T3-L1 adipocytes against extracts from by-product of soybean (p<0.05). 3T3-L1 cells (5×10^3 /well) were grown in 96 well plates and treated with different concentrations (10~100 ppm) of extracts from by-product of soybean. After incubation for 24 hrs, MTT assay was performed as described in the Material and Methods.

대두부산물이 분화유도 최종 전사 인자 PPARγ의 발현에 미치는 영향

대두부산물이 3T3-L1 adipocytes의 분화유도에 연관된 유전자의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 분화 유도 되어진 대조군과 각각 10 ppm, 25 ppm 및 100 ppm의 대두부산물의 처리한 후 분화유도 되어진 실험군을 비교하였다. 전지방세포는 적당한 분화 자극과 지방세포형성 유도 조절자의 발현에 의해 최종 전사인자인 PPARγ의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다[16,29]. Peroxisome proliferator activated receptors (PPARs)는 nuclear hormone receptor superfamily에 속하며, PPAR family member로는 PPARα, PPARγ, PPARζ가 알려져 있다. 이들 PPAR 전사인자들은 Retinoid X receptor α와 heterodimer를 이루어 표적 유전자의 Peroxisome proliferator response element를 인지하고 지방 형성에 관련된 지방세포분화 관련 유전자의 발현을 조절한다[7]. 따라서 이를 확인하기 위하여 분화 유도 및 대두부산물의 처리에 따른 지방세포형성의 최종 전사인자인 PPARγ의 발현을 확인하였다.

대두부산물을 처리한 PPARγ mRNA발현 양상을 살펴보면 분화 유도된 대조군과 비교하여 실험군에서, PPARγ의 mRNA발현이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 5). 두유와 침지수 처리시 모든 처리 농도에서 50% 미만의 발현 감소를 보였으나 일부 농도 비의존적인 현상이 확인되었다. 또한 순물의 경우 처리 농도가 증가함에 따라 PPARγ의 발현이 농도 의존적으로 감소하여 Oil Red O 염색을 통한 세포관찰 결과와 일치하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 두부부산물의 지방 세포 분화 억제는 PPARγ의 발현의 억제를 통하여 이루어지는 것을 의미한다.

Lipid metabolism에 대한 대두부산물의 효과

지방세포의 분화 유도 과정이 진행되면 전사 조절 인자인 PPARγ의 조절에 의해 지방대사 관련 유전자의 발현이 증가한다[16]. PPARγ의 발현이 증가하면 체내 당의 흡수가 증가되고 지방세포의 분화를 유발하게 되는 것으로 알려져 있다[32]. 또 지방세포의 분화 과정에서 지방 대사에 관여하는 apolipoprotein E (APOE), fatty acid binding protein 4 (Fabp4), adipsin 및 stearoyl-coenzyme A desaturase 1 (Scd1)은 PPARγ 등의 전사조절인자에 의해 조절되는 것으로 알려져 있어 두부 부산물의 지방세포 분화 억제를 확인하기 위하여 이들 유전자의 발현 정도를 분석하였다[24,32].

APOE의 경우 대조군과 비교하여 두유추출물 25 ppm 처리와 함께 지방세포 분화유도 시 APOE유전자의 발현이 25% 이하로 급격히 감소하였으며, 순물과 침지수 추출물 처리 시에는 30~40% 미만으로 발현이 감소하였다. Scd1유전자의 발현은 분화 유도시 미분화에 비해 발현이 증가하나, 두부부산

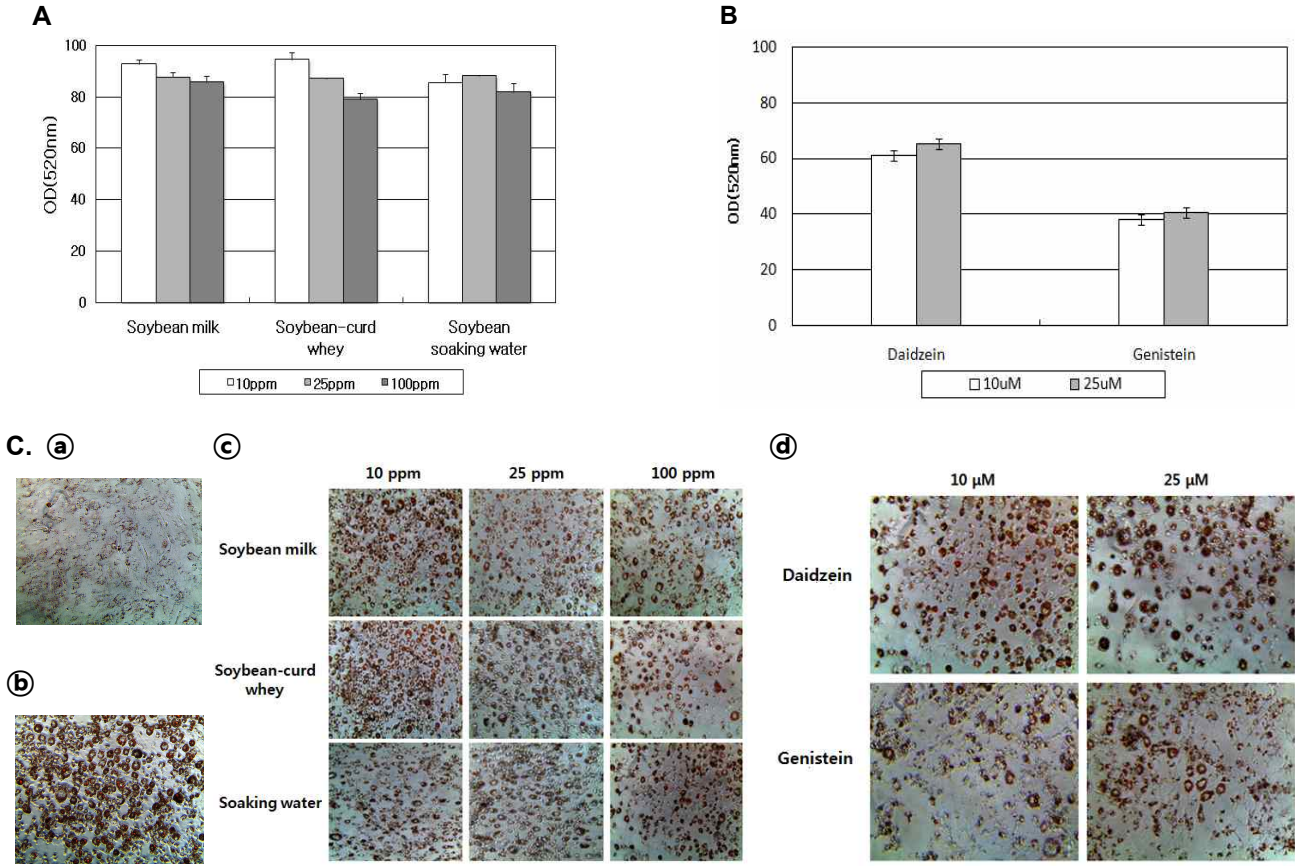

Fig. 4. Inhibition of differentiation of 3T3-L1 cells after treatment with by-product of soybean. (A) Suppressive effects on 3T3-L1 differentiation were determined with Oil-Red O assay after treatment with various concentrations of by-products from soybean. (B) Effects of genistein and daidzein on adipocyte differentiation. Stained oil droplets with Oil-Red O was dissolved with isopropanol and quantified by spectrophotometric analysis at 520 nm ($p<0.05$). Each treatment was triplicated. (C) Microscopic photogram for effects of extracts from by-product of soybean on the 3T3-L1 preadipocytes differentiation (Magnification=10X). The Oil droplets were stained with Oil Red O. ⓐ undifferentiated cells, ⓑ differentiated cells, ⓒ treated cells with 10 ppm, 25 ppm and 100 ppm of by-product extracts of soybean, soybean milk, soybean-curd whey, soybean soaking water, seperately ⓓ treated cells with 10 ppm, 25 ppm and 100 ppm of isoflavones, daidzein and genistein, respectively.

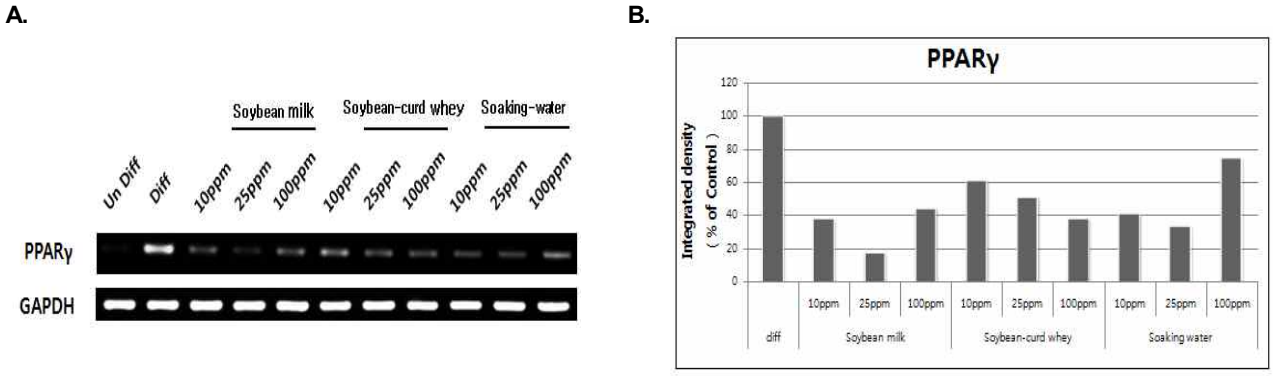

Fig. 5. Reduced expression of PPARγ under inhibitory effects by-products treatment in 3T3-L1 differentiation. (A) Total RNAs were extracted from 3T3-L1 cells and gene expression was analyzed by RT-PCR. (B) Gene expression levels were normalized with GAPDH, and shown relative ratio to its in differentiated cells.

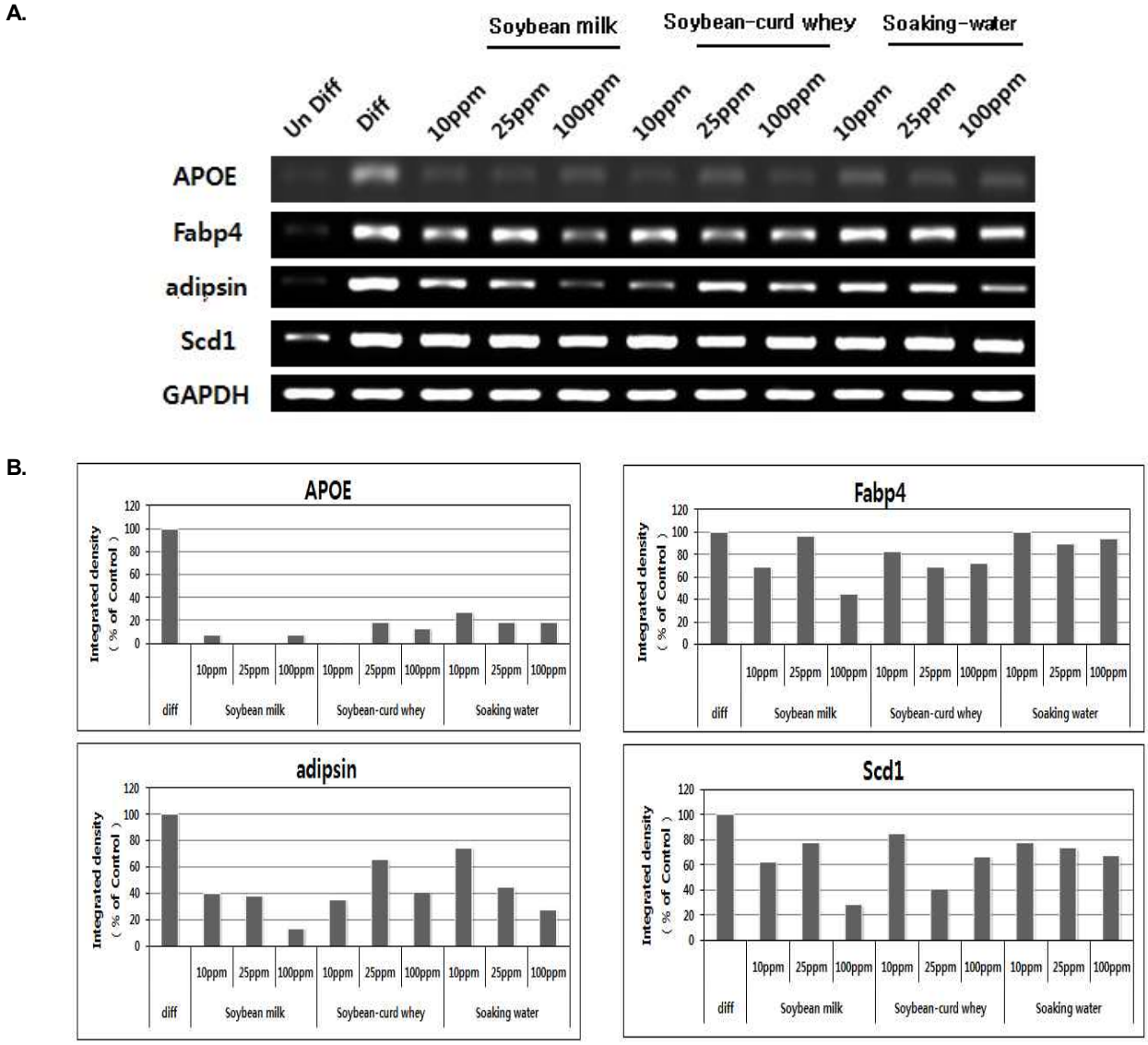

Fig. 6. Relative expression of genes related lipid metabolism, APOE, Fabp4, adipsin and Scd1, in 3T3-L1 differentiation upon treatment with by-products extracts. Total Extracted RNAs from treated 3T3-L1 cells with soybean soaking water, soybean milk and soybean-curd whey were analyzed by RT-PCR (A) and gene expression levels were quantified with ImageQuant program. Gene expression levels were normalized with GAPDH, and shown relative ratio to its in differentiated cells (B) ($p<0.05$).

물을 처리한 후 대조군과 비교하여 처리농도에 따라 각각 50~85%의 유전자 발현정도를 확인할 수 있었다. 반면 Fabp4의 mRNA 발현은 대조군과 비교하여 두부부산물을 처리하였을 때 유전자 발현의 큰 변화가 없음을 확인하였다. 또한 adipsin은 중성지방 acylation을 자극하여 complement peptide를 촉진하는 serine protease로서 배양지방세포에서 주로 확인되며, 분화 유도 과정에서 에너지 저장 신호와 관련하여 발현이 유도되는 것으로 알려져 있다[22]. 두부부산물을 처리하였을 때 지방분화세포에서 adipsin의 발현은 전체적으로 농도 의존적으로 억제되는 것으로 확인되었으며 특히 순물 추출물 10 ppm 농도 처리 시 그 발현량은 지방세포 분화 대조군에 비해 50% 미만으로 감소하였으며. 두유와 침지수를 처리하였을 때 농도의존적으로 adipsin의 발현이 100 ppm 농도에서 각각 45%, 28% 미만으로 감소하였다(Fig. 6). 이러한 지방대사 관련 유전자 중 일부 유전자들의 mRNA 발현을 억제하는 결과는 대두부산물이 지방대사 과정을 조절하여 지방세포의 분화를 조절함을 의미한다.

Adipokine에 대한 대두부산물의 효과

지방세포는 중성지방의 합성, 저장 기능뿐 만 아니라 여러 가지 hormone, cytokine 등의 분비를 통하여 비만과 당뇨 등의 여러 성인성 질환을 유발할 수 있다고 밝혀져 있다[13,26].

이러한 지방세포에서 분비되는 adipokines 으로 resistin (RETN), adiponectin (ADIPOQ) 등이 알려져 있다[23]. resistin은 지방의 세포질에 존재하며 유일하게 지방조직에서만 발현되며, PPARγ의 synthetic ligand인 thialidinedione (TZD)에 의해 발현이 감소된다고 알려져 있다[32]. 따라서 이들 adipokine 에 대한 발현정도을 분석하였다. 지방세포 분화 유도 시 발현되는 RETN은 대두부산물 처리 시 지방세포 분화 유도 대조군에 비해 발현의 차이 크게 나타나지 않았다. 반면 ADIPOQ는 대두부산물-침지수, 순물, 두유 추출물-을 처리하였을 때 모든 처리농도 조건에서 mRNA 발현이 급격히 감소하였다(Fig. 7). 따라서 대두부산물 추출물은 adipokine 중에서 adiponectin의 분비량을 감소시킴으로써 지방세포의 지방생성과 관련된 에너지 대사 조절에 관여하는 것으로 보여진다.

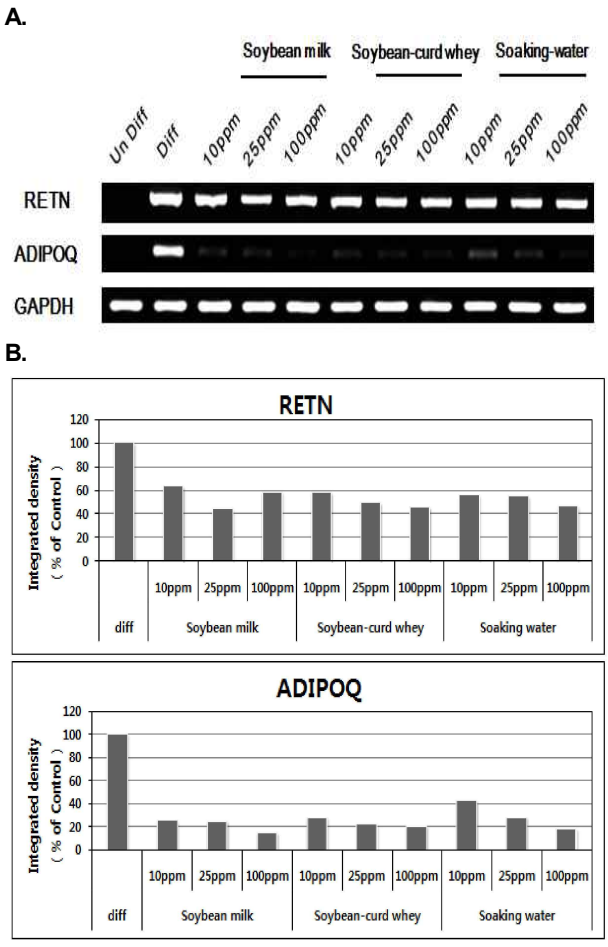

Fig. 7. Relative expression ratio of adipokines, LEP, RETN, ADIPOQ. Total RNAs were extracted from 3T3-L1 cells and expressions of adipokine genes were quantified by RT-PCR . Relative gene expression levels were shown in bar graph. All data were normalized with GAPDH mRNA levels and compared with its level in differentiated cells ($p<0.05$).

결과적으로 대두부산물 추출물은 분화 유도 물질 처리에 의한 전지방세포에서 지방세포로 분화 시 지방세포의 분화 억제 및 지방생성을 억제하는 것을 확인하였다. 대두부산물은 지방세포의 분화 과정에서 지방대사 및 에너지 대사를 조절하는 adipsin, Fabp4, adiponectin (ADIPOQ) 등의 유전자 발현을 억제하였으며, 이러한 유전자 발현양상은 대두부산물의 처리에 따른 지방세포 분화과정에서 지방함량 정도에 따른 Oil-Red O 염색결과와 일치하여 대두부산물 추출물의 처리가 지방합성 단계에서 일부 조절되고 있음을 의미한다. 또한 대두부산물 추출물이 PPARγ 발현량을 감소시키는 결과에 비추어 보았을 때 대두부산물의 지방세포 분화유도의 억제는, 분화유도 전사인자의 억제를 통하여 주로 나타나며 동시에 지방세포의 지방생성 억제 효과도 함께 보여지고 있다. 결국 대두부산물 추출물에 의한 지방세포분화 및 지방생성 억제는 지방분화 및 지방 대사 조절 관련 유전자의 발현을 통하여 조절되어 나타나는 것으로 판단되며, 전임상 실험을 통한 대두부산물 효능 검증을 통해 비만예방 및 억제제로서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 지식경제부 지역산업기술개발사업(지역연계기술개발사업: 과제번호 70006610)의 지원을 받아 수행된 연구이며 이에 감사드립니다.

References

1. Adlercreutz, H., Y. Mousavi, J. Clark, K. Hockerstedt, E. Hamalainen, K. Wahala, T. Makela, and T. Hase. 1992. Dietary phytoestrogens and cancer: *in vitro* and *in vivo* studies. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **41**, 331-337.
2. Ahn, I. S., K. Y. Pack, and M. S. Do. 2007. Weight control mechanisms and antiobesity functional agents. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **36**, 503-513.
3. Anne, W. H. and B. H. Joyce. 2001. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **280**, C807-C813.
4. Bae, E. A., T. W. Kwon, and G. S. Moon. 1997. Isoflavone contents and antioxidative effects of soybean, soybean curd and their by-products. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**, 371-375.5.
5. Barnes, S., H. Kim, T. G. Peterson, and J. Xu. 1998. Isoflavones and cancer-the estrogen paradox. *Korean Soybean Digest* **15**, 81-93.
6. Bondet. V., W. Brand-Williams, and C. Berset. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Food Sci. Technol.* **30**, 609-615.
7. Brun, R. P. and B. M. Spiegelman. 1997. PPAR gamma and the molecular control of adipogenesis. *J. Endocrinol.* **155**, 217-218.

8. Chin, H. S., K. J. Pack, S. H. Pack, and J. K. Kim. 2009. The effects of herbal extract mixture on anti-obesity. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 32-38.
9. Choi, J. S., T. W. Kwon, and J. S. Kim. 1996. Isoflavone contents in some varieties of soybean. *Foods Biotechnol.* **5**, 167-167.
10. Choi, Y. B., K. S. Kim, and H. S. Sohn. 1995. Recovery of soy-oligosaccharides using calcium oxide. *J. Food Sci.* **27**, 225-229.
11. Cook, K. S., D. L. Groves, H. Y. Min, and B. M. Spiegelman. 1985. A developmentally regulated mRNA from 3T3 adipocytes encodes a novel serine protease homologue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6480-6484.
12. Dnizot, F. D. and L. Rita. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* **22**, 271-277.
13. Flier, J. S. and E. Maratos-Flier. 1998. Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell* **92**, 437-440.
14. Frühbeck, G., J. Gómez-Ambrosi, F. J. Muruzábal, and M. A. Burrell. 2001. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **280**, E827-E847.
15. Galvez, A. F. and B. O. de Lumen. 1999. A soybean cDNA encoding a chromatin-binding peptide inhibits mitosis of mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **17**, 495-500.
16. Gregoire, F. M., C. M. Smas, and H. S. Sul. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* **78**, 783-809.
17. Hackler, L. R. and B. R. Stillings. 1967. Amino acid compostion of heat-processed soymilk and its correlation with nutritive value. *Cereal. Chem.* **44**, 70-77.
18. Harold, E. S., E. A. Darrell, I. F. Evan, and A. M. John. 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J. Nutr. Biochem.* **18**, 567-579.
19. Hwang, J., J. Wang, P. Morazzoni, H. N. Hodis, and A. Sevanian. 2003. The phytoestrogen equol increases nitric oxide availability by inhibiting superoxide production : an antioxidant mechanism for cell-mediated LDL modificarion. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 1271-1282.
20. Kaufman, P. B., J. A. Duke, H. Brielmann, J. Boik, and J. E. Hoyt. 1997. A comparative survey of leguminous plants as sources of the isoflavones, genistein and daidzein: implications for human nutrition and health. *J. Altern. Complement Med.* **3**, 7-12.
21. Kim, K. S., H. K. Chun, and H. S. Sohn. 1994. Purification of oligosaccharides from soybean using activated charcoal. *Korean J. Food Sci. Technol.* **3**, 156-156.
22. Kim, Y. J., B. H. Kim, S. Y. Lee, M. S. Kim, C. S. Pack, M. S. Rhee, K. H. Lee, and D. S. Kim. 2006. Screening of medicinal plants for development of functional food ingredients with anti-obesity. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **49**, 221-226.
23. Lau, D. C., B. Dhillon, H. Yan, P. E. Szmitko, and S. Verma. 2005. Adipokines: molecular links between obesity and atheroslcerosis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **288**, 2031-2041.
24. Lee, C. H., P. Olson, and R. M. Evans. 2003. Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology* **144**, 2201-2207.
25. MacDougald, O. A. and M. D. Lane. 1995. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 345-373.
26. Mohamed-Ali, V., J. H. Pinkney, and S. W. Coppack. 1998. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **22**, 1145-1158.
27. Potter, S. M. 1995.Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. *J. Nutr.* **125**, 606S-611S.
28. Ramírez-Zacarías, J. L., F. Castro-Muñozledo, and W. Kuri-Harcuch. 1992. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry* **97**, 493-497.
29. Rosen, E. D. and O. A. MacDougald. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 885-896.
30. Rosen, E. D., C. J. Walkey, P. Puigserver, and B. M. Spiegelman. 2000. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* **14**, 1293-1307.
31. Sharma, O. P., H. Adlercreutz, J. D. Strandberg, B. R. Zirkin, D. S. Coffey, and L. L. Exing. 1992. Soy of dietary source plays a preventive role against the pathogenesis of prostatitis in rats. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **43**, 557-564.
32. Spiegelman, B. M. and J. S. Flier. 2001. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* **104**, 531-543.
33. Steppan, C. M., S. T. Bailey, S. Bhat, E. J. Brown, R. R. Banerjee, C. M. Wright, H. R. Patel, R. S. Ahima, and M. A. Lazar. 2001. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409,** 307-312.
34. Wei, H., L. Wei, F. Frenkel, R. Bowen, and S. Barnes. 1993. Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation *in vitro* and *in vivo* by genistein. *Nutr. Cancer* **20**, 1-20.
35. Weiss, L. G., R. Hoffmann, E. Schreiber, H. Andres, E. Fuchs, and H. J. Kolb. 1986. Fatty-acid biosynthesis in man, a pathway of minor importance. Purification, optimal assay conditions, and organ distribution of fatty-acid synthesis. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* **367**, 905-912.

초록 : 대두부산물의 지방세포분화 유도유전자의 발현저해 및 전지방세포 분화 억제 효과

최미선[1] · 김지인[1,3] · 정진부[2] · 이수복[1†] · 정재남[1] · 정형진[2] · 서을원[1] · 김택윤[4] · 권오준[5] · 임재환[1]*
([1]안동대학교 생물학과, [2]안동대학교 생약자원학과, [3]경북대학교 의과대학 골격계 질환 유전체 연구센터, [4](주)하회마을 종합식품, 품질관리팀, [5]경북지역산업평가단)

대두는 여러 종류의 파이토케미컬을 함유하고 있으며 이에 의한 항산화, 항염증, 항비만 효능 등이 있음이 잘 알려져 있다. 대두 부산물 성분의 비만억제효능을 확인하기 위하여 Oil-Red O 염색법과 정량 PCR을 통하여 지방세포분화억제 및 지방생성억제 효능을 분석하였다. 분화유도물질인 isobutylmethylanthine (IBMX), dexamathasone 및 insulin 처리에 따른 지방세포 분화유도와 함께 대두부산물-침지수, 순물, 두유-의 처리는 세포손상 없이 지방세포분화 연관 유전자-PPARγ, Fabp4, Scd1, adipsin, apolipoprotein (APOE), adiponectin (ADIPOQ)-의 발현을 감소시키는 효능을 보였다. 또한 대두에서 잘 알려진 isoflavone -daidzein과 genistein- 분석을 통하여 대두 부산물에 포함된 두 종류의 isoflavone의 함량을 확인하였다. 결과적으로 대두부산물에는 지방세포분화유도 유전자의 발현억제를 통한 전지방세포의 분화 및 지방세포의 지방생성을 억제하고 있음을 확인하였다. 따라서 두부생산 시 발생하는 대두부산물은 지방세포분화 억제 효능을 바탕으로 이를 이용하는 건강기능식품제조에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.