ISSN : 1225-9918
Journal of Life Science **2011** Vol. 21. No. 9. 1346~1353 DOI : http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2011.21.9.1346

Inhibition of Adipocyte Differentiation through G1 Arrest by Extract of *Sophora tonkinensis* Gapnep in 3T3-L1 Preadipocytes

Hyun-Young Jeong[1], Sook-Kyung Hyun[2,5], Yung Hyun Choi[3,4,5], Byung-Woo Kim[1,4,5] and Hyun-Ju Kwon[1,4,5]*

[1]*Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Science, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea*
[2]*Department of Food Nutrition, College of Human Ecology, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea*
[3]*Department of Physiology and Biochemistry, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea*
[4]*Department of Biomaterial Control (BK21 program), Dong-Eui University Graduate School, Busan 614-714, Korea*
[5]*Blue-Bio Industry RIC, Busan, 614-714, Korea*

Received August 22, 2011 /Revised August 26, 2011 /Accepted August 29, 2011

Sophora tonkinensis Gapnep has been used as a traditional herbal medicine in oriental regions since ancient times. In this study, the effect and mechanism of the MeOH extract of *Sophora tonkinensis* Gapnep (STME) on adipocite differentiation and adipogenesis in 3T3-L1 preadipocites were investigated. Treatment with STME in the concentration range of 0-200 μg/ml significantly inhibited the differentiation of 3T3-L1 preadipocites in a dose-dependent manner, as determined by a decrease in intracellular lipid droplets and lipid contents measured by Oil Red O staining. In association with the inhibitory effect of lipid accumulation, the expressions of the proteins concerned with adipogenesis in 3T3-L1 preadipocites were also investigated. Treatment with STME reduced the expressions of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ), cytidine-cytidine-adenosine-adenosine-thymine (CCAAT)/enhancer-binding proteins α and β (C/EBPα and C/EBPβ) and sterol regulatory element binding protein (SREBP), which are adipocyte specific markers. In flow cytometry analysis, the inhibitory effect of differentiation was caused by G1 arrest and following mitotic clonal expansion cease. Therefore, we also investigated the alteration of G1 phase arrest-related proteins. As a result, the expression of p21 protein was significantly increased, while the expressions of Cdk2, E2F-1 and phospho-Rb were reduced in a dose-dependent manner in STME treated 3T3-L1 cells. According to these results, STME might inhibit differentiation through G1 arrest in 3T3-L1 preadipocytes adipogenesis, and further studies, which are in progress, have to be completed to identify the active compounds.

Key words : *Sophora tonkinensis* Gapnep., adipocyte differentiation, adipocyte specific marker, mitotic clonal expansion, G1 arrest

서 론

비만은 에너지의 섭취와 소비 불균형으로 발생하는 대사성 질환으로 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 심장질환, 암 발생 등 각종 성인병 및 만성 질환을 유발하는 원인으로 알려져 있다. 비만은 유전적 요인, 식생활 및 생활습관과 같은 개인의 생활환경적 요인에 따라 유발되는데 전 세계적으로 비만인구는 날로 증가 추세에 있으며, 한국도 식생활의 서구화와 생활습관의 변화에 따라 계속 증가 추세에 있어 비만 치료와 예방에 사회적 관심이 증대되고 있다. 이러한 시대, 사회적 요구에 부응하여 최근 많은 연구자들이 식품이나 천연물에서 부작용이 적고 효과적인 비만 치료제 또는 비만 예방 소재를 찾고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다[4,13,14].

***Corresponding author**
Tel : +82-51-890-1519, Fax : +82-51-890-1532
E-mail : hjkwon@deu.ac.kr

항비만 관련 소재 연구나 기작 연구에는 일반적으로 mouse embryo 유래의 지방전구세포를 이용한 3T3-L1 adipocyte differentiation system을 많이 사용하고 있다. 비만은 지방전구세포가 adipogenesis 과정에 의하여 성숙지방세포로 분화되고 여기에 섭취된 영양물 중의 triglyceride가 축적되어 지방세포 내에 과포화 지방구가 형성되어 유발된다[5-8]. Adipogenesis 과정은 insulin을 포함한 호르몬 자극과 함께 분화과정에 관여하는 유전자들의 발현에 필요한 전사인자들의 활성이 필수적이며, 크게 지방전구세포의 증식(preadipocyte proliferation), 성숙지방세포로의 분화(differentiation) 및 성숙지방세포의 증식(proliferation) 과정과 같은 3단계로 진행되고, 그 중 가장 중요한 differentiation 과정에서는 adipogenic signal induction, growth arrest (G1기), mitotic clonal expansion, re-enter cell cycle의 세부적인 단계를 거친다[15]. 이런 단계에 따라 관련 유전자들의 발현 양상도 달라지는데 먼저 분화초기에 전사인자 CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)

family로 알려진 C/EBPβ가 분화유도인자(adipogenic inducer)인 insulin, dexamethasone 및 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)의 자극에 의해 발현된다. 다음은 C/EBPβ가 signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β), cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2)와 같은 인산화 효소에 의해 활성형으로 변화하게 되고, 이때부터는 실질적으로 전사조절 인자로 작용하여 지방세포의 분화 및 증식에 중요한 역할을 담당하는 peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ)와 C/EBPα에 대해 유전자의 발현을 유도하게 된다[2,21,26,29]. 분화초기 조절인자 C/EBPβ가 활성화되어 분화후기 조절인자 PPARγ와 C/EBPα가 유도되는데 약 2일이 소요되며, 그 후 G1기에 정지되어 있던 지방 전구세포가 S기로 들어가면서 세포증식이 일어나기 시작하여 세포수가 3~4배 증가하는데, 이때를 mitotic clonal expansion 과정이라 한다. 이 과정은 지방세포 분화에 필수적인 과정이며 지방세포 성숙에 중요한 단계이다[21,25]. 성숙지방세포로의 분화 단계인 differentiation 과정은 수일에서 수주의 시간이 걸리며, 분화된 세포는 형태적으로 둥글게 되고, PPARγ와 C/EBPα의 발현으로 인해 실제로 지방세포의 표현형을 결정짓는 대부분의 유전자들이 조절되거나 그 발현이 활성화된다. 이들 유전자들로는 GPDH (glycerophosphate dehydrogenase), ACC (acetyl-CoA carboxylase), ME (malic enzyme), Glut4 (Glucose transporter type), IR (insulin receptor), aP2 (adipocyte selective fatty acid binding protein) 등이 있다. 이러한 과정을 통해서 중성지방의 지방구(lipid droplet)들이 세포질에 나타나게 되고, 시간이 지남에 따라 커지고 또 합쳐지면서 하나 혹은 몇 개의 큰 방울이 되어 지방세포의 분화가 완료된다[3]. 비만을 예방하거나 치료하기 위하여 이러한 분화과정을 적절히 조절하는 화합물을 탐색하는 것도 항비만 소재 개발에 관한 연구에 있어서 중요한 전략 중의 하나다. 지방세포의 분화는 growth arrest와 mitotic clonal expansion을 반복하면서 분화가 진행되는 특징을 가지고 있기 때문에 분화과정에 있는 지방세포를 growth arrest시켜 mitotic clonal expansion 단계로 진행되는 과정을 차단함으로써 항비만 효과를 나타낼 수 있다[12,17,24].

산두근(山豆根, *Sophora tonkinensis* Gapnep)은 콩과에 속하는 땅비싸리의 뿌리와 뿌리줄기를 말하는 것으로 주로 우리나라와 중국 등지에 분포하고 있으며, 8~9월경에 뿌리를 채취하여 깨끗이 씻은 다음 햇볕에 말려 주로 약재로 사용한다[28]. 산두근에 대한 연구로는 국내에서 여러 유형의 백혈병 환자에 대한 효능과 폐암세포에 대한 항암효과가 보고되어 있으며 식중독성 미생물에 대해 항균효과가 있는 것으로 보고되어 있다[1,11,16].

본 연구는 지방세포 분화를 억제하는 항비만 소재를 탐색하던 중 산두근(山豆根, *Sophora tonkinensis* Gapnep) 메탄올 추출물이 insulin, dexamethasone 및 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)이 포함된 분화유도인자로 adipogenesis 과정을 유발시킨 지방전구세포인 3T3-L1 세포에서 어떠한 영향을 미쳤는지 조사하였고, 그 결과 산두근 추출물이 분화과정에서 세포의 성장을 G1기에서 정지시킴으로써 분화를 억제할 뿐만 아니라 이미 분화가 완료된 성숙지방세포에서도 지질축적의 감소 효과를 확인하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

산두근 메탄올 추출물(STME)의 제조

본 실험에 사용한 산두근(*Sophora tonkinensis* Gapnep)은 삼흥건재약업사(서울)에서 구입한 후, 잘게 세절하여 분말화한 후, 산두근 100 g에 메탄올 2 l를 첨가하여 75℃에서 3시간 동안 3회 추출하였다. 추출액을 Whatman No.2 paper (Whatman international Ltd., England)로 여과하여 불순물을 제거하고 그 여액을 감압 농축기를 사용하여 45℃에서 감압, 농축하여 추출물 19.2 g을 얻었으며 이를 STME (*Sophora tonkinensis* Gapnep. MeOH extract)로 명명하고 -70℃ 초저온 냉동고에 보관하면서 사용하였다. 실험 시에는 이 추출물을 DMSO에 녹여 500 mg/ml의 농도로 만든 다음 이를 적정한 농도로 희석하여 사용하였다.

3T3-L1 지방전구세포의 배양 및 성숙지방세포로의 분화유도

본 실험에 사용한 3T3-L1 (mouse embryonic fibroblast cell line) 지방전구세포는 미국세포은행(American Type Culture Collection: ATCC, USA)에서 분양 받아 사용하였다. 세포의 배양은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에 10% bovine calf serum (BCS, Gibco BRL)과 100 units/ml의 penicillin 및 streptomycin (Gibco BRL)을 첨가하고 37℃, 5% CO_2 조건 하에서 배양하였다. 지방전구세포에서 성숙지방세포로의 분화는 몇 단계를 거치면서 진행되기 때문에 각 단계를 날짜 별로 표기하였다. 먼저 3T3-L1 세포가 cell dish에서 confluent 상태가 되었을 때를 Day 0이라고 하며 이때, 분화유도제로 사용되는 insulin, dexamethasone 및 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)을 각각 10 μg/ml, 0.25 μM, 0.5 mM 첨가하여 분화를 유도하고 2일간 배양하였다(Day 2). 또한 지방세포로의 분화를 촉진하기 위해 10 μg/ml의 insulin을 첨가하고 2일간 더 배양하였다(Day 4). 여기에 배지 교환과 10 μg/ml의 insulin 첨가 후 2일간 더 배양한 상태를 Day 6이라 하며 성숙지방세포의 실험을 행하였다.

세포 내 지방입자의 염색 및 정량(Oil Red O 염색)

3T3-L1 지방전구세포에서 성숙지방세포로의 분화 및 분화억제는 Oil Red O 염색법을 이용하여 분화 시에 형성되는 지방구를 염색하여 확인하였다. STME는 Day 0, 2, 4, 6의 단계마

다 배지 교환 시 함께 처리하였으며 농도는 10~200 ug/ml 범위로 처리하였다. 대조군으로 0.5% DMSO만 처리하여 배양한 3T3-L1 지방전구세포를 사용하였으며, 실험군과 대조군 모두 완전한 지방세포로의 분화가 이루어진 시점에 모든 plate의 배지를 제거하고 차가운 phosphate buffered saline (PBS)으로 세포를 세척한 뒤, 10% formalin을 처리하여 실온에서 1시간 고정시켰다. Formalin을 완전히 제거한 다음 60% isopropanol로 세척한 뒤 Oil Red O working solution을 넣고 실온에서 10분간 염색을 하였다. 이 때 Oil Red O working solution은 Oil Red O powder 0.35 g을 100 ml의 isopropanol에 녹인 뒤 증류수에 6:4의 비율로 희석한 다음 여과하여 사용하였다. 세포를 염색한 뒤 Oil Red O working solution을 완전히 제거한 다음 증류수로 4번 세척하고 위상차현미경으로 세포의 염색 상태를 관찰하였다. 또한 정량적 분석을 위하여 100% isopropanol로 세포로부터 지방을 용출시켜 spectrophotometer를 이용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하여 중성지방의 축적량을 계산하였다.

세포증식 속도 측정(Mitotic clonal expansion 저해 효능)

지방세포의 분화과정에서 mitotic clonal expansion 과정은 필수적이며 분화유도제로 분화를 인위적으로 유도시킬 때 분화초기 2일안에 일어난다. 따라서 STME가 지방전구세포 3T3-L1의 분화과정 중 mitotic clonal expansion 과정에 미치는 영향을 조사하기 위하여 3T3-L1 지방전구세포를 60 mm dish에 1×10^5 cells/dish의 농도로 분주하여 배양 한 다음 day 0 때에 분화유도제와 STME를 농도별(10, 50, 100, 200 μg/ml)로 처리하여 배양하였다. Day 0, 1, 2의 세포를 각각 회수하고 trypan blue assay 법[12]으로 염색하여 3T3-L1 지방전구세포의 증식속도를 측정하였다. 배양한 세포를 배지를 제거하고 0.05% trysin-EDTA를 처리하여 세포를 부유시켜서 PBS를 적당량 첨가하여 세포를 모았다. 이것을 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 다시 1 ml의 PBS와 0.4% trypan blue solution (SIGMA)을 첨가하여 2분간 처리하여 살아 있는 세포수를 위상차현미경(inverted microscope, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 계수하였다.

Flow cytometry 분석에 의한 세포주기 변화 측정

3T3-L1 지방전구세포를 60 mm dish에 1×10^5 cells/dish의 농도로 분주하여 배양하여 confluent 상태가 된 day 0 때에 분화유도제와 STME를 농도별(10, 50, 100, 200 μg/ml)로 처리하였다. 그 후, 3T3-L1 지방전구세포의 doubling time인 14시간 후에 세포를 회수하여 PBS로 세척하고 100% ethanol을 이용하여 4℃에서 고정시켰다. 고정된 세포는 분석 전에 PBS로 세척하고 ribonuclease A를 최종농도 1 μg/ml이 되도록 첨가한 다음 실온에서 30분간 반응시켰다. 세포주기 변화는 PI/RNase staining buffer (BD Pharmingen™)용액을 500 μl 첨가한 후 유세포 분석기(FACS, Becton Dickinson, San Jose, CA)로 분석하였으며 결과는 Cell Quest program을 이용하여 분석하였다.

Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

세포주기 변화 측정과 동일한 상태의 세포를 배양하여 회수하였다. 세포 내의 총 단백질 정량을 위한 전기영동을 실시하기 위하여 회수한 세포를 PBS로 한번 세척한 후 CSK 완충액 [100 mM Pipes (pH 6.8), 100 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol (DTT)]에 0.1% Triton X-100, 1 mM ATP와 1% Protease inhibitor Cocktail (BD Pharmingen™)이 첨가된 용액으로 현탁하여 15분간 반응 시킨 후 초음파 파쇄기로 파쇄 하였다. 파쇄 한 세포는 14,000 rpm에서 20분간 원심 분리하였으며, 상등액 내의 단백질량은 BCA법을 이용하여 정량한 후 동량의 단백질(25 ug)을 sodium dodecyl sulfate (SDS) - polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 하였다. 전기영동 후 gel 내의 단백질을 PVDF membrane에 전사시킨 후 blocking solution [0.15 M NaCl, 1 M Tris-HCl (pH7.5), 0.1% Triton X-100, 5% BSA]을 사용하여 4℃에서 16시간 blocking 시켰다. 1차 항체는 4℃, 16시간 반응시켰으며, TBS buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.15 M NaCl, 0.1% Triton X-100]를 사용하여 membrane을 세척한 다음 2차 항체를 넣고 4℃, 16시간 반응시켰다. Membrane을 세척한 후 면역반응 단백질은 화학발광 시스템 (Chemiluminescence system; Super Signal West Femto Maxium sensitivity Substrate, Pierce, USA)으로 검출하였다. Western blotting에 사용된 C/EBPα, C/EBPβ의 1차 항체는 Cell signaling Technolgy (Beverly, MA, USA)에서 구입하였으며 PPARγ, SREBP1c, p21, p27, CyclinE, Cdk2, Rb, Phospho-Rb, E2F-1 등의 1차 항체 및 anti-mouse IgG와 anti-rabbit IgG는 Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

결 과

STME의 성숙지방세포에서의 중성지방 축적 억제 효과

산두근(*Sophora tonkinensis* Gapnep)은 콩과에 속하는 약재로 이미 백혈병, 폐암세포에 항암 효과 및 식중독 미생물에 항균효과를 가지고 있는 것으로 보고되어 있다[1,11,16]. 오늘날 비만은 질병으로 분류하고 있으며 무한 증식을 가장 큰 특징으로 하는 암세포와 비슷하게 비만세포 또한 계속적인 증식을 이어나가며 세포 내에 중성지방을 축적하는 또 다른 특징을 가지고 있다. 따라서, 산두근 메탄올 추출물(STME)이 지방세포의 분화 및 중성지방 축적에 어떠한 영향을 미치는지 검토하기 위하여 3T3-L1 지방전구세포의 성숙지방세포로의 유도와 함께 STME를 각각 10, 50, 100, 200 μg/ml로 처리

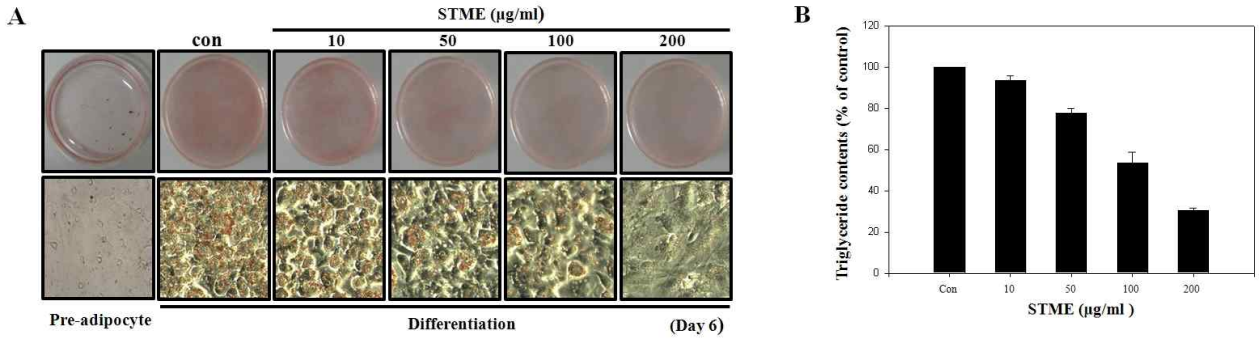


Fig. 1. Inhibitory effects of STME on the lipid droplet accumulation in 3T3-L1 adipocytes. Post-confluent 3T3-L1 preadipocytes (day 0) were stimulated for 2 days with adipogenic inducer (insulin, dexamethasone and 3-isobutyl-1-methylxanthine) containing indicated concentration (0, 50, 100, 200 μg/ml) of STME. On day 2, the adipogenic inducer was replaced with DMEM/10% FBS culture medium containing 10 μg/ml insulin and STME. After 6 days cultivation, the cells were fixed with 10% formalin and stained with Oil Red O to visualize lipid droplets by light microscopy. (A) Microphotographs shows lipid droplets stained with Oil Red O. Magnification, ×200 (B) Stained intracellular lipid droplets were eluted with 100% isopropanol and quantified triglyceride contents by spectrophotometrical analysis at 500 nm.

하였다.

앞서 재료 및 방법에서도 설명하였듯이, 지방전구세포에서 성숙지방세포로의 유도 및 분화에는 몇 가지의 단계(Day 0, 2, 4, 6)와 분화유도제를 필요로 한다. STME의 중성지방 축적 억제효과는 가장 마지막 단계인 Day 6, 즉 분화가 완료된 성숙지방세포에서 Oil Red O 염색 후 위상차현미경으로 관찰하였다. Fig. 1A의 결과에 제시한 것처럼 Day 6 때의 분화 유도가 끝난 성숙지방세포의 세포 형태 및 지방세포 내의 중성지방 축적(lipid droplet)량은 대조군에 비해 STME를 농도별로 첨가한 세포에서는 농도 의존적으로 지방 축적량이 감소되는 것을 확인 할 수 있었으며, 200 μg/ml의 농도에서는 현저한 차이를 확인할 수 있었다. 중성지방 축적량을 정량적으로 조사하기 위하여 중성지방을 염색한 Oil Red O 염색 성분을 isopropanol로 용해시킨 후 흡광도를 측정 하였다. 그 결과 Fig. 1B에 나타낸 것과 같이 대조군에 비해 농도 의존적으로 감소함을 알 수 있었으며 STME 처리 최고 농도인 200 μg/ml에서는 약 70% 정도 지방 축적량이 감소됨을 확인하였다.

이러한 중성지방 축적의 현저한 감소는 STME에 의한 기능적인 활성인지 혹은 지방전구세포에 독성으로 인한 세포의 사멸에 의한 것인지 검토할 필요가 있었다. 따라서 10~200 μg/ml 범위의 농도에서 3T3-L1 지방전구세포에 대한 세포 독성을 검토한 결과 실험한 모든 농도에서 90% 이상의 생존율을 보였으므로 현재 실험 범위의 농도에서는 STME의 독성에 의한 효과가 아니라 중성지방 축적 억제 효과에 의한 것임을 알 수 있었다(data not shown).

STME의 mitotic clonal expansion (MCE) 억제 효과

지방전구세포에서 성숙지방세포로의 분화는 지방전구세포의 증식(preadipocyte proliferation), 성숙지방세포로의 분화(differentiation), 성숙지방세포의 증식(proliferation)으로 나누어 진행되지만, 지방세포로의 분화가 일어나기 위해서는 adipogenic signal induction, growth arrest (G1 phase), mitotic clonal expansion, re-enter cell cycle과 같은 아주 복잡하고 질서 정연한 단계를 거친다[3]. 이중 mitotic clonal expansion 단계는 정지되었던 세포주기가 분화유도제의 자극에 의해 세포주기가 다시 움직여 세포 수가 2~4배 증가하는 단계이다. 이 mitotic clonal expansion 단계를 억제하면 성숙지방세포로의 분화가 더 이상 진행되지 않는다는 연구 결과가 이미 보고되어 있다[12,17,24]. 따라서 본 연구는 STME가 이러한 활성을 나타내는지 알아보기 위하여 3T3-L1 지방전구세포의 분화유도를 위하여 분화유도제를 처리함과 동시에 STME를 100, 200 μg/ml의 농도로 처리하여 Day 1, Day 2의 기간 동안 세포수의 변화를 측정하였다. Fig. 2의 결과와 같이 대조군으로 사용한 3T3-L1의 경우 Day 0에서 분화유도제를 첨가하고 분화유도 하였을 때 Day 1에서 1.9배, Day 2에서 2.4배로 세포수가 증가하는 것을 확인하였다. 하지만 STME 100 μg/ml를 첨가한 경우, Day 1에서 1.3배, Day 2에서 1.7배 증가하였으며 200 μg/ml의 농도에서는 Day 1에서 1.3배, Day 2에서 1.3배로 더 이상의 세포수 증가를 확인할 수 없었다. 이상의 결과로 STME는 3T3-L1의 mitotic clonal expansion 단계를 억제시키는 것을 알 수 있었다.

STME의 지방세포 분화 조절 인자들의 발현에 미치는 영향

지방전구세포에서 성숙지방세포로의 분화는 복잡한 단계를 거치게 되며 관련된 여러 조절인자들의 발현 촉진 과정을 거치게 된다. 이러한 분화 과정에서 가장 중추적인 역할을 하는 것이 peroxisome proliferation activated receptor gamma (PPARγ)와 CCAAT enhancer binding protein (C/EBP) fam-

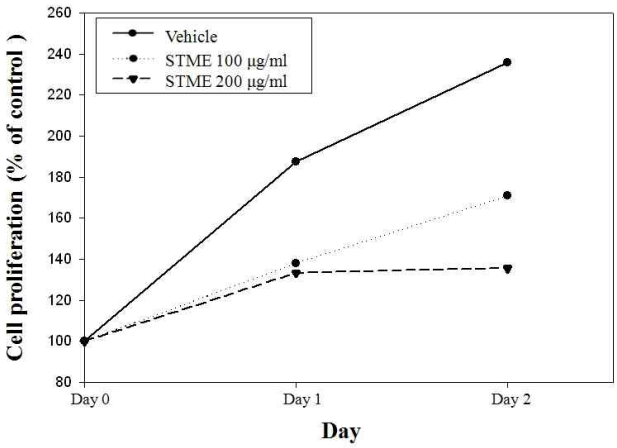


Fig. 2. The effects of STME on proliferation of 3T3-L1 preadipocytes stimulated by adipogenic inducer. Post-confluent 3T3-L1 preadipocytes were caused to differentiate with adipogenic inducer with STME. Trypan blue exclusion assay was performed at Day 0, Day 1 and Day 2 for viable cell counting.

ily라고 불리는 전사인자들이다[9,19]. 분화 유도 물질은 이러한 전사 인자들의 발현을 촉진시킴으로써 지방전구세포를 지방세포로 분화시킨다[12,13]. 먼저C/EBPβ는 전구지방세포에서 분화유도제에 의해 발현 유도되어 실질적인 지방세포 분화를 담당하는 PPARγ와 C/EBPα의 발현을 유도하는 단백질로 분화초기 clonal expansion (Day 2) 과정에서는 발현량이 많으나 성숙지방세포(Day 6)가 되면 발현이 저하되는 특징을 나타낸다. 한편, C/EBPα는 PPARγ의 발현을 유도할 뿐만 아니라 PPARγ와 협력하여 지방세포의 성숙분화를 담당하는 유전자의 발현을 제어하고 있는 것으로 알려져 있다[20]. PPARγ는 핵 내 수용체형의 전사인자로써 같은 수용체형 전사인자 RXRα (retinoid X receptor α)와 heterodimer를 형성하여 여러 종의 지방산이나 지방산 대사산물의 내인성 ligand로써 결합하여 전사능이 활성화된다. 또한, 지방세포의 성숙분화시기에 유도되며 지방세포 특이적 유전자의 promoter영역에 존재하는 PPAR 결합영역인 PPRE (PPAR responsive element)에 결합하여 그 유전자의 발현을 유도한다[20]. 따라서 여기서 언급한 초기의 C/EBPβ, 성숙기의 PPARγ와 C/EBPα의 발현에 STME가 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다. 세포는 2가지 단계로 MCE 단계(Day 2)와 완전분화 단계(Day 6)의 세포를 이용하였으며, 단백질 발현량의 변화는 Western blot analysis를 행하여 확인하였다. 그 결과 Day 2 (Fig. 3A)와 Day 6 (Fig. 3B)에서 이들 전사인자들의 확연한 발현 차이를 확인할 수 있었다. 먼저, Fig. 3A의 결과에 의하면 지방세포 분화초기단계에 발현이 유도되는 C/EBPβ는 Day 2의 단계에서 농도 의존적으로 발현이 저하되는 것을 확인하였다. 완전분화 단계의 Day 6 (Fig. 3B)의 결과에서는 C/EBPα가 STME 농도에 따라 농도 의존적으로 발현이 확연히 저하되는 것을 확인할 수 있

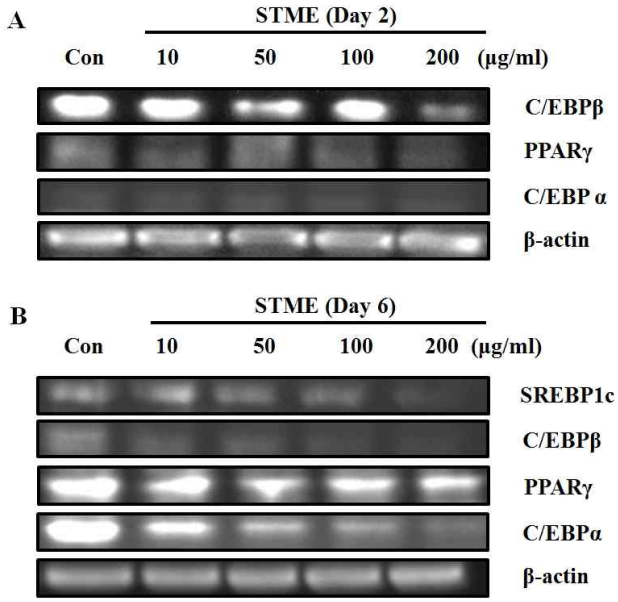
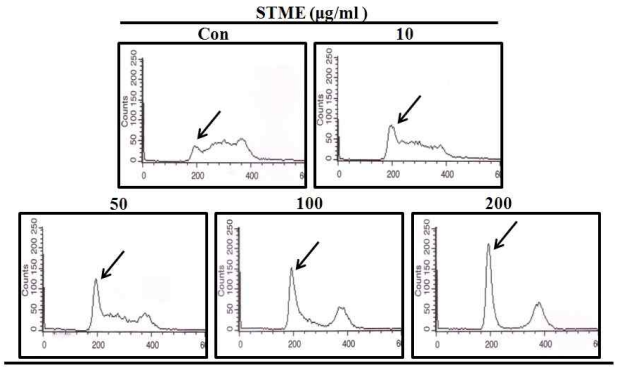


Fig. 3. Effects of STME on the expression of adipocyte specific proteins. (A) Post-confluent 3T3-L1 preadipocytes were incubated with adipogenic inducer for 2 days (Day 2) in the absence or presence of STME. (B) Post-confluent 3T3-L1 preadipocytes were incubated in adipogenic inducer for 2 days and media were changed to DMEM containing insulin for 2 days (Day 6) in the absence or presence of STME. Protein samples were subjected to Western blot analysis.

었으며 PPARγ 또한 발현이 저하되었다. SREBP1c의 유전자 또한 발현이 농도 의존적으로 저하됨을 확인하였으며 이 유전자는 지방산이나 콜레스테롤 합성에 필수 전사인자인 SREBP (sterol regulatory element binding protein)의 하나이며 PPARγ ligand 생성에도 관여하는 것으로 보고되어 있다[20]. 따라서 STME는 지방세포 분화 및 지방산 합성 관련 유전자의 발현을 억제하여 성숙지방세포로의 분화 및 지방 축적을 억제하는 것으로 사료된다.

STME의 처리에 의한 세포주기의 변화분석

앞선 결과에 의하면 STME의 처리에 따라 MCE의 억제(Fig. 2) 및 관련 유전자들의 발현 억제(Fig. 3)를 확인 할 수 있었다. 지방전구세포는 분화유도제에 의해 세포가 증식-분화-증식의 다단계를 거치면서 성숙지방세포로 분화되기 때문에[25] STME가 이러한 세포주기 변화에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 3T3-L1 지방전구세포(Day 0)에 분화유도제와 STME를 처리하여 세포주기 변화가 확인 가능한 14시간째에 회수하여 FACS analysis를 시행하였다. Fig. 4에서 확인되는 것처럼 분화유도제만 처리한 대조군에서는 sub-G1기의 개체군이 6.7%, G1기 개체군이 16.9 %, S기 개체군이 42.17%, G2/M기 개체군이 41.3%로 세포주기 별로 고루 분포하고 있음을 확인할 수 있었다. 이에 비해 STME를 처리한 세포에서는



STME (μg/ml)	% of cell			
	Sub G1	G1	S	G2/M
Con	6.67	16.9	42.17	41.26
10	2.55	33.68	38.21	28.49
50	6.47	39.39	31.43	29.53
100	10.51	48.03	16.46	35.51
200	10.68	55.94	5.11	38.83

Fig. 4. STME causes G1 arrest in differentiation induced 3T3-L1 preadipocytes. Post-confluent cells were treated with dimethylsulfoxide (vehicle) or STME in a medium containing adipogenic inducer. Following incubation the cells were harvested, permeabilized, stained with propidium iodide and analyzed by flow cytometer.

STME의 농도가 10, 50, 100, 200 μg/ml으로 증가할수록 G1기 개체군의 비율이 33.68%, 39,39%, 48.03%, 55.14%로 계속 증가되었으며, 상대적으로 S기 개체군의 비율이 38.2%, 31.4%, 16.5%, 5.1%로 점점 감소하는 것을 알 수 있었다. 즉, STME의 처리 농도가 증가될수록 세포들은 세포주기에서 G1기의 분포가 높아져 STME는 지방전구세포의 G1 arrest를 유도함을 확인 할 수 있었다.

STME의 처리에 의한 세포주기의 G1 arrest 관련 단백질들의 발현 변화

Fig. 4의 결과에서 STME는 3T3-L1 세포의 세포주기를 G1기에서 정지시킴으로서 분화를 억제하는 것을 확인 할 수 있었다. 이것을 보다 명확하게 분석하기 위해서 G1 arrest에 관계하는 단백질들의 발현량의 변화를 검토하기 위하여 3T3-L1 지방전구세포(Day 0)에 분화유도제와 STME를 처리하여 14시간 반응시킨 후 회수하여 Western blot analysis를 시행하였다. 확인한 단백질은 세포주기 G1기에서 S기로의 전이에 필수적인 단백질인 Cdk2, pRb, phospho-pRb 및 전사인자 E2F-1과, G1기 전이를 저해하는 Cdk inhibitor p21의 발현 변화를 확인하였다(Fig. 5). 그 결과, STME의 처리 농도가 증가될수록 Cdk2의 발현량이 감소되었으며, Rb 단백질의 인산화가 확연하게 감소함과 동시에 전사인자인 E2F-1의 발현 감소가 확인되었다. 더 뚜렷한 변화는 Cdk2 inhibitor인 p21의 발현량이 현저하게 농도 의존적으로 증가함을 확인 할 수 있었다. 이와

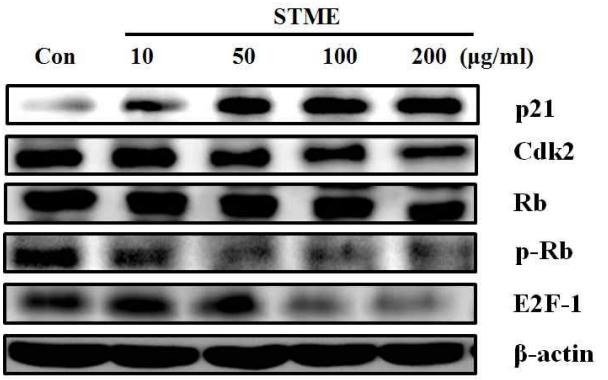


Fig. 5. Alteration of G1 cell cycle arrest-related proteins expression in 3T3-L1 preadipocytes treated with STME. Post-confluent 3T3-L1 preadipocytes were incubated in adipogenic inducer for 14 hr with or without STME. Cells were lysed and cellular proteins were analyzed by Western blot analysis.

같은 결과는 STME의 처리에 의해 p21의 발현량이 증가되며 이로 인해 Cdk2의 활성이 억제되고, 이어서 전사인자인 Rb의 인산화를 저하시켜 세포주기가 G1기에서 정지되는 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 천연물인 STME (*Sophora tonkenesis* Gapnep, MeOH extract)를 이용하여 지방세포의 분화억제 및 그 작용기작에 대해 조사하였다. 사용된 세포는 지방세포의 전구세포로 알려져 있는 3T3-L1 세포를 이용하였으며 이 세포의 특징은 미분화 상태를 유지하다가 분화유도제(insulin, dexamethasone, 1-methyl-3-isobutylxanthine, prostaglandin F2α 등)를 첨가할 경우 성숙 지방세포로 분화하는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서 지방세포의 특징인 지방구형성(지방축적)에 미치는 영향을 관찰한 결과, STME는 3T3-L1 지방전구세포가 지방세포로 분화되는 것을 억제하고 중성지방의 축적을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 지방전구세포에서 성숙지방세포로의 분화는 C/EBP와 PPARγ를 중심으로 수백 개의 유전자 발현이 조절되어 일어나는 복잡한 과정이다. 초기 분화에서 발현되는 C/EBPβ는 C/EBPα와 PPARγ의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. C/EBPβ가 제거된 마우스에서는 지방세포가 형성되지 않는 것이 확인되어 지방세포의 분화에 C/EBPβ가 중요한 역할을 한다는 사실이 보고되어 있다[23]. 그래서 본 연구에서 STME가 지방세포 분화초기에 발현하는 C/EBPβ의 발현에 미치는 영향을 조사하였더니 C/EBPβ의 발현량이 STME의 처리에 의해 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 3A). 지방세포의 분화에 핵심전사인자인 C/EBPα와 PPARγ에 대한 STME의 효과도 관찰하였다. 여러 앞선 연구

에서 PPARγ와 C/EBPα가 지방세포분화에서 매우 중요한 역할을 담당한다고 보고되어 있다[2,21,26,29]. Fig. 3B는 STME가 지방세포 분화 유도 시, PPARγ와 C/EBPα의 발현에 어떤 영향을 주는지 보여준다. STME를 처리 하지 않고 분화시킨 3T3-L1 세포에서는 PPARγ와 C/EBPα 발현량이 크게 증가하였다. 그러나 STME처리에 의해 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하였다. Fig. 3의 결과에 의하면 STME에 의해 지방세포 분화초기에 C/EBPβ의 발현량이 감소되었고, 이것이 PPARγ와 C/EBPα의 발현 저하에 영향을 주었다고 사료된다. 즉, 이러한 전사인자들의 발현양상은 STME가 지방세포의 분화과정에서 일어나는 지방축적 저하와 일치하여 분화관련 전사인자들의 발현을 조절하여 지방합성을 조절하고 있음을 알 수 있었다. 또한 STME는 지방세포의 가장 큰 특징인 mitotic clonal expansion을 억제하며(Fig. 2) 세포주기를 G1기에 정지시키는 G1 arrest 효과를 강력하게 나타냈다(Fig. 4). 특징적으로 Cdk inhibitor 인 p21의 발현량이 STME의 처리 농도 의존적으로 현저하게 증가하는 것을 확인 할 수 있었으며 p21의 증가에 따라 Cdk의 발현저하, Rb 단백질의 탈인산, E2F의 감소 등도 관찰되어 이러한 세포주기 관련 단백질들의 발현 제어에 의해 3T3-L1 세포의 분화과정 중 G1 arrest가 강력하게 일어나고 있음을 알 수 있었다.

산두근은 현재까지 항염증, 항암 및 항균 작용 등이 보고되어 있으나[1,11,16] 비만세포의 분화 억제에 관한 내용으로는 처음 보고하는 것으로, 산두근의 메탄올 추출물임에도 불구하고 G1 arrest에 의한 분화억제, 지방축적 억제, 유전자 레벨의 제어기전이 분명한 항비만 천연물 소재로서의 가능성을 확인하였으며, 이러한 생리활성 기능을 가진 활성 단일 성분을 분리하여 그 구조를 규명하는 연구를 현재 진행 중에 있다.

감사의 글

이 연구는 동의대학교 교내 연구비(2010AA106)의 지원에 의해 이루어졌습니다.

References

1. Bae, J. H. 2004. Antimicrobial effect of *Indigofera Kirilowii* extraction food-borne pathoegen. *J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.* **33**, 1106-1111.
2. Brun, R. P., J. B. Kim, E. Hu, S. Altiok, and B. M. Spiegelman. 1996. Adipocyte differentiation : a transcriptional regulatory cascade. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 826-832.
3. Fajas, L., J. C. Fruchart, and J. Auwerx. 1998. Transcriptional control of adpogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**. 165-173.
4. Grandy, S. H. 2004. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* **89**, 2595-2600.
5. Green, H. and O. Kehinde. 1974. Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell* **1**, 113-116.
6. Green, H. and M. Meuth. 1974. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* **3**, 127-133.
7. Green, H. and O. Kehinde. 1975. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture Ⅱ. Factors affection the adipose conversion. *Cell* **5**, 19-27.
8. Green, H. and O. Kehinde. 1976. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell* **7**, 105-113.
9. Gregoire, F. M., M. S. Cynthia, and H. S. Sul. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* **78**, 783-809.
10. Holm, C. 2003. Molecular mechanisms regulation hormone sensitive lipase and lipolysis. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 1120-1124.
11. Kim, K. T., H. S. Eom, and G. Y. Chi. 2004. Anti-proliferative effect of RST associated with the inhibition of cyclo-oxygenase-2 expression and prostaglandin E2 release in human lung carcinoma cells. *Korean J. Ori. Med. Phywiol. Pathol.* **21**, 907-915.
12. Kim, S. H., H. S. Park, M. S. Lee, Y. J. Cho, Y. S. Kim, J. T. Hwang, M. J. Sung, M. S. Kim, and D. Y. Kwon. 2008. Vitisin A inhibits adipocyte differentiation through cell cycle arrest in 3T3-L1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **372**, 108-113.
13. Kopelman, P. G. 2000. Obesity as a medical problem. *Nature* **404**, 635-643.
14. Must, A., J. Spadano, E. H. Coakley, A. E. Field, G. Colditz, and W. Dietz. 1999. The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA.* **282**, 1523-1529.
15. Otto, T. C. and M. D. Lane. 2005. Adipose development : from stem cell to adipocyte. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **16**, 145-171.
16. Pae, H. O., C. K. Lim, S. I. Jang, D. M. Han, A. W. Gun, S. Y. Yoon, B. H. Chon, W. S. Kim, and Y. G. Yun. 2003. Review of anti-leukemia effects from medicinal plants. *Korean J. Ori. Med. Phywiol. Pathol.* **17**, 605-610.
17. Qiu, Z., Y. Wei, N. Chen, M. Jiang, J. Wu, and K. Liao. 2001. DNA synthesis and mitotic clonal expansion is not a required step for 3T3-L1 preadipocyte differentiation into adipocytes. *J. Biol. Chem.* **276**, 11988-11995.
18. Rinignac, L. A., M. P. Leibovitch, M. Kitzmann, A. Fernandez, and B. Ducommun. 2000. Cyclin E-Cdk2 phosporylation promotes late G1-phase degradation of MyoD in muscle cells. *Exp. Cell. Res.* **259**, 300-307.
19. Rodriguez, A. M., C. Elabd, F. Delteil, J. Astier, C. Vernocher, P. S. Marc, J. Guesnet, A. Guezennec, E. Z. Amri, C. Dani, and G. Ailhaud. 2004. Adipocyte differentiation of multipotents cells established from human adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **315**, 255-263.
20. Rosen, E. D. and M. S. Bruce. 2000. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 145-171.
21. Saitoa, T., D. Abea, and K. Sekiya. 2009. Flavanone exhibits PPARγ ligand activity and enhances differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **380**, 281-285.

22. Sherr, C. J. and J. M. Roberts. 1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* **9**, 1149-1163.
23. Tanaka, T., N. Yoshida, T. Kishimoto, and S. Akira. 1997. Defective adpocyte differentiation in mice lacking the C/ECPbeta and/or C/ECPdelta gene. *EMBO. J.* **16**, 7432-7443.
24. Tang, Q. Q. and M. D. Lane. 1999. Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancer-binding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocyte differentiation. *Genes Dev.* **13**, 2231-2241.
25. Tang, Q. Q., T. C. Otto, and M. D. Lane. 2003. Mitotic clonal expansion: A synchronous process required for adpogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 44-49.
26. Wu, Z., Y. Xie, and N. L. Bucher. 1995. Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis. *Genes Dev.* **9**, 2350-2363.
27. Weinberg, R. A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-330.
28. Yook, C. S. 1997. Colored medicinal plants of Korea. Academy Publishing Co. Inc., Seoul, Korea.
29. Zhang, J. W., Q. Q. Tang, C. Vinson, and M. D. Lane. 2004. Dominant-negative C/EBP disrupts mitotic clonal expansion and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 43-47.

초록 : 산두근 추출물의 세포주기 정지를 통한 3T3-L1 지방전구세포의 분화 억제

정현영[1] · 현숙경[2,5] · 최영현[3,4,5] · 김병우[1,4,5] · 권현주[1,4,5]*
([1]동의대학교 생명응용학과, [2]동의대학교 식품영양학과, [3]동의대학교 한의학과, [4]동의대학교 대학원 바이오물질제어학과, [5]블루바이오 소재 개발 센터)

산두근(*Sophora tonkinensis* Gapnep)은 예로부터 동양지역에서 전통적인 약용식물로 사용되어 왔다. 본 연구에서는 3T3-L1 지방전구세포의 성숙지방세포로의 분화와 세포 내 지방생성에 대한 산두근 메탄올 추출물(STME)의 효과와 메커니즘에 대해 조사하였다. STME를 0-200 μg/ml의 농도로 처리한 다음, Oil Red O 염색으로 세포 내 축적되는 지방구와 지질의 양을 측정한 결과 농도의존적으로 크게 감소됨을 확인하였으며 3T3-L1 지방전구세포의 분화와 관련된 단백질의 발현의 변화를 조사하였다. 지방세포의 특이적 marker인 peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ), cytidine-cytidine-adenosine-adenosine-thymine (CCAAT)/enhancer-binding proteins α, β (C/EBPα, C/EBPβ) 그리고 sterol regulatory element binding protein (SREBP)의 발현이 STME를 처리하였을 때 현저하게 저해됨을 확인하였다. 세포주기의 변화를 분석한 결과 STME는 지방세포 분화 초기 단계인 mitotic clonal expansion 단계에서 G1기로 세포주기를 정지시켰다. 더불어 G1 arrest와 관련된 단백질의 변화를 조사 한 결과, 3T3-L1 세포에 STME를 처리하였을 때 p21의 발현량이 확연하게 증가하였으며, Cdk2, E2F-1 그리고 phosphor-Rb의 발현량은 농도의존적으로 감소하였다. 이러한 결과들에 의하여 STME은 메탄올 추출물임에도 불구하고 3T3-L1 지방전구세포가 성숙지방세포로 분화할 때 G1 arrest를 통하여 지방세포 분화를 억제하며 관련 유전자의 발현 억제도 확연하게 확인할 수 있었으며, 이러한 결과는 항 비만 천연물 소재 탐구의 기초자료로 유용하게 쓰일 것으로 사료된다.