

Inhibition of Adipocyte Differentiation by Methanol Extracts of *Oenanthe javanica* Seed in 3T3-L1 Preadipocytes

Hyang Hwa Ji¹, Hyun Young Jeong¹, Soojung Jin², Hyun Ju Kwon^{1,2,3} and Byung Woo Kim^{1,2,3,*}

¹Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Science, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

²Blue-Bio Industry RIC, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

³Department of Biomaterial Control (BK21 program), Dong-Eui University Graduate School, Busan 614-714, Korea

Received November 12, 2012 / Revised November 28, 2012 / Accepted December 3, 2012

Oenanthe javanica has been used as a food source and also in traditional folk medicine for its detoxifying properties and anti-microbial effects since ancient times. In this study, we evaluated the effect and mechanism of *O. javanica* seed methanol extract (OJSE) on adipocyte differentiation by 3T3-L1 preadipocytes. Under non-toxic conditions, OJSE treatment resulted in a dose-dependent inhibition of lipid droplet generation and triglyceride accumulation by suppressing adipocyte differentiation, which are associated with the decreased expression of key proadipogenic transcription factors including CCAAR/enhancer binding protein α , β (C/EBP α , C/EBP β) and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). OJSE also significantly inhibited proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes through G1-phase arrest, indicating that OJSE blocked mitotic clonal expansion during adipocyte differentiation. Investigation of the alteration of G1 phase arrest-related proteins indicated a dose-dependent increase in the expression of p21 and reduction in expression of cyclin E, Cdk2, E2F-1 and phospho-Rb by OSJE. Taken together, these results suggest that OJSE inhibits adipocyte differentiation by blocking the mitotic clonal expansion, which is accompanied by preadipocyte cell cycle arrest.

Key words : *Oenanthe javanica* seed, adipocyte differentiation, CCAAT/enhancer binding proteins, peroxisome proliferator-activated receptor- γ , mitotic clonal expansion

서 론

비만(Obesity)은 생체 내에서 에너지의 축적과 소비의 불균형으로 일어나는 대사성 질환으로 개인의 정신적, 육체적, 환경적 요인 등의 변화로 인한 생체내의 항상성의 변화에 의해 나타난다[20,21]. 다양한 대사증후군(Metabolic syndrome), 당뇨병(Diabetes) 및 심혈관 질환(Cardiovascular disease) 등의 발생 원인으로 알려져 있는 비만은 최근 인종, 성별, 연령에 관계없이 지속적으로 증가하고 있어 인류의 건강을 위협하고 있다[5,11,17]. 따라서 비만의 예방 및 치료 방법의 개발이 요구되고 있으며 이러한 비만을 개선하기 위하여 식사, 운동, 약물 치료 등 다양한 비만 치료방법들이 다각도로 제시되고 있다[18]. 특히 비만을 일으키는 작용기전에 따른 다양한 비만치료제들이 시판되고 있으나 이러한 약물들은 심각한 부작용을 동반하고 있어[14] 최근에는 천연물로부터 체중조절에 효과적

인 기능성 소재들을 찾아내고 이들의 작용기전을 밝히는 연구들이 활발히 진행되고 있다[2,13,24].

비만의 여러 가지 유발요인 중 하나는 지방세포의 과형성에 의한 지방조직의 축적이며, 이러한 지방세포의 과형성은 세포 증식 또는 분화에 의해 유발된다. 성숙한 지방세포는 다양한 조직으로 분화 가능한 중배엽성 줄기세포로부터 분화되며 분화과정 동안 세포 형태의 변화, 호르몬 민감성의 변화, 유전자 발현 및 단백질 발현의 변화가 일어난다[4]. 지방세포의 분화는 confluence, hormonal induction, growth arrest, mitotic clonal expansion, terminal differentiation의 4가지 단계로 진행되며 이 단계들은 유기적인 전사인자의 cascade반응에 의해 조절된다. 지방세포 분화를 조절하는 전사인자에는 peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs) 그리고 sterol regulatory element binding protein (SREBP) family 등이 있으며 [1,7,22,28], 분화가 시작되면 insulin, dexamethasone 등과 같은 hormonal induction에 의해 분화 초기에 C/EBP β 가 발현되고, C/EBP β 가 활성화 되어 이후 분화 후기에는 지방세포 분화의 핵심적인 전사인자인 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현이 유도된다. C/EBP α 와 PPAR γ 의 활성화로 인해 실질적인 지방세포의 표현형을 결정하는 adipose-specific 유전자인 ap2 (FABP4), glucose transporter type 4 (GLUT4), ADIPOQ (adi-

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-2900, Fax : +82-51-890-2914

E-mail : bwkim@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ponectin) 및 lipoprotein lipase (LPL)와 같은 terminal marker 들의 발현이 유도된다. 이러한 전사인자들의 조절을 통해 지방세포분화가 진행되며 그 결과로 중성지방의 lipid droplet이 세포질에 나타나게 되고 점점 커지고 합쳐져 지방세포 분화가 완료된다[3,6,8].

지방세포 분화의 단계를 살펴보면 먼저 지방전구세포가 confluence상태에 이르게 되면 세포의 주기는 G0/G1기에서 정지하여 세포의 증식은 일어나지 않게 되고[30], 이때 분화유도제인 MDI [dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), insulin]를 처리하게 되면 세포는 G1기를 빠져 나와 다시 세포주기로 들어가 세포의 증식이 시작된다. 이 때의 세포수는 분화유도제를 처리하기 전보다 2 ~ 3배 증가하게 되며 이 과정을 mitotic clonal expansion이라고 한다. 지방세포 분화 과정 중 초기에 해당하는 Mitotic clonal expansion은 지방세포 분화에 있어 필수적인 단계이며 C/EBP β 가 이 단계에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다[26,27]. 따라서 많은 연구에서 mitotic clonal expansion의 억제 즉, 다시 재개 되는 세포주기의 억제를 의해 지방세포분화가 저해된다고 보고되어 있으며[12,14,19] 이러한 지방세포분화의 특징을 이용한 항비만 치료제의 연구가 지속되고 있다.

돌미나리(*Oenanthe javanica*)는 미나리과에 속하는 여러해살이 쌍떡잎식물로 본래 계곡의 샴터나 들의 습지 또는 물가에서 야생하고 독특한 향미가 있어 김치, 나물 등 다양한 용도로 식용되고 있다. 또한, 혈압강하, 해열, 진정, 변비예방, 및 하혈 등에 효과가 있고, 항균작용과 고혈압에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다[10]. 최근 여러 가지 채소류의 메탄올 추출물과 채소 즙에 대한 항돌연변이 효과 및 암세포증식 억제효과를 조사한 연구에서 돌미나리는 우수한 생리활성작용으로 그 효과를 인정받고 있으며, 다른 미나리과 산채 식물에 비하여 조단백질의 함량과 총페놀의 함량이 높고 육가공품에 대해서 항산화 효과를 지니는 것으로 보고되었다[15,16]. 이와 같이 돌미나리의 생리활성에 관한 연구보고는 있지만 돌미나리씨의 항비만 활성에 대한 연구는 아직 보고되지 않았다.

이에 본 연구는 돌미나리씨 메탄올 추출물의 항비만 효과를 검토하기 위하여 지방세포 내의 세포독성 효과, lipid droplet의 변화, 지방세포 분화 관련 유전자의 단백질 발현 양상의 변화, growth arrest 효과와 세포주기 변화에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

시료준비

돌미나리씨(*Oenanthe javanica* seed) 100 g을 분쇄하여 분말화한 후, 메탄올 2 l를 첨가하여 75°C에서 3시간 동안 3회 추출하였다. 이 추출액은 Whatman No.2 (Whatman international Ltd., England)에 여과하여 불순물을 제거하였고, 여과액을

45°C에서 감압 농축하여 15.30 g을 얻었으며 이를 OJSE (*Oenanthe javanica* seed methanol extract)로 명명하고 -70°C 초저온 냉동고에 보관하면서 사용하였다

3T3-L1 지방전구세포 배양 및 분화 유도

본 실험에 사용한 mouse embryonic fibroblast 3T3-L1 (3T3-L1) 지방전구세포는 미국 세포주은행(American type culture collection: ATCC, USA)에서 구입하여 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에 10% bovine calf serum (BCS, Gibco BRL) 및 1% penicillin/streptomycin (Gibco BRL)이 포함된 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다.

3T3-L1 지방전구세포의 분화유도를 위해 먼저 DMEM에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL), 1%의 penicillin/streptomycin를 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 confluent 상태가 되도록 배양하였다. 2일 더 배양한 후(day 0), 10 μ g/ml insulin, 0.25 μ M dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine [IBMX (SIGMA-Aldrich, St. Luis, MO, USA)] (MDI)이 포함된 DMEM으로 교환하여 2일간 배양하였다(day 2). 지방세포로의 분화를 촉진하기 위해 10 μ g/ml insulin이 포함된 DMEM으로 교환하여 4일간 배양하였다(day 6). 지방세포의 완전 분화를 위해 DMEM에 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin를 첨가하여 2일간 더 배양하였다(day 8).

세포독성 측정(cytotoxicity assay)

OJSE의 세포독성 효과를 PreMix WST-1 Cell Proliferation Assay System을 이용하여 확인하였다. 3T3-L1 지방전구세포를 96 well plate에 5×10^3 cells/well의 농도로 분주한 후 24시간 배양한 다음, OJSE를 1~200 μ g/ml의 농도로 각각의 well에 처리하였고 대조군은 0.5% DMSO를 처리하였다. 37°C에서 48시간 배양한 다음 WST-1 solution (Roche Diagnostics GmbH, Roche Molecular Biochemicals, Bioidea, Italy)을 각 well에 20 μ l씩 첨가하고 30분 반응 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 450 nm에서 측정하였다.

OJSE의 triglyceride 축적 억제 효능 평가

OJSE가 3T3-L1 지방전구세포의 분화를 억제하는지 여부를 확인하기 위하여 지방전구세포 분화 시에 형성되는 triglyceride를 특이적으로 염색시키는 Oil Red O 염색법을 이용하였다[25]. 먼저 대조군과 실험군의 3T3-L1 지방전구세포를 분화시키기 위해 분화유도제를 처리하였으며 동시에 OJSE (1, 5, 10, 50, 100, 200 μ g/ml)를 처리하였다. 대조군이 100% 분화가 이루어진 시점에 모든 plate의 배지를 제거하고 차가운 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4, SIGMA)로 세포를 세척한 후, 10% formalin을 처리하여 실온에서 1시간 고정시켰다.

Formalin을 완전히 제거한 다음 60% isopropanol로 세척한 뒤 Oil Red O working solution을 넣고 실온에서 20분간 염색을 하였다. 염색 후 Oil Red O working solution을 완전히 제거한 다음 증류수로 4번 세척하고 현미경으로 세포의 염색 상태를 확인하였으며, 정량적 분석을 위하여 100% isopropanol에 지방을 용출시켜 spectrophotometer를 이용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포증식 속도 측정(trypsin blue exclusion assay)

OJSE가 mitotic clonal expansion 단계에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 세포증식 속도를 측정하였다. 3T3-L1 지방전구세포를 배양한 후 분화유도제인 MDI가 들어있는 배지로 교환할 때 OJSE를 농도별(50, 100, 200 µg/ml)로 처리하였다. OJSE 처리 후 각각 0, 24, 48 시간 별로 세포를 회수한 후 trypan blue (Trypan blue solution 0.4%, SIGMA-Aldrich, St. Luis, MO, USA)와 세포현탁액을 1 : 1로 처리하여 염색하였고 hemocytometer를 이용하여 생세포수를 측정하였다.

세포주기 변화 측정(flow cytometric analysis)

Mitotic clonal expansion 단계에서 OJSE가 세포주기에 어떠한 영향을 주는지 확인하기 위하여 3T3-L1 지방전구세포를 배양한 후 분화유도제인 MDI가 들어있는 배지로 교환할 때 OJSE를 농도별(1, 5, 10, 50, 100, 200 µg/ml)로 처리하였다. 3T3-L1 지방전구세포의 doubling time인 14시간 후에 세포를 회수하여 PBS로 세척하고 100% ethanol을 이용하여 4°C에서 고정시켰다. 고정된 세포는 분석 전에 PBS로 세척하고 ribonuclease A를 최종농도 1 µg/ml이 되도록 첨가한 다음 실온에서 30분간 반응시켰다. PI/RNase staining buffer (BD Pharmingen™) 용액을 500 µl 첨가한 후 유세포분석기(FACS, Becton Dickinson, San Jose, CA)로 분석하였으며 결과는 Cell Quest program을 이용하여 분석하였다.

단백질 변화량 측정(western blot analysis)

회수한 세포를 PBS로 세척한 후 CSK 완충액[100 mM PIPES (pH 6.8), 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol (DTT)]에 0.1% Triton X-100, 1 mM ATP와 Protease inhibitor Cocktail (BD Pharmingen™)이 첨가된 용액에 현탁하여 15분간 용출시킨 후, 초음파 파쇄기로 파쇄하여 14,000 rpm 20분간 원심 분리하였다. 상등액을 BCA법으로 정량하여 동량의 단백질(20 µg)을 sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel에서 전기영동 하였다. 전기영동 후 gel 내의 단백질을 PVDF membrane에 전이시킨 후, blocking solution [0.15 M NaCl, 1 M Tris-HCl (pH 7.5), 0.1% Triton X-100, 5% BSA]을 사용하여 4°C, 16시간 반응시켰다. Membrane을 세척하고 1차 항체를 처리한 후 처리한 1차 항체에 맞는 2차 항체를 사용하여 반응시켰다. 면역반응 단백질은

화학발광시스템(Chemi-luminescence system ; SuperSignal West Femto Maxium sensitivity Substrate, Pierce, USA)으로 검출하였다. 본 실험에 사용된 C/EBPα 및 C/EBPβ의 1차 항체는 Cell signaling (Cell signaling Technology, USA)에서 구입하였으며 PPAR γ , p21, Cyclin E, Cdk2, Rb, Phospho-Rb, E2F-1 등의 1차 항체 및 2차 항체로 사용된 anti-mouse IgG-HRP와 anti-rabbit IgG-HRP는 Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

결 과

OJSE의 세포독성

OJSE의 3T3-L1 지방전구세포에 대한 세포 독성여부를 확인하기 위하여 3T3-L1 지방전구세포에 OJSE를 처리한 다음 PreMix WST-1 Cell Proliferation Assay System으로 확인하였다. 대조군인 DMSO를 처리한 것에 대한 OJSE 처리 시 세포 증식의 변화 정도를 백분율로 계산하여 세포독성을 나타내었다(Fig. 1). 그 결과 최고 시료 처리 농도인 OJSE 200 µg/ml에서도 85% 이상의 높은 생존율을 나타내었다. 따라서 1~200 µg/ml 농도의 OJSE 처리는 3T3-L1 지방전구세포의 생존율에 큰 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.

OJSE의 lipid droplet 생성 억제 및 triglyceride 축적 억제 효과

Lipid droplet은 지방전구세포에서 지방세포로의 분화과정 중 나타나는 비활성 소낭으로 phospholipid monolayer에 둘러싸인 중성지방으로 구성되어 있으며, 중성지방으로 알려진 triglyceride는 음식물로 섭취하는 지방의 95%를 차지하며 중요 에너지원으로 사용되나 여분의 triglyceride는 지방세포에 흡수되고 저장되어 비만의 원인으로 작용한다.

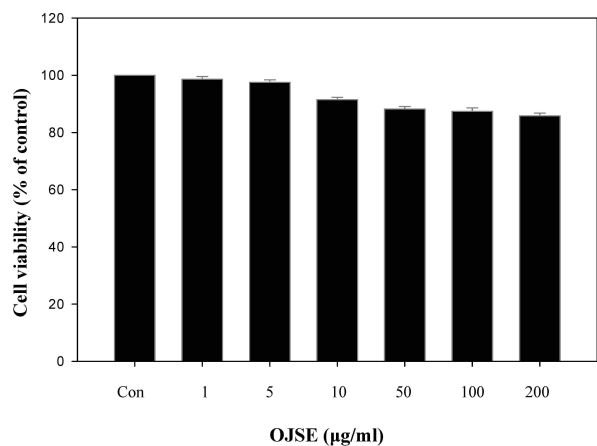


Fig. 1. Effect of OJSE on the cytotoxicity in 3T3-L1 preadipocyte. Preconfluent 3T3-L1 fibroblasts were incubated with 10% BCS-DMEM containing OJSE for 48 hr to measure cell viability. Cell viability was determined by WST assay.

OJSE의 3T3-L1 지방전구세포 분화억제 효능을 분석하기 위하여 Oil Red O 염색을 이용하여 3T3-L1 지방전구세포의 lipid droplet 생성 및 triglyceride 축적을 관찰하였다. 먼저 배양된 세포에 분화유도제와 함께 OJSE를 1, 5, 10, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 다음, 분화유도과정이 끝난 후 Oil Red O로 염색하여 현미경으로 관찰하고 triglyceride 함량을 정량하였다. 그 결과 분화유도제만 처리한 대조군에 비해 OJSE를 동시에 처리한 경우 세포질 내 lipid droplet 형성이 농도의존적으로 억제되었으며 triglyceride 축적 또한 농도의존적으로 저해됨을 확인하였다. 특히 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 OJSE를 처리한 경우 대조군에 비해 triglyceride 축적이 약 80% 저해됨을 확인하였다(Fig. 2). 따라서 OJSE는 지방전구세포에서 지방세포로의 분화 억제 및 지방세포내의 지방 축적억제 효과가 탁월한 것을 알 수 있었다.

OJSE의 지방세포분화 관련 전사인자들의 발현에 미치는 영향

OJSE가 3T3-L1 지방세포 분화 관련 전사인자들의 발현에

미치는 영향을 알아보기 위하여 분화유도제만 처리한 대조군과 분화유도제와 OJSE를 동시에 처리한 실험군을 각각 분화 시킨 후 지방세포분화 관련 전사인자들의 발현 양상을 단백질 수준에서 확인하였다. Fig. 3A와 Fig. 3B는 각각 분화유도제만 처리한 경우와 분화유도제와 동시에 OJSE 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 경우의 지방세포분화 관련 전사인자들의 발현 양상을 본 결과이다. 먼저 Fig. 3A에 나타난 바와 같이 분화유도제만 처리한 대조군의 경우 C/EBP β 는 분화 초기인 0.25일부터 발현이 시작되어 0.75일에서는 최대 4.8배 발현이 되었고 분화유도 후 2일까지 발현이 되었다가 3일에서는 발현이 되지 않았다. 또한, C/EBP α 는 4일에 발현이 시작되면서 7일까지 발현이 점차 증가되다가 8일에서 감소하였고, PPAR γ 는 3일에 발현이 유도되어 4일에 그 발현량이 증가하였다가 5일부터 점차 감소하였다. 이는 서론에서 논한 바 대로 분화유도제에 의해 분화 초기에 C/EBP β 가 발현이 유도되고 C/EBP β 에 의해 지방세포 분화에서 가장 중요한 역할을 하는 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현이 촉진된다는 설명을 뒷받침할 수 있는 결과로 사료된다. 반면, Fig. 3B에

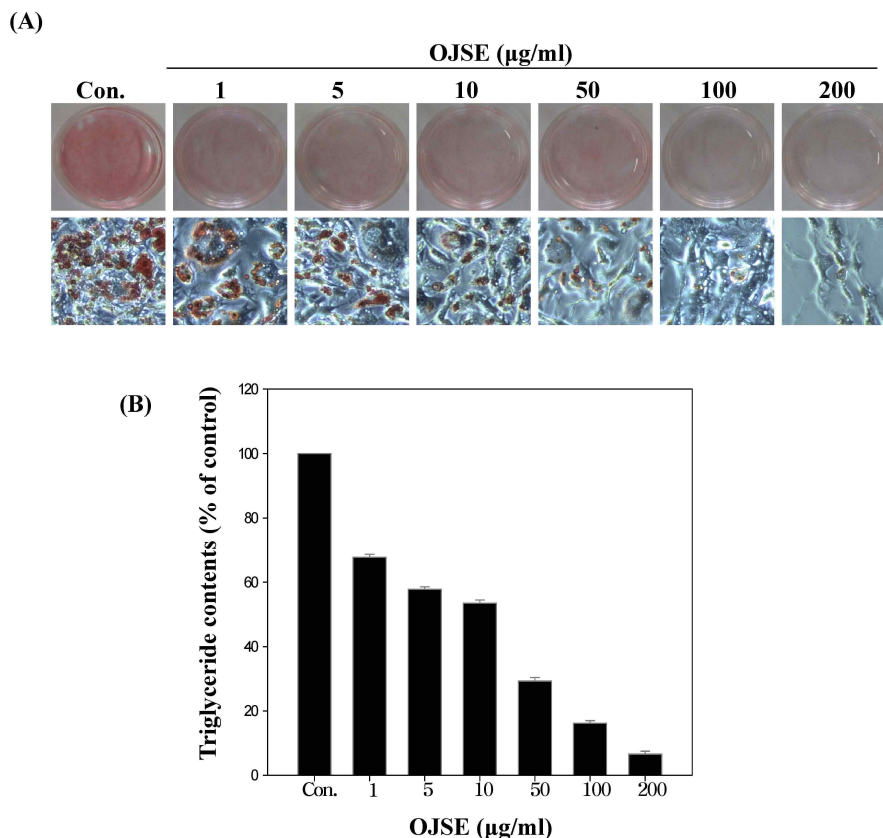


Fig. 2. Inhibition of OJSE on the triglyceride contents in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 preadipocytes induced the differentiation into adipocyte. Various amounts (1~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of OJSE were co-treated into cells with hormone mixture containing 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin, 0.25 μM dexamethasone, and 0.5 mM IBMX for 2 days. The cells were further incubated in the growth medium containing 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin for first two days. After 10 days, the cells were fixed with 10% formalin for 1 hr and then stained with Oil Red O for 20 min. Stained oil droplets were dissolved with isopropanol (A) and quantified by spectrophotometric analysis at 500 nm (B).

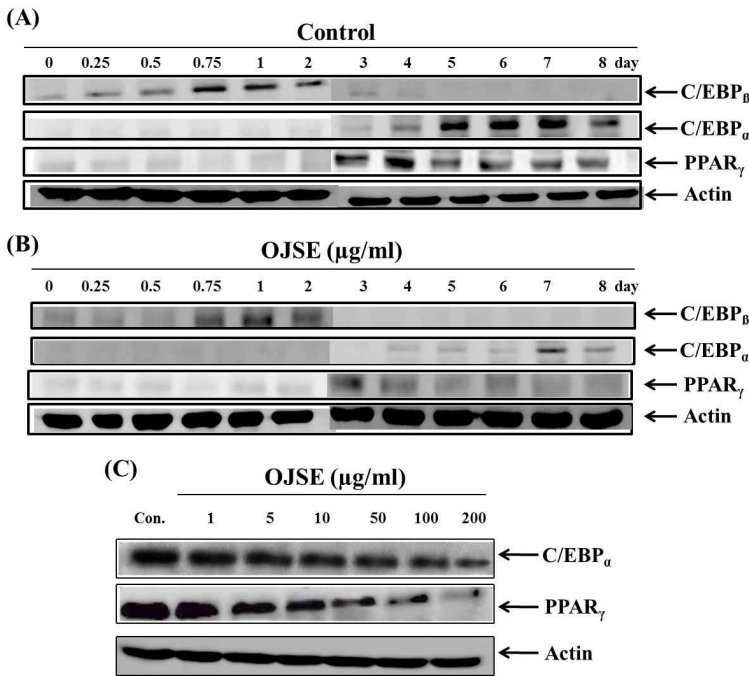


Fig. 3. Effect of OJSE on the expression of adipogenic transcription factor proteins in differentiated 3T3-L1 preadipocytes. Differentiation of confluent 3T3-L1 preadipocytes was induced by incubation with MDI in the absence or presence of OJSE for 8 days. Cells were lysed and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. (A, B) Postconfluent 3T3-L1 cells were differentiated in the absence or presence of 200 $\mu\text{g/ml}$ OJSE. (C) Expressions of C/EBP α and PPAR γ were decreased by OJSE in dose-dependent manner.

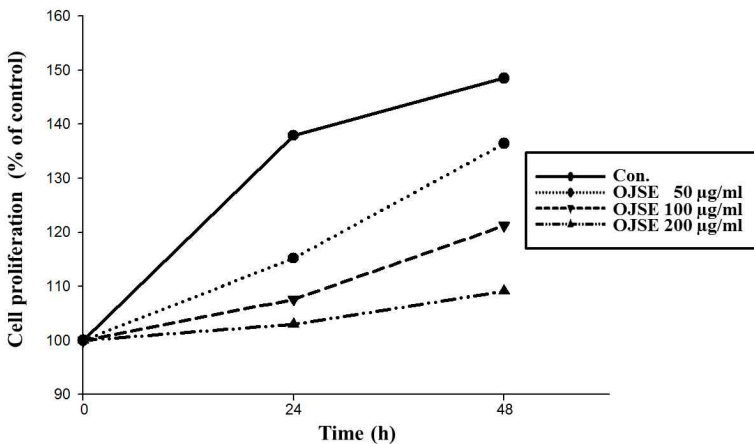


Fig. 4. Inhibition of 3T3-L1 preadipocyte proliferation by OJSE. Cells were treated with the indicated concentration of OJSE and cell number was determined by hemocytometer counts of trypan blue excluding cells.

서 알 수 있듯이 분화유도제와 OJSE를 같이 처리한 경우 C/EBP β 의 발현량은 Fig. 3A의 대조군의 C/EBP β 발현량보다 현저히 줄어드는 것을 알 수 있다. C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현량 또한 Fig. 3A의 대조군의 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현량 보다 현저히 줄어드는 것을 확인하였다. 따라서 OJSE 처리에 의해 C/EBP β 의 발현량이 감소되고 이 후 cascade반응으로 인하여 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현량 역시 줄어드는 것으로 보여진다. 또한 Fig. 3C에서 보듯이 OJSE 처리에 의한 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현량은 OJSE 농도의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. 이상의 결과를 살펴보면 OJSE는 지방세포 분화 관련 전사인자들인 C/EBP α , C/EBP β 및 PPAR γ 의 발현을 억제하여 지방세포 분화를 저해하며 그 결과 lipid droplet 생성과 triglyceride 축적을 감소시키는 것으로 추정된다.

OJSE에 의한 mitotic clonal expansion 저해

지방세포분화의 단계 중 하나인 mitotic clonal expansion 단계에서는 증식이 멈추었던 지방전구세포가 분화유도제에 의해 새롭게 증식을 시작하는 시기이므로 세포의 수가 2~3배 증가된다. 따라서 OJSE가 mitotic clonal expansion 단계를 저해시키는지 확인하기 위해, confluence 상태의 세포에 분화유도제와 OJSE (50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$)를 동시에 처리하여 0, 24, 48시간 배양한 다음 생세포수를 측정하여 변화를 관찰하였다. 그 결과 분화유도제만 처리한 세포의 증식은 0시간에 비해 48시간 때 1.5배의 증식을 하였지만, 분화유도제와 OJSE를 동시에 처리한 세포의 증식은 현저하게 저해되었다(Fig. 4). 처리한 OJSE의 농도는 Fig. 1의 세포독성 결과에서 독성이 없는 농도이므로 OJSE 처리에 의한 세포수의 감소는 독성에 의한 것이 아니라, mitotic clonal expansion 단계에서 일어나는 세

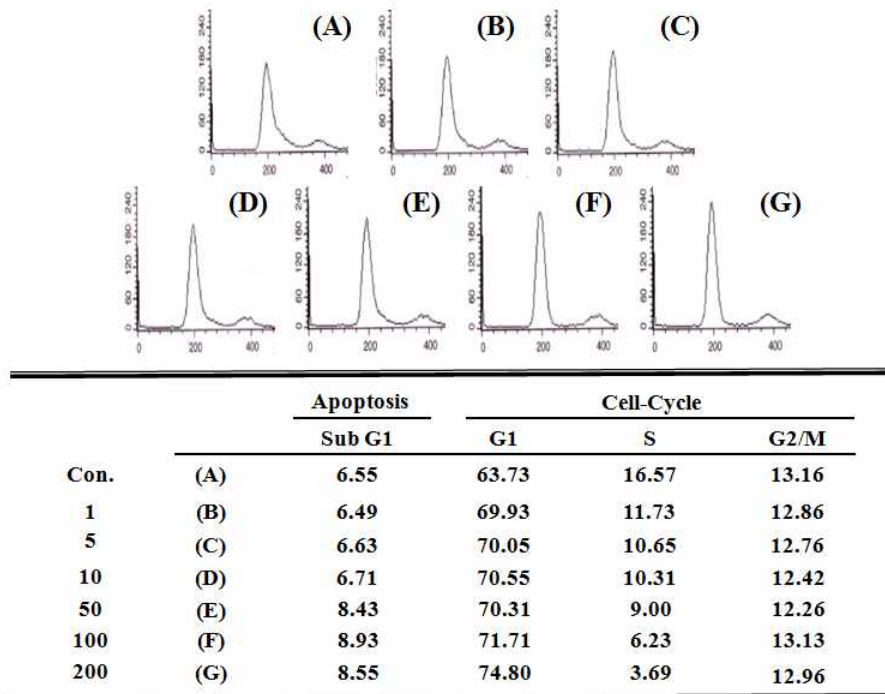


Fig. 5. Cell-cycle analysis of OJSE treated 3T3-L1 adipocytes. Post-confluent cells were treated with dimethylsulfoxide (vehicle) or OJSE in a medium containing adipogenic inducer. Following incubation the cells were harvested, permeabilized, stained with propidium iodide and analyzed by flow cytometer.

포 증식의 저해에 의한 것으로 사료된다. 즉, OJSE는 지방세포 분화 단계 중 mitotic clonal expansion 단계를 저해함으로써 지방세포로의 분화를 억제하는 것으로 생각된다.

세포주기 변화분석

지금까지 알려진 여러 연구 결과에 의하면 3T3-L1 지방전구세포에 분화유도제를 처리하여 지방세포로의 분화를 유도하였을 때 contact inhibition으로 정지되어있던 세포주기가 재개되어 세포분열 및 증식이 일어난다고 보고되어 있으므로 [12,14,19], 앞에서 확인한 OJSE의 처리에 따른 mitotic clonal expansion의 억제 기전을 확인하기 위해 OJSE 처리 후 지방전구세포의 세포주기 변화를 Flow cytometry를 사용하여 분석하였다. 그 결과, Fig. 5에서 알 수 있듯이 분화유도제만을 처리한 세포보다 분화유도제와 OJSE를 농도별(1, 5, 10, 50, 100, 200 μg/ml)로 처리한 세포의 G1기 개체군의 비율이 63.73%에서 74.8%까지 농도의존적으로 점차 증가하였으며, S기 개체군의 비율은 16.57%에서 3.69%로 상대적으로 감소함을 알 수 있었다. 즉, OJSE의 처리에 따라 지방전구세포의 세포주기는 G1기에서 정지됨을 알 수 있었다. 따라서 OJSE는 분화유도제에 의한 mitotic clonal expansion 단계의 지방전구세포의 세포주기를 G1기에서 정지시킴으로 인하여 지방세포 분화를 위한 지방전구세포의 증식을 억제하고, 이러한 mitotic clonal expansion 단계의 저해를 통해 지방세포로의 분화를 억제하

는 것으로 추정된다.

G1 arrest 관련 단백질의 변화

앞서 살펴본 OJSE 처리에 의한 mitotic clonal expansion 단계에서 지방전구세포의 G1 arrest 유도에 관하여 좀 더 명확하게 분석하기 위하여 G1 arrest 관련 단백질의 발현량 변화를 검토하였다. 지방전구세포를 confluence 상태까지 배양시킨 후, 분화유도제와 동시에 OJSE를 농도별로 처리하였을 때 G1기에서 S기로의 전이에 필수적인 단백질인 cyclin E, Cdk2, Rb, phospho-Rb, 전사인자 E2F-1 및 G1기 전이를 저해하는 Cdk inhibitor p21의 발현 변화를 Western blot analysis로 확인하였다(Fig. 6). 그 결과, cyclin E, Cdk2, phospho-Rb와 E2F-1의 발현량은 OJSE의 처리 농도가 증가될수록 감소되었다. 반면 Cdk2 inhibitor인 p21의 경우는 OJSE 농도의존적으로 발현량이 증가되었고, 최고농도인 200 μg/ml OJSE 처리시 control에 비해 7배 이상 발현되었다. 따라서, OJSE 처리에 따른 p21의 발현 증가로 인해 Cyclin/CDK complex의 활성이 억제되고 Rb의 인산화가 저하되어 3T3-L1 지방전구세포의 G1 arrest가 유발되는 것으로 사료된다.

고 찰

새로운 비만 치료제의 개발은 지방세포 분화를 조절하는

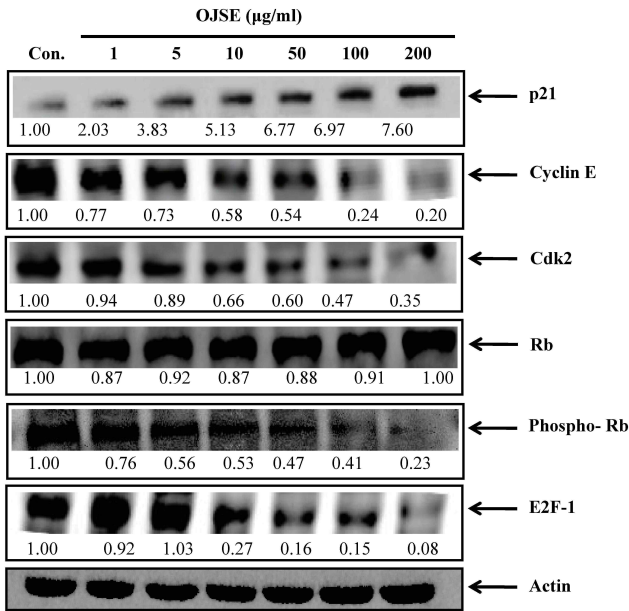


Fig. 6. Inhibition of clonal expansion of 3T3-L1 by OJSE. Differentiation of confluent 3T3-L1 preadipocytes was induced in the absence or presence of OJSE for 8 days initiated concentration. Cells were lysed and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system.

기전에 대한 많은 연구와 그 결과들이 축적되면서 더욱 가속화 되고 있다. 그러나 기존의 비만 치료제로는 화학합성을 통한 물질들이 주로 사용되어 많은 부작용이 보고 되고 있으며, 최근에는 천연물을 이용한 비만 치료제의 연구가 새롭게 각광 받고 있다. 따라서 본 연구는 천연물 중 돌미나리씨 메탄올 추출물(*Oenanthe javanica* seed methanol extract; OJSE)의 지방세포 분화 억제 효과와 그 기전에 대하여 조사하였다.

본 연구에서 OJSE는 3T3-L1 지방전구세포에 대하여 세포 독성이 없었으며 지방세포분화 시 관찰되는 lipid droplet 생성을 억제시키는 것을 확인하였고, 특히 OJSE 200 µg/ml 을 처리하였을 경우 triglyceride의 지방세포내 축적은 약 80% 억제되었다(Fig. 2). 지방전구세포에서 지방세포로 분화 되는 과정은 많은 종류의 지방세포분화 관련 전사인자들의 단계적인 조절에 의하여 유발되며 특히 이러한 전사인자들 중에서 C/EBP family 및 PPAR γ 가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 먼저 분화유도인자에 노출되면 몇 시간 이내에 C/EBP β 의 발현이 유발되면서 분화가 시작되며, C/EBP β 는 insulin-sensitive glucose uptake와 같은 성숙한 비만세포의 특징을 증가시키는데 관여하는 C/EBP α 및 PPAR γ 의 발현을 촉진 함으로서 최종적으로 분화과정을 완성하게 된다[3,6,8]. 이렇게 분화된 세포는 lipid droplet

생성 및 세포의 크기 증가 등과 같은 형태적 특징과 더불어 특이적인 유전자의 발현을 유발 함으로서 지방세포의 특징을 지니게 된다. 따라서 본 연구에서는 OJSE가 지방세포분화 관련 전사인자들의 발현에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하였다. 그 결과 분화유도제와 동시에 OJSE를 처리한 경우 분화유도제만 처리한 경우에 비해 분화 초기 C/EBP β 의 발현량이 현저하게 감소하였으며, 분화후기에 발현되는 C/EBP α 및 PPAR γ 의 발현량 또한 현저히 감소함을 알 수 있었다(Fig. 3A, 3B). 또한 이러한 지방세포분화 관련 전사인자들의 발현량은 OJSE 농도의존적으로 유의성있게 감소하였다(Fig. 3C). 즉, OJSE에 의해 C/EBP β 의 발현량이 감소되고, 이 후 C/EBP α 및 PPAR γ 의 발현 저하에 영향을 주어 지방세포분화가 억제되며 그로 인해 lipid droplet 및 triglyceride 생성이 감소되는 것으로 추정된다.

또한 C/EBP β 는 지방세포분화 단계 중 하나인 mitotic clonal expansion에도 중요한 역할을 하는 전사인자이므로 [12,14], OJSE가 mitotic clonal expansion 단계에서 어떤 영향을 끼치는지 분석하였다. 그 결과, OJSE는 mitotic clonal expansion 단계에서 보이는 세포증식을 억제하였으며(Fig. 4), OJSE를 처리하지 않고 분화시킨 3T3-L1 세포에서는 S기의 세포군이 증가되어 있는 반면, 분화유도제와 OJSE를 동시에 처리한 경우 S기의 세포군은 감소하고 G1기의 세포군들이 증가되었다(Fig. 5). 이러한 지방전구세포의 G1 arrest는 OJSE 농도의존적으로 유도되었다. 세포주기 관련 단백질들의 발현 양상 [9,23,29]을 분석한 결과, 특징적으로 OJSE처리 농도의존적으로 Cdk inhibitor인 p21의 발현량이 현저히 증가되었으며, p21의 증가에 따라 Cyclin, Cdk 및 E2F-1의 발현량이 저하되고 Rb단백질의 인산화가 억제되었다(Fig. 6). 이 결과들은 OJSE가 지방전구세포의 세포주기를 G1기에서 정지시켜 세포의 증식을 억제하고[9,23,29], 결과적으로 mitotic clonal expansion 단계가 저해되어 지방세포분화를 억제시키는 것을 시사한다.

돌미나리는 현재까지 혈압강하, 해열, 진정, 변비예방 및 하혈 등에 효과가 있고, 항균작용과 고혈압에도 효과가 있는 것으로 알려져 있으나[10], 돌미나리씨의 지방세포 분화에 관련된 연구결과는 본 논문이 최초이다. 본 연구 결과에서 알 수 있듯이 돌미나리씨의 추출물은 지방전구세포의 G1 arrest 유도, 지방세포분화 관련 인자들의 발현 제어에 의한 지방축적 억제 및 지방세포분화 억제 등 강력한 항비만 활성을 보였으므로 앞으로 진행될 비만 유도 동물을 이용한 생체 내 실험에서도 높은 항비만 효과를 나타낼 것이라 기대된다. 아울러 이러한 돌미나리씨 추출물의 항비만 활성은 비만 예방에 효과적일 것이며 항비만 활성 천연소재로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 2012년도 동의대학교 연구비(2012AA099) 지원

을 받아 연구되었습니다.

References

- Brun, R. P., Kim, J. B., Hu, E., Altiock, S. and Spiegelman, B. M. 1996. Adipocyte differentiation: a transcriptional regulatory. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **8**, 826-832.
- Burns, A. A., Livingstone, M. B., Welch, R. W., Dunne, A. and Rowland, I. R. 2002. Dose-response effects of a novel fat emulsion (Olibra) on energy and macronutrient intakes up to 36 h post-consumption. *Eur. J. Clin. Nutr.* **56**, 368-377.
- El-Jack, A. K., Hamm, J. K., Pilch, P. F. and Farmer, S. R. 1999. Reconstitution of insulin-sensitive glucose transport in fibroblasts requires expression of both PPAR gamma and C/EBP alpha. *J. Biol. Chem.* **274**, 7946-7951.
- Fajas, L., Fruchart, J. C. and Auverx, J. 1998. Transcriptional control of adipogenesis. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **10**, 165-173.
- Flegal, K. M., Carrol, M. D., Ogden, C. L. and Johnson, C. L. 2002. Prevalence and trends in obesity among US adults. *JAMA* **288**, 1723-1727.
- Fox, K. E., Fankell, D. M., Erickson, P. F., Majka, S. M., Crossno, J. T. Jr. and Klemm, D. J. 2006. Depletion of cAMP-response element-binding protein/ATF1 inhibits adipogenic conversion of 3T3-L1 cells ectopically expressing CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) alpha, C/EBP beta, or PPAR gamma 2. *J. Biol. Chem.* **281**, 40341-40353.
- Gregoire, F. M. and Smas, C. M. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* **78**, 783-809.
- Hamm, J. K., Park, B. H. and Farmer, S. R. 2001. A role of C/EBP beta in regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocyte. *J. Biol. Chem.* **276**, 18464-18471.
- Harbour, J. W., Luo, R. X., Santi, A. D., Postigo, A. A. and Dean, D. C. 1999. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* **98**, 859-869.
- Hwang, H. S., Kim, S. H., Yoo, Y. G., Chu, Y. S., Shon, Y. H., Nam, K. S. and Yun, J. W. 2008. Inhibitory effect of deep-sea water on differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *Mar. Biotechnol.* **11**, 161-168.
- Kereiakes, D. J. and Willerson, J. T. 2003. Metabolic syndrome epidemic. *Circulation* **108**, 1552-1553.
- Kim, C. Y., Le, T. T., Chen, C., Cheng, J. X. and Kim, K. H. 2011. Curcumin inhibits adipocyte differentiation through modulation of mitotic clonal expansion. *J. Nutr. Biochem.* **22**, 910-920.
- Kim, M. H. 2004. Updates in treating obesity. *Kor. J. Health Psychol.* **9**, 493-959.
- Kim, S. H., Park, H. S., Lee, M. S., Cho, Y. J., Kim, Y. S., Hwang, J. T., Sung, M. J., Kim, M. S. and Kwon, D. Y. 2008. Vitisin A inhibits adipocyte differentiation through cell cycle arrest in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **372**, 108-113.
- Lee, H. Y., Yoo, M. J. and Chung, H. J. 2001. Antibacterial activities in watercress (*Oenanthe javanica* D.C) cultivated with different culture methods. *Kor. J. Food Culture* **16**, 243-249.
- Lee, K. I., Rhee, S. H. and Park, K. Y. 2004. Antimutagenic and Antioxidative Effect of Water Dropwort and Small Water Dropwort. *Kor. J. Community Living Sci.* **15**, 49-55.
- Mekdad, A. H., Ford, E. S., Bowman, B. A., Dietz, W. H., Vinicor, F., Bales, V. S. and Marks, J. S. 2003. Prevalence of obesity, diabetes and obesity related health risk factors. *JAMA* **289**, 76-79.
- Naderali, E. K. 2009. Obesity and cardiovascular dysfunction : A role for resveratrol? *Obes. Res. Clin. Pract.* **3**, 45-52.
- Naghshineh, S., Noguchi, M., Huang, K. P. and Londos, C. 1986. Activation of adipocyte adenylate cyclase by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **261**, 14534-14538.
- Ordovas, J. M. and Mooser, V. 2004. Nutrigenomic and nutrigenetics. *Curr. Opin. Lipidol.* **15**, 101-108.
- Otto, T. C. and Lane, M. D. 2005. Adipose development : from stem cell to adipocyte. *Crit. Rev. Biochem Mol. Biol.* **40**, 229-242.
- Saitoa, T., Abea, D. and Sekiya, K. 2009. Flavanone exhibits PPAR γ ligand activity and enhances differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **380**, 281-285.
- Sherr, C. J. and Roberts, J. M. 1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* **9**, 1149-1163.
- Shimomura, T., Funahashi, T., Takahashi, M., Meada, K., Kotani, K., Nakamura, T. and Yamashita, Y. 1996. Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat : possible contributor to disease in obesity. *Nat. Med.* **2**, 800-803.
- Suryawan, A. and Hu, C. Y. 1993. Effect of serum on differentiation of porcine adipose stromal-vascular cells in primary culture. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol.* **105**, 485-492.
- Tang, Q. Q. and Lane, M. D. 1999. Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancer-binding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocyte differentiation. *Genes Dev.* **13**, 2231-2241.
- Tang Q. Q., Otto, T. C. and Lane, M. D. 2003. Mitotic clonal expansion : A synchronous process required for adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 44-49.
- Tontonoz, P., Hu, E. and Spiegelman, B. M. 1995. Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**, 571-576.
- Zhang, H. S., Gavin, M., Dahiya, A., Postigo, A. A., Ma, D., Luo, R. X., Harbour, W. J. and Dean, D. C. 2000. Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSEI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* **101**, 79-89.
- Zhang, J. W., Tang, Q. Q., Vinson, C. and Lane, M. D. 2004. Dominant-negative C/EBP disrupts mitotic clonal expansion and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 43-47.

초록 : 돌미나리씨 추출물에 의한 3T3-L1 지방전구세포의 분화 억제

지향화¹ · 정현영¹ · 진수정² · 권현주^{1,2,3} · 김병우^{1,2,3*}

(¹동의대학교 생명융합학과, ²동의대학교 블루바이오 소재 개발 센터, ³동의대학교 대학원 바이오물질제어학과)

돌미나리(*Oenanthe javanica*)는 뛰어난 해독작용과 항균작용으로 예로부터 약재로 사용되어 왔으나 돌미나리씨의 활성은 아직 밝혀지지 않았다. 본 연구에서는 3T3-L1 지방전구세포를 사용하여 돌미나리씨 메탄을 추출물(OJSE)의 지방세포분화에 미치는 영향과 그 기전에 대해 조사하였다. 세포독성이 없는 농도(1~200 µg/ml)의 OJSE를 지방세포 분화유도제와 동시에 지방전구세포에 처리하여 분화시킨 후 Oil Red O 염색을 한 결과 세포내 lipid droplet 생성 및 triglyceride 축적이 OJSE 농도의존적으로 감소되었으며, 지방세포분화과정에서 중요한 역할을 하는 지방세포특이적 마커인 CCAAT/enhancer binding proteins α , β (C/EBP α , C/EBP β) 및 peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)의 발현이 현저하게 저하되었다. 이는 OJSE에 의해 지방세포 분화 관련 전사인자의 발현이 효과적으로 억제되어 지방세포로의 분화가 저해되고 결과적으로 지방세포내 lipid droplet 생성 및 triglyceride 축적이 억제되었다는 것을 시사한다. 또한 OJSE처리에 의해 mitotic clonal expansion 단계에서의 세포증식이 저해되었으며, 세포주기의 변화를 분석한 결과, OJSE처리에 의해 지방전구세포의 G1 arrest가 유발됨을 확인하였다. 세포주기 관련 단백질 발현을 분석한 결과, OJSE 농도의존적으로 Cdk inhibitor인 p21의 발현이 현저하게 증가되었으며, 반면 cyclin E, Cdk2, E2F-1 및 phospho-Rb의 발현은 저하됨을 알 수 있었다. 이러한 연구 결과들에 의해 OJSE는 지방전구세포의 G1 arrest를 유도하고 지방세포분화 관련 단백질의 발현을 억제하여 지방세포로의 분화를 억제하는 항비만 효능을 갖는 천연 소재임을 확인하였고, 본 연구는 이를 활용한 향후 지속적인 연구를 위한 기초자료로 그 가치가 매우 높을 것으로 생각된다.