

## 3T3-L1 전지방세포에서 발효 삼정환의 지방 분화 억제 효과

송미영 · S. Bose · 김호준<sup>†</sup>

동국대학교 한의과대학 한방재활의학과 교실

### Effect of Probiotics-Fermented Samjunghwan on Differentiation in 3T3-L1 Preadipocytes

Mi-Young Song, Shambhunath Bose, and Ho-Jun Kim<sup>†</sup>

Dept. of Oriental Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine,  
Dongguk University, Gyeonggi-do 410-773, Korea

#### Abstract

Samjunghwan (SJH) was fermented using five different probiotic bacterial strains (*Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus acidophilus* or *Bifidobacterium longum*) separately. We examined the inhibition of preadipocyte differentiation through Oil Red O staining and analyzed the expression of CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$  (C/EPB $\alpha$ ), peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ), uncoupling protein (UCP)-2, and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase which are adipogenic transcription factors. Both *Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus faecium*-fermented SJH reduced Oil Red O dye staining compared with the same dose of non-fermented SJH. Only *Lactobacillus plantarum*-fermented SJH inhibited all adipogenic transcription factors and showed the best down-regulation of PPAR  $\gamma$ , UCP-2, and HMG-CoA reductase compared with the same dose of non-fermented SJH. The effect of SJH on the inhibition of preadipocyte differentiation was more prominent from the fermented SJH. *Lactobacillus plantarum*-fermented SJH, in particular, blocks the expression of PPAR  $\gamma$ , UCP-2, HMG-CoA reductase.

**Key words:** Samjunghwan, 3T3-L1 preadipocyte, probiotics, fermentation

#### 서 론

오늘날 현대사회는 급속하게 비만인구가 증가하고 있는데, 2010년 국민건강영양조사에 따르면 성인의 비만율이 30.8%로 3명중 1명이 비만인 것으로 나타났다(1). 비만은 에너지 섭취와 소비간의 불균형에 의해 섭취가 소비를 능가할 때 과도하게 체지방이 축적되는 현상으로 고지혈증, 고혈압, 당뇨병 및 동맥경화증 등 각종 질환의 발병률을 증가시키는 요소이다(2). 비만치료를 위해 사용되는 약물 다수가 지방변, 오심, 구토, 두통, 불면증, 위장장애 등의 부작용이 발생할 수 있다고 보고된 바 있으며(3), 특히 많이 사용되어 왔던 sibutramine의 경우는 최근 뇌졸중이나 심근경색과 같은 심혈관 질환의 발생 가능성을 높이는 부작용이 밝혀져 국내 판매가 금지되었다(4). 이러한 상황에서 최근 다양한 천연물로부터 비만에 적용 가능한 식품 혹은 약물소재를 찾고자 하는 연구들이 활발히 진행되고 있다.

삼정환(三精丸)은 동의보감에 “오래 복용하면 몸을 가볍게 하고 수명을 연장시키며, 얼굴을 동자와 같이 되도록 하는 효능이 있다”라고 기록되어져 있는 처방으로 오디(상심

자) 20근과 창출, 지골피 각 1근으로 구성된다. 상기 약재들을 가루 및 즙으로 내어서 고루 섞은 뒤 용기 내에서 밀봉 상태로 숙성시킨 후 환으로 제조한다고 소개되어 있어(5) 발효 과정을 거친 후 제조했음을 유추할 수 있다. 기존 연구에서 구성약물인 오디의 항고지혈증, 항산화, 지질대사 개선의 효과(6,7)와 창출의 혈압강압효과(8), 콜레스테롤 저하효과(9) 및 지골피의 혈당(10), 혈압 강하효과(11) 등이 각각 밝혀져 있다. 또한 삼정환의 항비만 효과를 관찰한 연구에서 발효하지 않은 삼정환을 고지방 식이를 시킨 흰쥐에 30주간 투여한 결과 체중 및 leptin, acetyl-CoA carboxylase, fatty acid synthetase가 감소된 것으로 나타났다(12). 또한 발효한 삼정환을 6주간 투여한 결과 복강 내 지방조직을 감소시키고 혈중지질을 개선시키는 것으로 밝혀졌지만, 발효하지 않은 삼정환과 비교한 연구는 아니었다(13). 삼정환 발효 유무에 따른 항비만 효과를 비교한 연구는 없었으며, 또한 세포수준에서 항비만 효과를 관찰한 연구도 찾을 수가 없었다.

인간의 장내 박테리아 가운데 유산균은 대표적으로 가장 많이 사용되고 있는 프로바이오틱스(probiotics)로서 장운동조절, 병원성 세균의 억제, 소화 흡수의 촉진, 변비 설사

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: kimklar@dongguk.ac.kr  
Phone: 82-31-961-9111, Fax: 82-31-961-9009

방지 등의 영양생리적인 건강 증진과 더불어 발효유제품, 자연발효식품, 가축의 사료 및 제약 분야에서 다양하게 사용되고 있다(14). 유산균 및 발효식품의 여러 건강 증진 작용 중 지질대사개선효과에 대하여 주목하여 보면, *Lactobacillus acidophilus*(15), *Streptococcus faecalis*(16), *Lactobacillus plantarum*(17) 및 *Enterococcus faecium*(18)의 콜레스테롤 저하효과가 밝혀져 있다. 또한 대표적인 발효음식인 고추장의 경우 3T3-L1 지방세포에서 지방축적을 억제시키고, sterol regulatory element-binding protein 1-c(SREBP-1c)와 peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ )를 저하시켜 지방생성을 억제하는 것으로 나타났으며(19), 김치 유산균 분말의 항비만 효과 역시 밝혀진 바 있다(16). 이상과 같이 유산균 및 발효식품의 항비만 효과에 대한 연구는 활발히 진행되고 있으나, 유산균을 이용한 발효 약물의 제품 개발에 대한 연구는 미미한 실정이다. 최근 발효한약에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 발효 한약이란 한약재를 유익한 종균으로 발효시켜 원래 한약이 가지는 약효를 증가시키거나 부작용을 줄이고 새로운 기능이 추가된 것을 말한다(20). 발효 한약은 약효성분의 체내흡수율과 생체이용률을 극대화시키고, 소화기 불내성 등의 부작용을 최소화하여 기존 한약의 효과를 증강시킬 뿐만 아니라(21) 장내 미생물의 균형을 도울 수 있는 장점(22)이 있어 최근 주목받고 있지만, 항비만 효과에 대한 연구는 아직 부족한 상황이다. 비만치료 목적으로 처방되는 한약에서 다용되는 약물인 마황을 *Lactococcus confusus*로 발효시켰을 때, 3T3-L1 세포에서 PPAR- $\gamma$ 의 발현량을 감소시키고 tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )를 증가시켰으며, 동물실험에서 발효 마황이 불안 등의 자율신경계 부작용을 감소시킨 것으로 나타난 연구가 있었으나(23), 그 외 발효 한약의 항비만 효과 연구는 거의 보고되지 않고 있다.

본 연구에서는 발효 삼정환의 지방 분화 억제 효과를 연구하기 위해서 삼정환을 5가지 주요 유산균으로 각각 발효시킨 후, 3T3-L1 전지방세포의 분화 억제 활성과 CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$ (C/EPBa), PPAR  $\gamma$ , uncoupling protein(UCP)-2와 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A(HMG-CoA) reductase의 유전자 발현 억제 작용 등을 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

상심자, 창출, 구기자는 동국대학교 일산한방병원(Dongguk University Ilsan Oriental Hospital, Ilsan, Korea)에서 구입하였으며, 상심자 425 g을 분쇄하여 만든 즙 250 cc에 구기자 21.25 g, 창출 21.25 g을 섞은 후, 70°C에서 초음파 처리하여 입자들을 고루 분산시킨 후, 지속적인 흔들림을 주면서 항온수조에서 70°C로 3시간 동안 처리하였다. 이렇

**Table 1. Bacterial strains used for fermentation of Sam-junghwan (SJH)**

Fermented SJH formulations	Bacterial strains used for fermentation
FH1	<i>Lactobacillus plantarum</i>
FH2	<i>Enterococcus faecium</i>
FH3	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
FH4	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
FH5	<i>Bifidobacterium longum</i>

게 제조된 삼정환의 pH는 4.6이었으며, 이를 10 N NaOH 용액을 이용하여 pH를 6.5로 맞춘 후, 121°C에서 20분간 고압 멸균하였다. 실온에서 식힌 후 Cellbiotech(Kimpo, Korea)에서 구입한 *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum* 5종의 유산균을 삼정환에 접종(1% v/v)하여 48시간 동안 발효시켰다(Table 1). 발효되지 않은 삼정환 대조군은 세균 접종 대신에 2%(v/v) 살균수를 사용한 것을 제외하고는 같은 방법으로 준비하였다. 마지막으로 모든 시료들을 각각 저속으로 원심분리 시켜서 침전물을 제외시키고 상등액만을 시료로 사용하였다.

### 3T3 L1 세포배양 및 분화유도

실험에 사용한 3T3-L1 세포는 마우스 지방전구세포로 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였고, 10% fetal bovine serum(FBS, Invitrogen, Grand Island, NY, USA)과 100 unit/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin(Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA)이 함유된 DMEM(Invitrogen) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 배양하였다. 3T3-L1 전지방세포를 Western Blotting과 Real-time PCR 실험을 위해 6 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well의 세포수로 분주했고, Oil red O 염색 실험을 위해서는 12 well culture plates에  $0.5 \times 10^5$  cells/well의 세포수로 분주했다. 2~3일마다 한 번씩 신선한 배지로 보충하면서 완전한 confluency가 될 때까지 기다렸다. 그 후 세포를 DMEM 배지에서 분리하여 다른 DMEM 배지로 이동시켜서 약물처리 없이 그대로 두거나(DMEM군), 또는 DM 배지(differential medium, DMEM에 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx), 0.25 mM dexamethasone, 10  $\mu$ g/mL insulin, 10% FBS, 100 unit/mL penicillin와 100  $\mu$ g/mL streptomycin이 첨가된 분화배지)로 이동시켜서, 여기에 발효된 삼정환(실험군)과 발효하지 않은 삼정환(대조군)을 각각 50, 100, 200  $\mu$ L/mL 농도로 처리하여서 Western Blotting, Real-time PCR 실험에 사용하였고, 동일 약물들을 100  $\mu$ L/mL 농도로 처리하여 Oil red O 실험에 사용하였다. 이 상태로 4일간 배양 후 배지를 제거하고 동일한 처치를 반복하였다. 추가로 3일을 더 배양한 후 Oil red O 염색 혹은 Real-time PCR, Western Blotting을 시행하였다.

### Oil Red O 염색

앞의 과정을 거친 다음 배지를 제거해서 pH 7.4 PBS로 세척하고 10% formalin 용액으로 2시간 동안 고정한 이후, 60% isopropanol로 세척하였다. 완전히 건조시킨 후 Oil red O 염색액을 처리하여 1시간 상온에서 염색하고, 염색액을 제거한 후 물로 여러 번 세척하였다. Microscope(Olympus BX61, Tokyo, Japan)로 관찰한 후, Olympus DP70 digital camera로 캡처하였다.

### Western blot 분석

처리된 세포를 PBS(pH 7.4) 용액으로 세척한 후, HEPES lysis buffer에 넣고 4°C에서 20분간 용해시켰다. 세포를 수거하여 14,000×g, 4°C에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 회수하여 BCA Protein Assay kit(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 단백질을 정량하였다. 100 mM DTT를 포함한 Laemmli sample buffer에서 95°C로 변성시킨 후 단백질 30 µg을 10% SDS-PAGE로 resolve한 후, nitrocellulose membrane에 transfer시켰다. 5% 무지분유가 첨가된 tris-buffered saline(TBS, pH 7.6)에 넣고 상온에서 1시간 동안 blocking 시킨 후, anti-HMG-CoA reductase antibody, anti-PPAR- $\gamma$  antibody, anti-uncoupling protein-2 antibody(Millipore, Billerica, MA, USA) 혹은 anti- $\beta$  actin antibody(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)와 4°C에서 overnight 반응하였다. 세척 후, horseradish peroxidase-conjugated goat anti-Rabbit IgG (Thermo Scientific)을 2차 항체로 하여 배양하였다. 그 후 chemiluminescence solution(ECL)으로 처리하여 image reader(LAS-3000, Fuji Photo Film, Tokyo, Japan)로 분석하였다. Resultant protein band의 강도는 densitometry로 측정하였고, 단백질의 정량은  $\beta$ -actin을 참고로 하여 분석하였다.

### Real time PCR

각 약물로 처리된 세포를 PBS(pH 7.4) 용액으로 세척한 후, Trizol® reagent(Invitrogen)를 이용하여 total cellular RNA를 추출하였다. 각각의 실험 약물군에서 얻어진 2 µg의 RNA는 cDNA synthesis kit(Sprint™ RT Complete Oligo-(dT)18, Clontech, Mountain View, CA, USA)를 이용해 역전사하여 first strand cDNA를 얻었다. RT-PCR 샘플은 LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green(Roche Applied Science, Indianapolis, ID, USA)을 이용하여 최종 반응 용량을 20 µL로 하여 LightCycler instrument(Roche Applied Science)에서 진행하였다. Primer 종류 및 서열은 Table 2에 표시한 바와 같다. PCR amplification은 C/EPBa

에서는 95°C에서 10분 동안 prior incubation 후, 50 cycle의 amplification(95°C에서 10초간 denaturation, 52°C에서 10초간 annealing, 72°C에서 15초간 extension) 하였고 GAPDH에서는 95°C에서 10분 동안 prior incubation 후, 35 cycle의 amplification(95°C에서 10초간 denaturation, 52°C에서 10초간 annealing, 72°C에서 15초간 extension) 하였다. 반응의 특이도를 확인하기 위해서 증폭할 때마다 melting curve 분석을 수행하였다. 데이터는 LightCycler Software(Roche Diagnostics, Penzberg, Germany)로 분석하였다. 각각의 분석에서 cDNA 대신 물을 음성 대조군으로 사용하여 발생 가능한 primer-dimer 형성을 체크하였다. 유전자의 전사레벨은 GAPDH를 기준으로 삼아  $2^{-\Delta Ct}$ (목표한 유전자의 threshold 값-GAPDH의 threshold 값)를 구하는 방식으로 계산되었고, 유전자의 발현량은 differentiation media만 처리한 대조군을 1.0으로 간주하여 상대적인 값을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 3T3-L1 전지방세포에서 지방세포로의 분화 억제 효과

발효 삼정환이 3T3-L1 세포가 전지방세포에서 지방세포로 분화되는 과정에 작용하여 지방구의 생성을 억제하는지를 확인하기 위해서 Oil Red O 염색액을 이용하여 3T3-L1 세포 내에 생성된 지방구를 염색한 후 현미경으로 관찰하였다. 분화배지(differentiation media, DM)만 처리한 군에 비해서 대조군인 발효하지 않은 삼정환의 염색된 지방구 수가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 발효 삼정환군 중에서는 DM군에 비해서 FH1과 FH2에서 지방구 수의 감소를 확인할 수 있었지만, FH 3, 4, 5에서는 뚜렷한 감소를 확인할 수 없었다(Fig. 1).

### 발효 삼정환의 C/EPBa, PPAR $\gamma$ , UCP-2, HMG-CoA reductase의 유전자 발현 억제 효과

발효 삼정환에 의한 지방축적 감소가 어떤 분자 생물학적 기전에 의해 유도되는지 확인하기 위해서 지방전구세포의 분화를 유도하면서 삼정환 및 발효 삼정환을 처리한 후, C/EPBa의 mRNA 및 PPAR $\gamma$ , UCP-2, HMG-CoA reductase의 단백질 발현 정도를 분석해보았다. 전지방세포에서 지방세포로 분화되는 과정에는 지방 축적에 의한 지방구 생성의 형태학적인 변화뿐만 아니라, 지방세포 특이적 단백질 marker들의 발현 증가와 같은 생태학적 변화가 나타나며, 이와 함께 지방세포 분화와 관련된 transcription factor들의 발현과 adipokine들의 분비가 증가 또는 감소 양상을 나타낸다(24-26). 그중 가장 중요한 활성인자로 C/EPBa, PPAR $\gamma$ 를

Table 2. The primer sequence used for Real-time PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer
GAPDH	CGCAAGAGCCGAGATAAGC	CACGGCTCAGCTGTTCCA
C/EPBa	CGCAAGAGCCGAGATAAGC	CACGGCTCAGCTGTTCCA

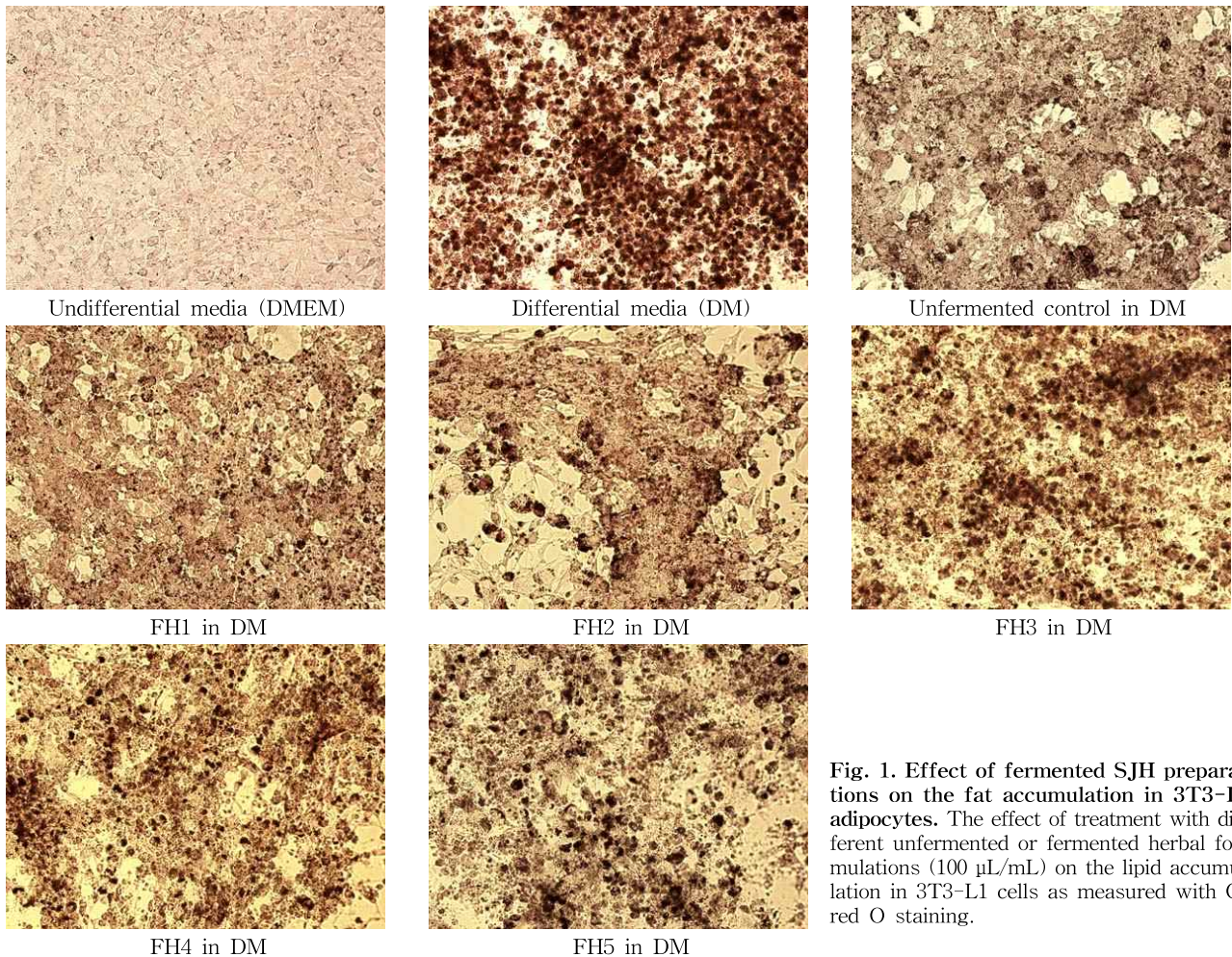


Fig. 1. Effect of fermented SJH preparations on the fat accumulation in 3T3-L1 adipocytes. The effect of treatment with different unfermented or fermented herbal formulations (100  $\mu$ L/mL) on the lipid accumulation in 3T3-L1 cells as measured with Oil red O staining.

들 수 있다(27). C/EPBa는 basic leucine zipper군에 속하는 전사인자로서 제일 처음 지방세포 분화에 관여하는 인자로 밝혀졌으며, PPAR $\gamma$ 는 nuclear hormone receptor superfamily 중 하나이며, retinoid X receptor(RXR)와 heterodimer를 형성하여 표적유전자의 발현을 조절하는 전사인자이다. C/EPBa, PPAR $\gamma$ 는 분화 초기에 발현이 유도되어 분화 후기가 되면 다양한 adipogenic 유전자들의 발현을 유도하며, 분화된 지방세포에서 발현양이 현저하게 증가되는 양상을 나타낸다(28,29).

우선 C/EPBa 유전자의 발현 정도를 Real time PCR법을 이용하여 관찰하였다. 그 결과 DM군에 비해 FH4(50)군을 제외하고는 모두 억제되는 것이 관찰되었으며, 각 농도별로 발효하지 않은 삼정환 대조군에 비해서 효과를 나타낸 것은 FH1(50), FH2(200), FH2(50), FH3(50), FH5(200) 및 FH5(50)이었다. 그중 FH2(200)이 동일 농도의 대조군에 비해 C/EPBa의 발현을 57% 억제시켜 억제 효과가 가장 좋은 것으로 관찰되었다(Fig. 2).

PPAR $\gamma$ 의 유전자 발현 정도는 Western blot 방법으로 관찰하였는데, 각 군에서 나타난 밴드의 농도가 짙을수록 단백질 발현량이 많은 것을 의미한다(Fig. 3). 이를 정량적

로 분석했을 때 DM군에 비해서 FH1(200), FH2(200), FH5(200)에서만 감소된 것으로 관찰되었으며, 각 농도별로 대조군과 비교하면 FH1(200), FH2(200)에서 효과를 나타내었다. 그중 FH1(200)이 동일 농도의 대조군에 비해 PPAR $\gamma$ 를 35%를 억제시켜 가장 효과가 좋은 것으로 나타났다(Fig. 4).

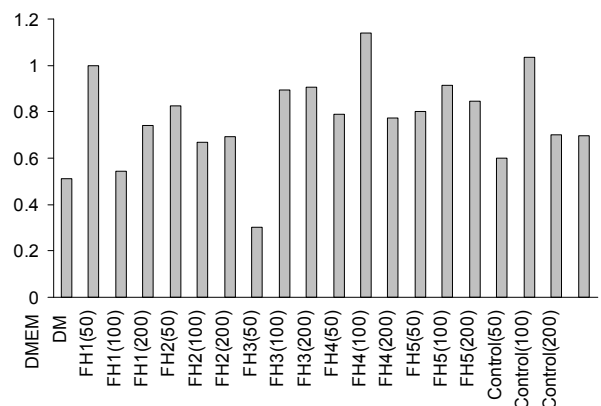


Fig. 2. Effect of fermented SJH preparations on the gene expression of C/EPBa. The effect of treatment with different unfermented or fermented herbal formulations at varying doses on the gene expression of C/EPBa in 3T3-L1 cells.

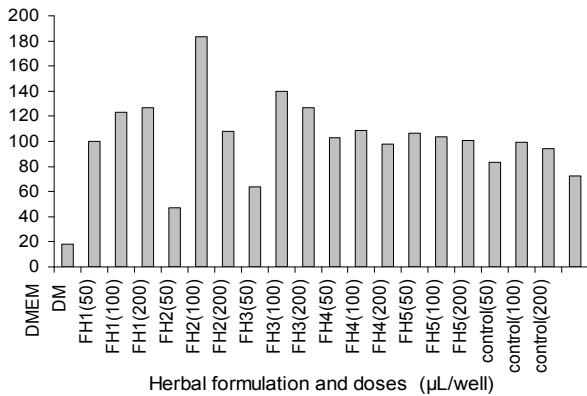


**Fig. 3.** Effect of fermented SJH on expression of PPAR  $\gamma$ , UCP-2 and HMG-CoA reductase. Immunoblots showing the effect of treatment with different unfermented or fermented herbal formulations at varying doses on the level of expression of PPAR  $\gamma$ , UCP-2, HMG-CoA reductase, and  $\beta$ -actin levels in 3T3-L1 cells. The detailed experimental conditions are mentioned in Materials and Methods for Western blotting.

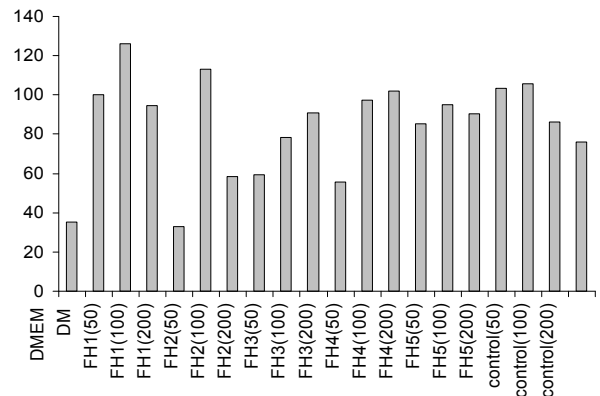
미토콘드리아 내막에 존재하는 단백질인 UCP 중 UCP-2는 백색지방조직, 근육, 뇌, 간 등 체내에 광범위하게 분포하여 에너지 대사를 조절하는 물질이다. 당분, 지방산, glutamine 등 영양분이 과다하게 되면 UCP-2가 증가된다. UCP-2의 증가는 ATP 생성을 감소시켜서  $\beta$ -cell의 기능장애를 일으켜 대사율을 저하시키고 비만에 이르게 하는 것으로 밝혀져 있으며, 또한 인슐린 분비를 억제하는 것으로도 알려져 있다(30). 반대로 UCP-2의 억제는 비만, 고혈당 및 고지질에서 유도된  $\beta$ -cell의 기능장애를 막는 역할을 한다(31,32). Western blot으로 UCP-2의 유전자 발현 정도를 분석했을 때 Fig. 3과 같은 결과를 얻었으며, 이를 정량적으로 분석했을 때, DM군에 비해서 FH1(50), FH2(50)을 제외하고는 모

두 감소되는 결과를 보였으며, 각 농도별로 대조군에 비해서 FH1(200), FH2(200), FH2(100), FH3(200), FH3(50), FH4(50), FH5(50)이 효과를 나타냈다. 그중 FH1(200)군이 UCP-2의 발현을 57% 억제시켜 효과가 가장 우수한 것으로 관찰되었다(Fig. 5).

세포내에서 합성되는 콜레스테롤 조절 효소인 HMG-CoA reductase의 활성도는 혈장 콜레스테롤 농도를 일정하게 유지하는데 중요한 역할을 하므로 항고지혈증 제제의 주요 타겟이 되는 효소이다. HMG-CoA reductase의 활성이 저하되면 LDL-receptor의 활성이 증가하여 혈청 콜레스테롤 농도가 감소하므로 고콜레스테롤혈증을 예방, 치료하는데 유용한 것으로 알려져 있다(33). HMG-CoA reductase의



**Fig 4.** Effect of fermented SJH preparations on the expression of PPAR  $\gamma$ . The effect of treatment with different unfermented or fermented herbal formulations at varying doses on the level of PPAR  $\gamma$  in 3T3-L1 cells.



**Fig. 5.** Effect of fermented SJH on expression of UCP-2. The effect of treatment with different unfermented or fermented herbal formulations at varying doses on the level of UCP-2 in 3T3-L1 cells.

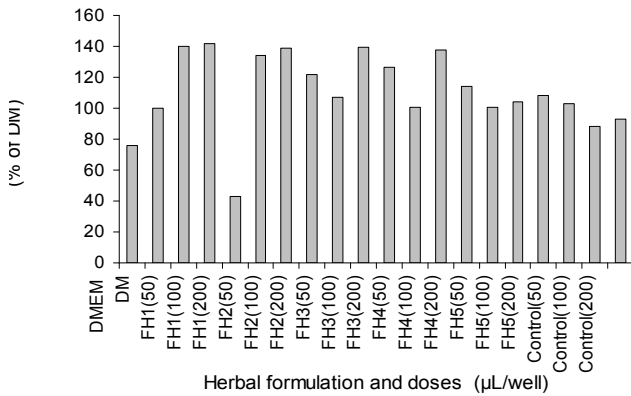


Fig. 6. Effect of fermented SJH on expression of HMG-CoA reductase. The effect of treatment with different unfermented or fermented herbal formulations at varying doses on the level of HMG-CoA reductase in 3T3-L1 cells.

Western blot 실험에서 Fig. 3과 같은 결과를 얻었으며, 이를 정량적으로 분석했을 때, FH1(200)에서만 DM 및 대조군에 비해서 낮게 측정되었고 대조군과 비교했을 때 54% 억제시키는 것으로 나타났다(Fig. 6).

한편 C/EPBa에서 FH2(200)와 UCP-2, HMG-CoA reductase에서 FH1(200)이 분화시키지 않은 DMEM보다 발현이 억제된 것으로 나타났는데, 추가 실험을 통해 재확인 필요한 부분이다.

발효하지 않은 삼정환은 Oil Red O 실험에서 약물 처치를 하지 않은 DM군에 비해 염색된 지방구 수가 감소하여 지방량이 측정되는 정도를 감소시켰으며, 농도가 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  이상일 때 C/EPBa, PPAR  $\gamma$ , UCP-2 및 HMG-CoA reductase를 억제하여 삼정환의 지방 분화 억제 효과를 확인할 수 있었다. 발효했을 때 이 효과가 더욱 증가하는지를 확인하기 위해서 발효하지 않은 삼정환과 발효 삼정환을 동일 농도에서 비교해보았다. 발효균주로 쓰인 유산균의 종류에 따라 항비만 효과의 차이를 보였는데, *Lactobacillus plantarum*으로 발효한 삼정환의 효과가 가장 높은 것으로 나타났다. *Lactobacillus plantarum*으로 발효한 삼정환은 발효하지 않은 삼정환에 비해서 Oil Red O 실험에서 염색된 지방구 수가 감소하였으며, 농도가 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 일 때 동일 농도의 발효하지 않은 삼정환보다 PPAR  $\gamma$  35%, UCP-2 57% 및 HMG-CoA reductase를 54% 더욱 억제시키면서 이상의 부분에서 실험군 중 가장 높은 억제율을 나타냈다. 그러나 C/EPBa의 경우 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 에서만 억제될 뿐, 그 이상의 농도에서는 오히려 수치가 증가한 것으로 나타나 C/EPBa의 억제 효과는 분명히 결론내리기 어려웠다. *Enterococcus faecium*으로 발효한 삼정환의 경우, 발효하지 않은 삼정환에 비해서 역시 Oil Red O 실험에서 염색된 지방구 수가 감소하였고 C/EPBa, PPAR  $\gamma$ , UCP-2의 3개 항목에서 억제 효과를 나타냈으며, 농도가 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 일 때 동일 농도의 발효하지 않은 삼정환보다 C/EPBa를 54% 더욱 억제시켜, C/EPBa 1개 항목에서 실험군 중 가장 높은 억제율을 나타냈다. *Lactobacillus*

*plantarum*은 lactic acid bacteria 중 가장 흔한 유산균으로 김치(34), 된장(35)에 많이 함유된 유산균이다. Lactic acid bacteria는 콜레스테롤 저하효과, 항당뇨효과가 있고(36-38), 그중 *Lactobacillus plantarum*은 hepatic cholesterol을 담즙산으로 분해시키는 과정을 증가시키는 기전을 통해 LDL cholesterol, triglyceride 저하시키는 것으로 밝혀진 유산균이다(17).

본 연구 결과 3T3-L1 전지방세포에서 지방 분화 억제 효과를 보인 삼정환을 발효시켰을 때 그 효과가 더욱 증가하였고, 특히 *Lactobacillus plantarum*으로 발효한 삼정환은 가장 우수한 효과를 나타냈는데, PPAR  $\gamma$ , UCP-2, HMG-CoA reductase의 유전자 발현을 down regulation시킴으로써 지방 생성 혹은 콜레스테롤 합성을 저해하는 것으로 확인되었다. 그러나 항비만 활성을 나타내는 여러 가지 반응경로가 있으므로 다른 작용 기전 관련 down-stream 단백질의 활성화 및 또 다른 신호전달체계에 관한 연구는 더욱 진행되어야 할 것이다. 또한 지질개선, 인슐린 분비 개선 및 체중 감소 효과뿐만 아니라 유효성분의 변화, 2차 생성물의 유무 및 독성의 변화 등 발효로 인한 약성의 변화도 연구되어야 할 부분이다.

## 요 약

본 연구에서는 3T3-L1 전지방세포를 이용하여 발효 삼정환의 지방 분화 억제 효과를 확인하고자 하였다. 삼정환을 5가지 주요 유산균으로 각각 발효시킨 후, Oil Red O 염색법으로 지방세포 분화 억제 여부를 알아보고, 이의 기전을 알기 위해서 지방생성에 핵심적인 역할을 하는 transcription factor 및 지질 조절 효소의 유전자 발현량을 비교하여 보았다. Oil Red O 염색 분석에서는 *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*으로 발효한 삼정환에서 지방구 수의 감소를 확인할 수 있었다. 또한 transcription factor로 C/EPBa, PPAR  $\gamma$ , UCP-2 및 콜레스테롤 조절과 관련된 효소인 HMG-CoA reductase의 4가지 유전자 발현 정도를 분석하였는데, 발효시키지 않은 삼정환의 경우 농도가 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  이상일 때 네 가지 항목에서 억제 효과를 나타냈으며, 발효시켰을 때는 유산균의 종류에 따라 효과 억제효과가 있었는데, *Lactobacillus plantarum*으로 발효한 삼정환이 효과가 가장 좋은 것으로 나타났다. *Lactobacillus plantarum*으로 발효한 삼정환은 동일 농도의 발효하지 않은 삼정환과 비교했을 때, Oil Red O 실험에서 염색된 지방구 수가 더욱 감소하였으며, PPAR  $\gamma$ , UCP-2, HMG-CoA reductase의 경우 농도가 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 일 때 각각 35%, 57%, 54%로 5가지 발효 삼정환 중 가장 높은 억제율을 나타내었다. 이에 지방 분화 억제 효과를 가진 삼정환을 발효시키면 그 효과가 더욱 증가하는 것으로 나타났는데, 특히 *Lactobacillus plantarum*으로 발효한 삼정환은 PPAR  $\gamma$ , UCP-2, HMG-CoA reduc-

tase의 유전자 발현조절을 통해 지방 분화를 억제시키는 것으로 밝혀져 발효 삼정환은 항비만 혹은 항고지혈증 약물로 개발 가능성이 있는 것으로 사료된다.

## 문 헌

1. KNHANES. Health behaviors and chronic disease statistics, 2010. [http://knhanes.cdc.go.kr/knhanes/sub04/sub04\\_03.do?pageNo=1&classType=7](http://knhanes.cdc.go.kr/knhanes/sub04/sub04_03.do?pageNo=1&classType=7).
2. Spiegelman BM, Flier JS. 2001. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104: 531-543.
3. Soon JY. 2008. Pharmacological treatment of obesity. *J Korean Soc Endocrinol* 23: 223-233.
4. KFDA. <http://www.kfda.go.kr/antidrug/index.do?nMenuCode=53&mode=view&boardSeq=2367>.
5. Huh J. 1999. *Dongyibogam*. Bubin Press, Seoul, Korea. p 132.
6. Lee EJ, Bae JH. 2011. Study on the alleviation of an alcohol induced hangover and the antioxidant activity by mulberry fruit. *Korean J Food & Nutr* 24: 204-209.
7. Kwon EH, Jang HS, Kim SW, Choi SW, Rhee SJ, Cho SH. 2007. Effects of mulberry juice and cake powders on blood glucose and lipid lowering and erythrocytic antioxidative enzyme activities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Nutr* 40: 199-210.
8. Kim AJ, Park SJ, Rho JO. 2008. Mulberry fruit extract consumption is inversely associated with hyperlipidemia in middle-aged men. *Korean J Food & Nutr* 21: 121-126.
9. Ko ST, Moon YH, Kim SO. 1973. Effect on hypertension of *Rhizoma Atractylodis*. *Yakhak Hoeji* 17: 103-110.
10. Han HK, Yoon SJ, Kim KH. 2009. Effects of compositae plants on plasma glucose and lipid level in streptozotocin induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 674-682.
11. Sung NK, Kim SH, Seo YB, Oh AH. 1994. Effect on blood glucose, hypertension of *Lycium chinense miller*. *J Herbology* 9: 161-171.
12. Jeong HJ. 2005. Effects of samjungwan on obesity and lipid metabolism in high fat diet rats. *MS Thesis*. Dongguk University Gyeongju, Korea.
13. Kim JH, Kim GW, Koo BS. 2009. Effects of *Samjung-hwan (Sanjingwan)* on obesity and lipid metabolism in rats with high fat diet. *J Oriental Neuropsychiatry* 20: 47-60.
14. An YT. 2011. Health functional food and probiotics. The Korean Society of Food and Nutrition Conference, Busan, Korea. p 32-43.
15. Gilliland SE, Nelson CR, Maxwell C. 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* 49: 377-381.
16. Ishihara K, Shin R, Shiina T, Yamamoto H, Isoda M. 1989. Influence of intestinal bacteria on cholesterol metabolism. In *Intestinal Flora and Bio-Homeostasis*. Mitsuoka T, ed. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan. p 121.
17. Jeun J, Kim S, Cho SY, Jun HJ, Park HJ, Seo JG, Chung MJ, Lee SJ. 2010. Hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 by increased bile acid excretion in C57BL/6 mice. *Nutrition* 26: 321-330.
18. Zaccani C, Bottazzi V, Rebecchi A, Bosi E, Sarra PG, Tagliaferri L. 1992. Serum cholesterol levels in axenic mice colonized with *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiologica* 15: 413-417.
19. Ahn IS, Do MS, Kim SO, Jung HS, Kim YI, Kim HJ, Park KY. 2006. Antiobesity effect of *Kochujang* (Korean fermented red pepper paste) extract in 3T3-L1 adipocytes. *J Med Food* 9: 15-21.
20. Kim KY, Song HJ. 2002. *Herbal processology*. Shinil Press, Seoul, Korea. p 547.
21. Kim YM. 2009. A study on the trend of researches in fermented herb medicines. *MS Thesis*. Kyungwon University, Gyeonggi-do, Korea. p 1-10.
22. Park JH, Kim HJ, Lee MJ. 2009. The role of gut microbiota in obesity and utilization of fermented herbal extracts. *J Soc Korean Med Obes Res* 9: 1-14.
23. Shin YJ, Kim HJ, Lee MY. 2009. The effects of fermented *Ephedra sinica* on obese rats fed by high fat diet. *J Oriental Rehab Med* 19: 37-57.
24. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. 2000. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 14: 1293-1307.
25. Jeon T, Hwang SG, Hirai S, Matsui T, Yano H, Kawada T, Lim BO, Ki D. 2004. Red yeast rice extracts suppress adipogenesis by down-regulating adipogenic transcription factors and gene expression in 3T3-L1 cells. *Life Sci* 75: 3195-3203.
26. Cowherd RM, Lyle RE, McGehee RE Jr. 1999. Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 10: 3-10.
27. Cornelius P, MacDougald OA, Lane MD. 1994. Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr* 14: 99-129.
28. Morrison RF, Farmer SR. 2000. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr* 130: 3116S-3121S.
29. Rosen ED, MacDougald OA. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 885-896.
30. Dalgaard LT. 2011. Genetic variance in uncoupling protein 2 in relation to obesity, type 2 diabetes, and related metabolic traits: focus on the functional -866G>A promoter variant (rs659366). *J Obes* doi: 10.1155/2011/340241.
31. Joseph JW, Koshkin V, Saleh MC, Sivitz WI, Zhang CY, Lowell BB, Chan CB, Wheeler MB. 2004. Free fatty acid-induced beta-cell defects are dependent on uncoupling protein 2 expression. *J Biol Chem* 279: 51049-51056.
32. Joseph JW, Koshkin V, Zhang CY, Wang J, Lowell BB, Chan CB, Wheeler MB. 2002. Uncoupling protein 2 knockout mice have enhanced insulin secretory capacity after a high-fat diet. *Diabetes* 51: 3211-3219.
33. Endo A. 1992. The discovery and development HMG-CoA reductase inhibitors. *J Lipid Res* 32: 1569-1582.
34. Kim HT, Park JY, Lee GG, Kim JH. 2003. Isolation of a bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain from kimchi. *Food Sci Biotechnol* 12: 166-170.
35. Tamang JP, Sarkar PK. 1996. Microbiology of mesu, a traditional fermented bamboo shoot product. *Int J Food Microbiol* 29: 49-58.
36. Yadav H, Jain S, Sinha PR. 2007. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. *Nutrition* 23: 62-68.
37. Pereira DIA, Gibson GR. 2002. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37: 259-281.
38. Simons LA, Amansec SG, Conway P. 2006. Effect of *Lactobacillus fermentum* on serum lipids in subjects with elevated serum cholesterol. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16: 531-535.