

In vitro 동물세포에서 GGEx18의 ethyl acetate 분획물에 의한 지방산 β -산화효소 유전자 발현의 조절

주병수¹, 이희영¹, 이혜림¹, 윤미정³, 서부일⁴, 김범회², 신순식^{1*}

1 : 동의대학교 한의과대학 방제학교실, 2 : 동의대학교 해부학교실과 한의학연구소,

3 : 목원대학교 바이오건강학부, 4 : 대구한의대학교 한의과대학 본초학교실

Ethyl acetate fraction of GGEx18 modulates fatty acid β -oxidizing enzymes

Byung-Soo Joo¹, Hee-Young Lee¹, Hye-Rim Lee¹, Michung Yoon³, Bu-Il Seo⁴, Beom-Hoi Kim², Soon-Shik Shin^{1*}

1 : Dept. of Formula Science, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University,

2 : Dept. of Anatomy, College of Oriental Medicine & Research Institute of Oriental Medicine, Dong-Eui University,

3 : Dept. of Life Sciences, Mok-Won University,

4 : Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : This study was undertaken to investigate the effects of the GGEx18 ethyl acetate fraction (EF) on lipid accumulation and gene expression of fatty acid-oxidizing enzymes using 3T3-L1 adipocytes, C2C12 skeletal muscle cells, and NMu2Li liver cells.

Methods : PPAR α , AMPK and UCPs transactivation was examined in NMu2Li hepatocytes, C2C12 myocytes, and 3T3-L1 preadipocytes using transient transfection assays.

Results : 1. Compared with control, EF significantly increased the mRNA expression of VLCAD in 3T3-L1 adipocytes.

2. Compared with control, EF (0.1 μ g/ml) significantly inhibited lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes.

3. EF significantly increased the mRNA expression of AMPK α 1, AMPK α 2 and PPAR α in C2C12 skeletal muscle cells compared with control.

4. EF significantly increased the mRNA expression of genes involved in fatty acid β -oxidation, such as thiolase, MCAD, and CPT-1 in C2C12 skeletal muscle cells compared with control.

5. EF significantly increased the mRNA expression of UCP2 involved in energy expenditure in C2C12 skeletal muscle cells compared with control.

6. Compared with control, EF (10 μ g/ml) significantly inhibited lipid accumulation in C2C12 skeletal muscle cells.

7. EF (10 μ g/ml) significantly increased the mRNA expression of ACOX, HD, VLCAD and MCAD in NMu2Li liver cells compared with control.

Conclusions : These results suggest that EF may prevent obesity by increasing the mRNA expression of mitochondrial fatty acid β -oxidizing enzymes in 3T3-L1 adipocytes, by not only regulating the fatty acid oxidation through activation of AMPK and PPAR α , but also increasing the UCP2 mRNA expression in C2C12 skeletal muscle cells, and by stimulating the mRNA expression of fatty acid-oxidizing enzymes in NMu2Li liver cells.

Key words : Gyeongshingangjeehwan18, ethyl acetate fraction, fatty acid β -oxidation, obesity

*교신저자 : 신순식, 부산시 부산진구 양정2동 산45-1 동의대학교 한의과대학 방제학교실.
· Tel : 051-850-7414, · E-mail : ssshin@deu.ac.kr.
· 접수 : 2012년 2월 13일 · 수정 : 2012년 3월 4일 · 채택 : 2012년 3월 16일

緒 論

輕身降脂丸18 (gyeongshingangjeehwan18, GGE_x18)은 氣味가 鹹寒하고 歸經이 肝, 胃, 腎經이며 軟堅散結, 消痰, 利水의 효능이 있는 昆布와 氣味가 辛微苦溫하고 歸經이 肺, 膀胱經이며 發汗散寒, 宣肺平喘, 利水消腫의 효능이 있는 麻黃 및 氣味가 苦寒하고 歸經이 脾, 胃, 大腸, 肝, 心經이며 瀉熱通腸, 涼血解毒, 逐瘀通經의 효능이 있는 大黃의 세 가지 한약재¹⁻³⁾로 조성된 한약제제이다. 이 한약제제는 임상에서 비만조절효과가 있는 것으로 알려져 일부 임상 개업가에서 응용되고 있으며, 동물실험과 세포실험에서도 그 비만조절효과가 있음이 보고되었다. 형질전환 비만모델인 ob/ob 마우스와⁴⁾ 고지방식이 비만마우스 모델을⁵⁾ 이용하여 GGE_x18은 식욕조절과 지방조직, 간과 골격근에서 PPAR α 의 활성을 촉진함으로써 비만조절효과가 있음이 보고되었고, C2C12 골격근세포에서 PPAR α 와 PPAR δ reporter 유전자 발현을 촉진하고, 지방산 산화를 촉진하는 효소의 발현을 증가시키며, 에너지 소비를 증가시키는 UCP3 발현을 증가시키고 골격근 세포의 지방축적을 억제함으로써 비만조절효과가 있음도 보고되었다⁶⁾. 그러나 GGE_x18의 분획물에서도 전체 추출물과 마찬가지로 비만조절효과가 있는지를 검증하는 것이 필요하다고 판단되어 GGE_x18의 분획물 중에서 ethyl acetate 분획물을 실험대상으로 본 연구에 착수하게 되었다.

본 연구에서는 GGE_x18의 5종의 분획물중에서 ethyl acetate 분획물이 in vivo 비만동물모델에서 식욕억제, 혈중 지질대사 개선, 지방세포의 크기 감소와 지방간의 억제제를 통하여 체중감량효과가 있음⁷⁾ 확인하였다. 이 분획물이 어떤 작용기전에 의하여 비만조절효과를 나타내는지 in vitro에서 분자생물학적 분석을 하였다. 즉, 3T3-L1 지방세포, C2C12 골격근세포와 NMu2Li 간세포를 이용하여 GGE_x18의 ethyl acetate 분획물의 처리가 지방산 산화효소의 유전자 발현을 조절하고, 지방축적의 조절에 관여하는지를 조사하였다.

실험재료 및 연구방법

1. 실험재료

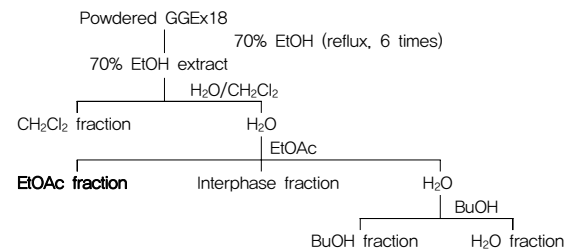
실험물질은 輕身降脂丸18 (GGE_x18)의 EtOAc 분획물 (EF)을 사용하였다. 그 제조과정은 다음과 같다 (Table 1-2).

- 경신강지환18의 조성약물은 화림제약 (Busan, South Korea)에서 구입하고, 동의대학교 한의과대학 방제학교실에서 정선한 뒤 분말하였다.
- 분쇄한 GGE_x18 (1 kg)을 냉각기를 부착한 삼각플라스크에 담고 70% EtOH를 1.5 L 넣은 후 2시간 동안 열수추출한다 (1.5 L \times 6).
- 추출액을 여과하고, rotary vacuum evaporator를 사용하여 농축한다.
- 70% EtOH 농축액 (306.48g)을 H₂O로 녹이고 분액깔때기에 부은 후, CH₂Cl₂를 넣어 흔든 다음 평형화 시킨다 (나머지 70% EtOH 농축액은 보관).
- CH₂Cl₂층 (하층)은 모아서 sodium sulfate로 처리한 다음 여과하여 농축하고, EtOAc를 H₂O층에 넣어 흔든 다음 평형화 시킨다.
- EtOAc층 (상층)은 모아서 sodium sulfate로 처리한 다음 여과하여 농축하고, BuOH를 H₂O층에 넣어 흔든 다음 평형화 시킨다.
- BuOH층 (상층)과 H₂O층 (하층)을 각각 따로 모아서 sodium sulfate로 처리한 다음 여과하고 농축하여 48.71g과 194.4g을 얻었다.

Table 1. The composition of GGE_x18

한약명	Ingredient	%
麻黃	<i>Ephedra sinica Stapf.</i>	40
昆布	<i>Laminaria japonica Aresch</i>	40
大黃	<i>Rheum palmatum L.</i>	20
Total amounts		100

Table 2. Ethanol extraction and fractionation of GGE_x18



2. 연구방법

1) 3T3-L1 지방세포의 배양과 분화

3T3-L1 preadipocyte를 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, Grand Island, NY, USA), penicillin G (100 U/ml), streptomycin sulfate (100 μ g/ml), amphotericin B (0.25 μ g/ml)와 2-mercaptoethanol (50 μ M)을 함유한 DMEM 배지에서 배양하였으며, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ humidified incubator에서 유지시킨 후 6-well tissue culture plate (2 \times 10⁴ cells/well)에 seeding 하였다.

3T3-L1 cell을 6-well plate에서 2일간 confluence 상태로 유지시킨 후, 1 μ M dexamethasone, 0.5 mM 1-methyl-3-isobutyl-xanthine, 1 μ g/ml insulin이 포함된 분화유도배지에서 2일간 배양하였으며, 이때 chemical들을 처리하였다. 이후 2일마다 DMEM 배지로 교체하며 8일까지 배양하였다 (Fig. 1).

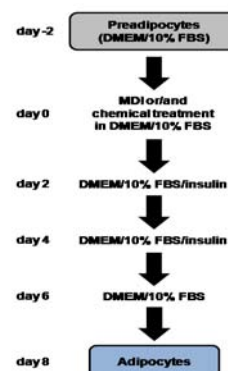


Fig. 1. Schematic illustration of the experimental procedure showing 3T3-L1 differentiation.

2) C2C12 골격근세포의 배양과 분화

골격근세포주인 C2C12 세포를 10% FBS, penicillin G (100 U/ml), streptomycin sulfate (100 μg/ml), amphotericin B (0.25 μg/ml), 그리고 2-mercaptoethanol (50 μM)이 포함되어 있는 DMEM 배지에서 배양하였으며, 37°C 온도와 5% CO₂가 공급되는 습윤한 조건을 유지시킨 후, 6-well tissue culture plate에 well 당 4 X 10⁵개의 세포수로 seeding 하였다.

C2C12 세포의 분화를 유도하기 위하여, C2C12 myoblast가 70% confluency에 도달했을 때 culture medium을 10% FBS 대신에 2% horse serum으로 교체하였다. 5일간 배양 후 cell들은 다핵성 myotube로 분화되었으며, EF의 chemical 처리 후 RNA 분석 및 Oil red O staining을 수행하였다 (Fig. 2).

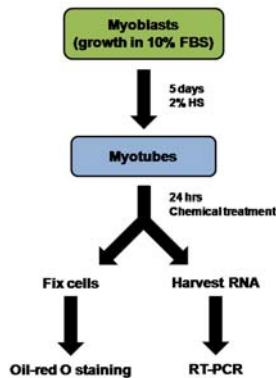


Fig. 2. Schematic illustration of the experimental procedure showing myogenic differentiation.

3) NMu2Li 간세포의 배양과 transient transfection

간세포주인 NMu2Li 세포를 10% FBS, penicillin G (100 U/ml), streptomycin sulfate (100 μg/ml), amphotericin B (0.25 μg/ml)와 2-mercaptoethanol (50 μM) 을 함유한 DMEM 배지에서 배양하였으며, 37°C, 5% CO₂ humidified incubator에서 유지시킨 후 transfection하기 24시간 전에 6 well tissue culture plate에 well 당 4×10⁴개의 세포수로 seeding 하였다.

Seeding 24시간 후 transfection을 하기위해 expression plasmid pSG5-mPPAR α , PPRE3-TK-luciferase repoter plasmid 및 pBSK를 준비하였다. Well당 200 ng의 plasmid가 사용 되었고 lipofectamine reagent (Invitrogen)를 사용하여 transfection 하였다. 반응 5시간 후 배지 1ml을 첨가하고 chemical을 처리하였다. chemical을 처리한 지 24시간 후 배지를 제거하고 배양한 세포에서 RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였다.

4) RNA isolation

Total RNA는 Trizol (Invitrogen, Avenue Carlsbad, USA)을 사용하여 Cell로부터 추출하며, 간단히 설명하면 다음과 같다. Total RNA를 추출하기 위해서 6 well plate의 1 well당 Trizol 500 μl씩 첨가하여 pipette tip을 사용하여 바닥에서 cell이 떨어지게 하여, 균질화된 용액을 상온에서 5분간 방치하였다. 여기에 chloroform (Sigma, USA) 200 μl

를 첨가한 후에 chloroform이 전체적으로 잘 섞이도록 15초 동안 혼합하며, 상온에서 5분간 방치한 후 원심분리 (13,000 rpm, 4°C, 15분) 하였다. 원심분리 된 용액에서 맑은 상층액만을 새로운 튜브에 분리하고 여기에 동량의 isopropanol (Sigma, USA)을 첨가하여 상온에서 10분간 방치한 후 원심분리 (13,000 rpm, 4°C, 20분) 하였다. 원심분리로 튜브 바닥에 형성된 RNA pellet에 80% ethanol 1 ml을 첨가하여 1회 세척하였으며 (13,000 rpm, 4°C, 5분), RNA pellet이 완전히 건조되면 0.01% DEPC로 처리된 증류수를 50 μl 첨가하여 RNA pellet을 용해시켰다.

5) RT-PCR

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 이용하여 mRNA의 양을 측정하였다. Complementary DNA는 total RNA 2 μg과 reverse primer 0.5 μg을 혼합하여 최종 양 14 μl를 준비하여 75°C에서 15분 동안 열처리 (heating)한 후, 5분 동안 얼음 속에 보관하였다. 여기에 5X M-MLV reaction buffer, 10 mM dNTP mixture, 200 units M-MLV RT (Promega, Madison, WI, USA)를 첨가하여 최종 양이 25 μl가 되게 한 후, 42°C에서 1시간 동안 반응시켰다. RT reaction 5 μl에 10X reaction buffer (Mg²⁺포함), 10mM dNTP, 5 unites Taq polymerase (Solgent, Taejon, South Korea), 그리고 10 μM primer를 첨가하여 최종 50μl가 되게 한 후, PTC-100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 PCR을 실시하였다. Table 3은 RT-PCR에 사용된 primer, 반응조건 및 product size이다.

6) Oil-red O staining

지방세포와 골격근세포의 지방축적 정도를 측정하기 위하여 chemical 처리된 3T3-L1 adipocyte와 C2C12 myotube를 10% phosphate-buffered formalin에서 1시간 고정시켰으며, Oil-red O로 2시간 염색시킨 후 현미경으로 관찰하였다.

Table 3. PCR primers and conditions used for RT-PCR

Gene	Primer sequence	AT (°C)	product size (bp)
AMPK α 1	F: 5'-aga ggg ccc gca ata aaa gat-3'	58	177
	R: 5'-tgt tgt aca ggc agc tga gg-3'		
AMPK α 2	F: 5'-act ata ttt ggc caa ttt tgt g-3'	58	219
	R: 5'-tgt ggc agt ggt ttc caa gcc -3'		
ACOX	F: 5'-act ata ttt ggc caa ttt tgt g-3'	58	196
	R: 5'-tgt ggc agt ggt ttc caa gcc -3'		
HD	F: 5'-caa aaa gat cgg aaa gat tg-3'	58	355
	R: 5'-ctg ata cca ccg ttt acc tg-3'		
thiolase	F: 5'-gga taa cct cgg aga atg tgg c-3'	60	380
	R: 5'-cac tea cct gac tgg agt tt-3'		
PPAR α	F: 5'-gcagctgtaacaggtca-3'	58	202
	R: 5'-ctc ttc atc ccc aag cgt ag-3'		
CPT-1	F: 5'-tat gtg agg atg ctg ctt cc-3'	58	586
	R: 5'-ctc gga gag cta agc ttg tc-3'		
MCAD	F: 5'-cgt cag agg tgt act ttg atg g-3'	60	380
	R: 5'-cat gga ctc agt cac ata ctg c-3'		
VLCAD	F: 5'-cgt cag agg tgt act ttg atg g-3'	60	268
	R: 5'-cat gga ctc agt cac ata ctg c-3'		
UCP2	F: 5'-ctg agc tgg tga cct atg ac-3'	58	310
	R: 5'-caa gct gct caa tag gtg ac-3'		
UCP3	F: 5'-gga gcc atg gca gtg acc tgt-3'	58	180
	R: 5'-tgt gat gtt ggg cca agt ccc-3'		
β -actin	F: 5'-tgg aat cct gtg gca tcc atg aaa c-3'	58	348
	R: 5'-taa aac gca gct cag taa cag tcc g-3'		

3. 통계분석

모든 값은 mean \pm standard deviation (SD)으로 표시하며, SigmaPlot 2001 (SPSS Inc, Chicago, IL)의 unpaired, student's t-test를 이용하여 통계적 유의성을 검증하였다.

實驗結果

1. 3T3-L1 지방세포에서 EF의 작용

GGE_x18의 분획물 EF에 의한 지방대사에 미치는 영향을 조사하기 위하여 neutral triglycerides를 염색시키는 Oil-red O 염색을 실시하였다. 미분화상태의 3T3-L1 cell은 가지모양으로 축적된 지방이 없으나 분화된 지방세포는 둥근 모양이 되고 세포질에 커다란 지방덩어리를 갖게 된다. 미분화세포인 ND 그룹과 비교하여 분화세포인 control 그룹에서 triglyceride droplet이 많이 발견되었으나, EF (0.1 μ g/ml)에서 지방축적이 크게 억제되었다 (Fig. 3).

지방세포에서 GGE_x18의 분획물 EF에 의한 지방대사에 미치는 영향을 조사하기 위하여 미토콘드리아의 지방산 β -산화효소인 very long chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD)와 medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD)의 mRNA 수준을 측정하였다. MCAD의 경우, ND 그룹에 비하여 control 그룹에서 42% 감소하였으며, VLCAD의 경우, 44% 감소하였다 ($p < 0.05$). 그러나 control 그룹과 비교하여 EF에서 MCAD mRNA 발현이 증가하였으며, VLCAD의 경우 EF에서 통계적으로 유의하게 증가하였다 (Fig. 4).

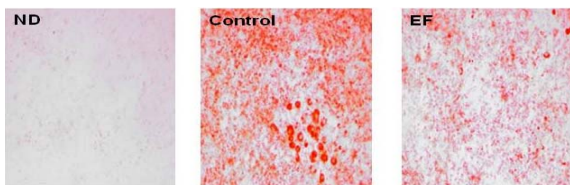


Fig. 3. Effects of EF on accumulation of triglycerides in 3T3-L1 cells.

3T3-L1 cells were differentiated as described in Materials and Methods and stained at day 8. Triglycerides were stained with Oil-red O. ND, non-differentiated cells; Control, cells differentiated with MDI; EF, differentiated cells treated with EF (0.1 μ g/ml).

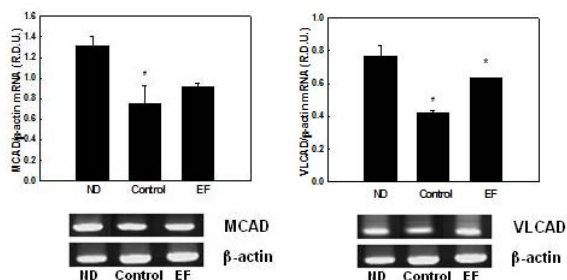


Fig. 4. Effects of EF on mRNA expression of genes involved in mitochondrial fatty acid β -oxidation in differentiated 3T3-L1 cells. # $p < 0.05$ compared with ND group. * $p < 0.05$ compared with control group. ND, non-differentiated cells; Control, cells differentiated with MDI; EF, differentiated cells treated with EF (0.1 μ g/ml).

2. C2C12 골격근세포에서 EF의 작용

골격근세포에서 GGE_x18의 분획물 EF에 의한 지방대사에 미치는 영향을 조사하기 위하여 lipids를 염색시키는 Oil-red O 염색을 실시하였다. 분화되기 전의 C2C12 cell은 가지모양의 myoblast (근아세포)로서 일종의 stem cell이며, horse serum에 의해 분화가 되면 myotube (근관)로 전환된다. 미분화세포인 ND 그룹과 비교하여 분화세포인 control 그룹에서 lipid droplet이 많이 발견되었으나, EF (10 μ g/ml) 처리에서 지방축적이 억제되었다 (Fig. 5).

근육조직과 근육세포에서 AMP-activated protein kinase (AMPK) 활성화는 PPAR α 발현을 증가시키고 궁극적으로 lipid oxidation을 촉진함으로써 비만조절과 혈당을 개선한다고 하였다^{9,10}. 위의 보고들을 바탕으로 GGE_x18의 분획물 EF가 골격근세포에서 AMPK와 PPAR α 를 활성화시키고, 지방산 산화를 촉진할 수 있는지 조사하였다. AMPK α 1 mRNA, AMPK α 2 mRNA와 PPAR α mRNA 수준을 측정된 결과 EF에서 통계적으로 유의하게 증가하였다 (Fig. 6). 또한 EF 그룹은 지방산 β -산화효소인 thiolase mRNA, MCAD mRNA와 지방산 전달효소인 carnitine palmitoyltransferase I (CPT-1)의 mRNA 수준은 통계적으로 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$) (Fig. 7) Uncoupling protein (UCP)인 UCP2와 UCP3 mRNA 수준을 조사하였을 때, UCP2 mRNA 발현은 통계적으로 유의하게 증가하였다 (Fig. 8).

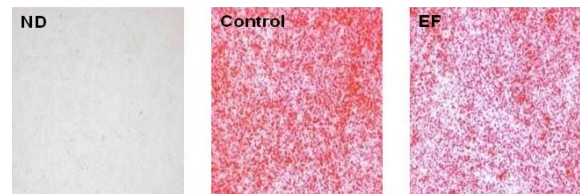


Fig. 5. Effects of EF on lipid accumulation in C2C12 cells. C2C12 cells were differentiated as described in Materials and Methods. Lipids were stained with Oil-red O. ND, non-differentiated cells; Control, cells differentiated with MDI; EF, differentiated cells treated with EF (10 μ g/ml).

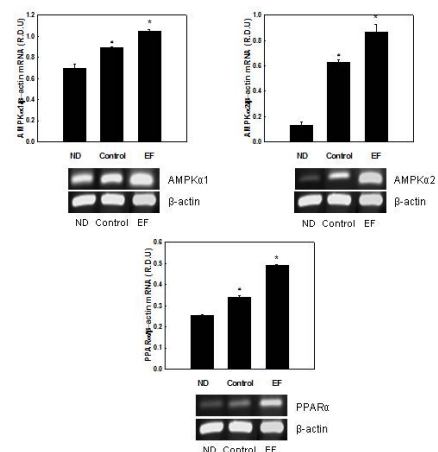


Fig. 6. Effects of EF on mRNA expression of AMPK α and PPAR α in C2C12 myotubes. # $p < 0.05$ compared with ND group. * $p < 0.05$ compared with control group. ND, non-differentiated cells; Control, cells differentiated with MDI; EF, differentiated cells treated with EF (10 μ g/ml).

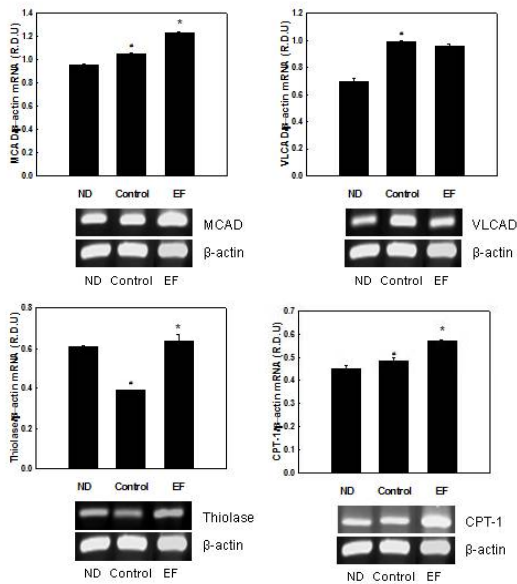


Fig. 7. Effects of EF on mRNA expression of genes involved in fatty acid oxidation in C2C12 myotubes. # p<0.05 compared with ND group. * p<0.05 compared with control group. ND, non-differentiated cells; Control, cells differentiated with MDI; EF, differentiated cells treated with EF (10 μ g/ml).

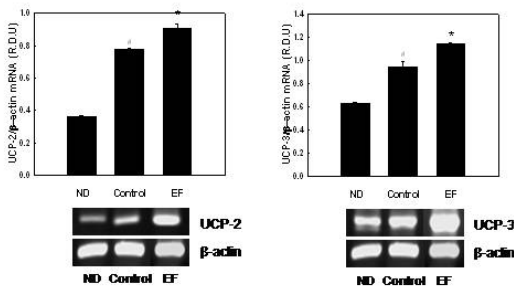


Fig. 8. Effects of EF on mRNA expression of UCPs in C2C12 myotubes. # p<0.05 compared with ND group. * p<0.05 compared with control group. ND, non-differentiated cells; Control, cells differentiated with MDI; EF, differentiated cells treated with EF(10 μ g/ml).

3. NMu2Li 간세포에서 EF의 작용

간세포는 지질대사가 활발하게 일어나는 장소로 지방산 산화효소의 작용이 활발하다. 따라서 GGEx18 분획물 EF에 의한 지질대사에 미치는 영향을 조사하기 위하여 지방산 산화효소의 mRNA 발현을 조사하였다. Peroxisome 지방산 β -산화효소의 발현 조절을 조사하기 위하여 acyl-CoA oxidase (ACOX)와 enoyl CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HD), thiolase의 mRNA 수준을 측정된 결과, 대조군과 비교하여 EF (0.1 μ g/ml)은 NMu2Li 간세포에서 ACOX와 HD mRNA를 통계적으로 유의하게 증가시켰다 (p<0.05) (Fig. 9). 이와 유사하게 미토콘드리아 지방산 산화효소의 발현 조절을 조사하기 위하여 VLCAD와 MCAD의 mRNA 수준을 측정된 결과, 대조군과 비교하여 EF는 VLCAD와 MCAD mRNA를 통계적으로 유의하게 증가시켰다 (p<0.05) (Fig. 10).

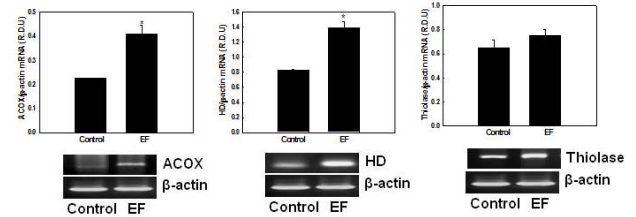


Fig. 9. Effects of EF on mRNA expression of genes involved in peroxisomal fatty acid β -oxidation in NMu2Li liver cells. Cells were transfected with PPAR α . * p<0.05 compared with control group.

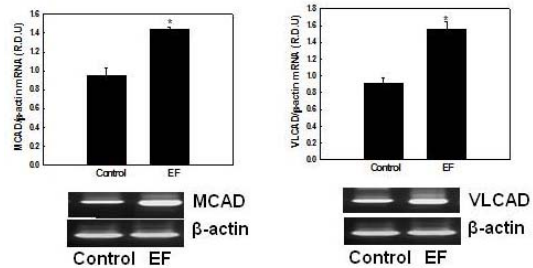


Fig. 10. Effects of EF on mRNA expression of genes involved in mitochondrial fatty acid β -oxidation in NMu2Li liver cells. * p<0.05 compared with control group.

考 察

3T3-L1 지방세포를 이용하여 GGEx18 분획물 EF가 지방산 산화효소의 유전자 발현을 조절하는지, 지방축적의 조절에도 관여하는지를 알아보았다.

비만의 발달은 지방조직의 증가에 의해 발생하며, 지방의 증가는 지방세포 크기 (hypertrophy)와 수의 증가 (hyperplasia)에 의하여 이루어진다⁸⁾. 본 연구에서는 GGEx18 분획물 EF에 의한 지방세포 크기에 대한 효과를 알아보고자 지방세포를 분화시킨 후 지방축적을 조사하였다. 그 결과, 미분화세포인 ND 그룹과 비교하여 분화세포인 control 그룹에서 triglyceride droplet이 많이 발견되었으나, EF (0.1 μ g/ml)에서 지방축적이 크게 억제되었다. 또한 지방세포에서 GGEx18의 분획물 EF에 의한 지방대사에 미치는 영향을 조사하기 위하여 미토콘드리아의 지방산 β -산화효소인 VLCAD와 MCAD의 mRNA 수준을 측정하였다. MCAD의 경우, ND 그룹에 비하여 control 그룹에서 42% 감소하였으며, VLCAD의 경우, 44% 감소하였다 (p<0.05). 그러나 control 그룹과 비교하여 EF에서 MCAD mRNA 발현이 증가하였으며, VLCAD의 경우 EF에서 통계적으로 유의하게 증가하였다. 이상의 결과로 보아 EF는 지방세포에서 지방산 산화효소의 발현을 증가시킴으로써 지방축적을 억제하여 지방세포의 크기를 감소시킬 수 있을 것으로 보인다.

C2C12 골격근세포를 이용하여 GGEx18 분획물 EF가 AMPK와 PPAR α 를 활성화시키고, 지방산 산화를 촉진하는지, UCP의 발현을 통해 에너지 소모에 관여하는지와 지방축적의 조절에도 관여하는지를 조사하였다.

근육조직과 근육세포에서 AMP-activated protein kinase (AMPK) 활성화는 PPAR α 발현을 증가시키고, 궁극적으로 lipid oxidation을 촉진함으로써 비만조절과 혈당을 개선한다고 하였다⁹⁻¹¹⁾. 또한 UCP 역시 지방산 산화를 촉진함으로써

비만의 조절에 관여한다고 알려져 있다¹²⁻¹⁵⁾. 위의 보고들을 바탕으로 GGE_x18의 분획물 EF가 골격근세포에서 AMPK와 PPAR α 를 활성화시키고, 지방산 산화를 촉진할 수 있는지 조사하였다. AMPK α 1 mRNA, AMPK α 2 mRNA와 PPAR α mRNA 수준을 측정된 결과 EF에서 통계적으로 유의하게 증가하였다. 또한 EF 그룹은 지방산 β -산화효소인 thiolase mRNA, MCAD mRNA와 지방산 전달효소인 carnitine palmitoyltransferase I (CPT-1)의 mRNA 수준은 통계적으로 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$). Uncoupling protein (UCP)인 UCP2와 UCP3 mRNA 수준을 조사하였을 때, UCP2 mRNA 발현은 통계적으로 유의하게 증가하였다. 미분화세포인 ND 그룹과 비교하여 분화세포인 control 그룹에서 lipid droplet이 많이 발견되었으나, EF (10 μ g/ml) 처리에서 지방축적이 억제되었다. 이상의 결과로 보아 EF는 골격근세포에서 AMPK 활성화를 통한 지방산 산화의 촉진을 통해 지방축적을 억제하는 것으로 보인다.

많은 연구들에 의하면 PPAR α 는 간에서 지방산 산화를 촉진함으로써 에너지대사에 관여한다고 보고하고 있다. Costet 등 (1998)은 PPAR α 유전자가 결핍된 마우스의 경우 암컷과 수컷 모두에서 정상 쥐에 비하여 몸무게가 통계적으로 유의하게 증가하며, PPAR α -null 마우스들은 fibrate에 반응하지 못해 시간이 지남에 따라 비만이 된다고 보고함으로써 최초로 PPAR α 와 비만과의 관련성을 보고하였다¹⁶⁾. 이후 당뇨병, 비만, 인슐린 저항성을 가진 실험동물과 고지방식을 섭취한 C57BL/6 마우스의 몸무게에 대한 fenofibrate의 효과가 보고되었다¹⁷⁻¹⁹⁾. 또한 fenofibrate는 고지방식에 의한 비만 쥐의 몸무게와 지방조직무게를 감소시켰고 이는 간에서의 fatty acid β -oxidation 증가 때문임을 밝힘으로써 PPAR α 가 비만조절작용에 중요한 역할을 할 것임을 제시하였다²⁰⁻²³⁾. 따라서 NMu2Li 간세포를 이용하여 GGE_x18 분획물 EF가 지방산 산화효소의 발현을 조절하는지를 조사하였다.

간세포는 지질대사가 활발하게 일어나는 장소로 지방산 산화효소의 작용이 활발하다. GGE_x18 분획물 EF에 의한 지질대사에 미치는 영향을 조사하기 위하여 지방산 산화효소의 mRNA 발현을 조사하였다. Peroxisome 지방산 β -산화효소의 발현 조절을 조사하기 위하여 acyl-CoA oxidase (ACOX)와 enoyl CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HD), thiolase의 mRNA 수준을 측정된 결과, 대조군과 비교하여 EF (0.1 μ g/ml)은 NMu2Li 간세포에서 ACOX와 HD mRNA를 통계적으로 유의하게 증가시켰다 ($p < 0.05$). 이와 유사하게 미토콘드리아 지방산 산화효소의 발현 조절을 조사하기 위하여 VLCAD와 MCAD의 mRNA 수준을 측정된 결과, 대조군과 비교하여 EF는 VLCAD와 MCAD mRNA를 통계적으로 유의하게 증가시켰다 ($p < 0.05$). 이상의 결과로 보아 EF는 간세포에서 지방산 산화효소의 발현을 촉진함으로써 지질대사를 조절할 수 있을 것으로 생각된다.

결론적으로 GGE_x18 분획물 EF는 3T3-L1 지방세포에서 미토콘드리아의 지방산 β -산화효소의 발현을 증가시키고, C2C12 골격근세포에서 AMPK와 PPAR α 의 활성화를 통하여 지방산 산화를 조절하고, 에너지소비를 증가시키는 UCP2의 발현을 늘리고, NMu2Li 간세포에서 지방산 산화효소의 발현을 촉진함으로써 지방축적을 억제하여 비만을 조절하는 것으로 생각된다.

結 論

3T3-L1 지방세포, C2C12 골격근세포와 NMu2Li 간세포를 이용하여 GGE_x18의 ethyl acetate 분획물 (EF)이 지방산 산화효소의 유전자 발현을 조절하는지, 그리고 지방축적의 조절에도 관여하는지를 조사하여 다음의 결론을 얻었다.

1. 3T3-L1 지방세포에서 대조군과 비교하여 EF는 MCAD의 mRNA 발현을 증가시켰으나 통계적인 유의성은 없었으며, VLCAD의 mRNA 발현을 통계적으로 유의하게 증가시켰다.
2. 3T3-L1 지방세포에서 대조군과 비교하여 EF (0.1 μ g/ml)는 지방축적을 크게 억제하였다.
3. C2C12 골격근세포에서 대조군과 비교하여 EF는 AMPK α 1, AMPK α 2와 PPAR α 의 mRNA의 수준을 통계적으로 유의하게 증가시켰다.
4. C2C12 골격근세포에서 대조군과 비교하여 EF는 지방산 β -산화효소인 thiolase mRNA, MCAD mRNA와 지방산 전달효소인 carnitine palmitoyltransferase I (CPT-1)의 mRNA 수준을 통계적으로 유의하게 증가시켰다.
5. C2C12 골격근세포에서 대조군과 비교하여 EF는 에너지 소비에 관여하는 UCP2의 mRNA 발현을 통계적으로 유의하게 증가시켰다.
6. C2C12 골격근세포에서 대조군과 비교하여 EF (10 μ g/ml)는 지방축적을 억제하였다.
7. NMu2Li 간세포에서 EF (10 μ g/ml)는 ACOX, HD, VLCAD와 MCAD mRNA를 통계적으로 유의하게 증가시켰다.

결론적으로 GGE_x18 분획물 EF는 3T3-L1 지방세포에서 미토콘드리아의 지방산 β -산화효소의 발현을 증가시키고, C2C12 골격근세포에서 AMPK와 PPAR α 의 활성화를 통하여 지방산 산화를 조절하고, 에너지소비를 증가시키는 UCP2의 발현을 늘리고, NMu2Li 간세포에서 지방산 산화효소의 발현을 촉진함으로써 지방축적을 억제하여 비만을 조절하는 것으로 생각된다.

參考文獻

1. Herbology Association of Korea's Colleges of Oriental Medicine. 『Textbook of Herbology』. First Edition. Seoul: younglim press, 2004: 154-6, 285-7, 510-1.
2. Xue Min Gao editor-in-chief. 『Chinese Herbology Medicine』(part 1). First Edition. Beijing: People's

- Medical Publishing House, 2000 : 178, 595.
3. Xue Min Gao editor-in-chief, 『Chinese Herbology Medicine』(part 2), First Edition, Beijing : People's Medical Publishing House, 2000 : 1246.
 4. Ki Hyeon Yoon, Hee Young Lee, Yang Sam Jung, Bu-Il Seo, Gyu-Ryeol Park, Michung Yoon, Soon Shik Shin, Modulation of obesity by Gyeongshingangjeehwan18 in ob/ob mice. The Korea Journal of Herbology 2010 ; 25(3) : 3-8.
 5. Yoo In Yang, GGE_x18 reduces body weight gain and increases PPAR alpha target gene in high fat diet induced obese mice. thesis for the degree of doctor of oriental medicine, the graduate school, Dongeui University, 2009 : 8-50.
 6. Chang Min Cha, Modulation of GGE_x18 by fatty acid β -oxidation in C2C12 skeletal muscle. thesis for the degree of master of oriental medicine, the graduate school, Dongeui University, 2009 : 9-21.
 7. Ki Jeong Park, Ethyl acetate fraction of GGE_x18 modulates feeding efficiency ratio and blood leptin level in high fat diet-fed obese mice. thesis for the degree of master of oriental medicine, the graduate school, Dongeui University, 2011 : 8-32.
 8. Couillard C, Mauriège P, Imbeault P, Prud'homme D, Nadeau A, Tremblay A, Bouchard C, Després JP. Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia. Int J Obes Relat Metab Disord 2000 ; 24 : 782-8.
 9. Suzuki A, Okamoto S, Lee S, Saito K, Shiuchi T, Minokoshi Y. Leptin stimulates fatty acid oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene expression in mouse C2C12 myoblasts by changing the subcellular localization of the alpha2 form of AMP-activated protein kinase. Mol Cell Biol. 2007 ; 27(12) : 4317-27.
 10. Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Müller C, Carling D, Kahn BB. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. Nature. 2002 ; 415(6869) : 339-43.
 11. Lim CT, Kola B, Korbonits M. AMPK as a mediator of hormonal signalling. J Mol Endocrinol. 2010 ; 44(2) : 87-97.
 12. Clapham JC, Arch JR, Chapman H, Haynes A, Lister C, Moore GB, Piercy V, Carter SA, Lehner I, Smith SA, Beeley LJ, Godden RJ, Herrity N, Skehel M, Changani KK, Hockings PD, Reid DG, Squires SM, Hatcher J, Trail B, Latcham J, Rastan S, Harper AJ, Cadenas S, Buckingham JA, Brand MD, Abuin A. Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. Nature 2000 ; 406 : 415-8.
 13. Wang S, Subramaniam A, Cawthorne MA, Clapham JC. Increased fatty acid oxidation in transgenic mice overexpressing UCP3 in skeletal muscle. Diabetes Obes Metab 2003 ; 5 : 295-301.
 14. Hesselink MK, Mensink M, Schrauwen P. Human uncoupling protein-3 and obesity : an update. Obes Res 2003 ; 11 : 1429-43.
 15. Choi CS, Fillmore JJ, Kim JK, Liu ZX, Kim S, Collier EF, Kulkarni A, Distefano A, Hwang YJ, Kahn M, Chen Y, Yu C, Moore IK, Reznick RM, Higashimori T, Shulman GI. Overexpression of uncoupling protein 3 in skeletal muscle protects against fat-induced insulin resistance. J Clin Invest 2007 ; 117 : 1995-2003.
 16. Costet P, Legendre C, More J, Edgar A, Galtier P, Pineau T. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-isoform deficiency leads to progressive dyslipidemia with sexually dimorphic obesity and steatosis. J Biol Chem. 1998 ; 273 : 29577-85.
 17. Chaput E, Saladin R, Silvestre M, Edgar AD. Fenofibrate and rosiglitazone lower serum triglycerides with opposing effects on body weight. Biochem Biophys Res Commun 2000 ; 271 : 445-50.
 18. Guerre-Millo M, Gervois P, Raspe E, Madsen L, Poulain P, Derudas B, Herbert JM, Winegar DA, Willson TM, Fruchart JC, Berge RK, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity. J Biol Chem. 2000 ; 275 : 16638-42.
 19. Mancini FP, Lanni A, Sabatino L, Moreno M, Giannino A, Contaldo F, Colantuoni V, Goglia F. Fenofibrate prevents and reduces body weight gain and adiposity in diet-induced obese rats. FEBS Lett. 2001 ; 491 : 154-8.
 20. Yoon M, Jeong S, Nicol CJ, Lee H, Han M, Kim J, Seo Y, Ryu C, Oh GT. Fenofibrate regulates obesity and lipid metabolism with sexual dimorphism. ExpMolMed. 2002 ; 34 : 481-8.
 21. Yoon M, Jeong S, Lee H, Han M, Kang J-H, Kim EY, Kim M, Oh GT. Fenofibrate improves lipid metabolism and obesity in ovariectomized LDL receptor-null mice. Biochem Biophys Res Commun. 2003 ; 302 : 29-34.
 22. Jeong S, Kim M, Han M, Lee H, Ahn J, Kim M, Song Y-H, Shin C, Nam K-H, Kim T W, Oh G T, Yoon, M. Fenofibrate prevents obesity and hypertriglyceridemia in LDL receptor-null mice. Metabolism, 2004 ; 53 : 607-13.
 23. Jeong S, Yoon M. Inhibition of the actions of peroxisome proliferator-activated receptor alpha on obesity by estrogen. Obesity 2007 ; 15 : 1430-40.