

소리쟁이 분획물의 지방세포 분화 억제 효과

박성진 · 최준혁 · 정연섭 · 유미희*
계명대학교 식품가공학 전공

Inhibitory Effect of *Rumex Crispus* L. Fraction on Adipocyte Differentiation in 3T3-L1 Cells

Sung-Jin Park, Jun-Hyeok Choi, Yeon-Seop Jung, and Mi Hee Yu*
Department of Food Science and Technology, Keimyung University

Abstract The anti-obesity effect of ethanol extract and their fractions from *Rumex Crispus* L. on the differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes to adipocytes was investigated by suppressing adipocyte differentiation and lipid accumulation with Oil red O assay, western blot and real-time PCR analysis. Ethyl acetate fraction of *Rumex crispus* L. significantly inhibited adipocyte differentiation when treated during the adipocyte differentiation process, as assessed by measuring fat accumulation using Oil red O staining. In inducing differentiation of 3T3-L1 preadipocytes in the presence of an adipogenic cocktail, isobutylmethylxanthine (IBMX), dexamethasone- and insulin- along with ethyl acetate fraction residue processing treatment significantly decreased protein expression of obesity-related proteins, such as peroxisome-proliferators-activated-receptor- γ (PPAR γ) and CCAAT enhancer-binding-proteins α (C/EBP α). These results indicate that ethyl acetate fraction of *Rumex crispus* L. is the most effective candidate for preventing obesity. However further studies will be needed to identify the active compounds that confer the anti-obesity activity of ethyl acetate fraction from *Rumex crispus* L.

Keywords: *Rumex Crispus* L., adipocytes, PPAR γ , C/EBP α , SREBP1c

서 론

현대사회는 생활환경의 편이, 교통의 발달, 과학과 의학의 발달로 인하여 과거에 비하여 매우 풍족한 생활을 누리고 있다. 하지만 신체활동의 감소와 함께 과도한 칼로리 섭취로 인한 과체중이나 비만이 미국, 영국 등의 선진국뿐만 아니라 일부 개발도상국에서도 증가하고 있고, 세계보건기구(World Health Organization, WHO)는 2000년부터 비만을 주요 보건의료 문제로 지정하였다(1,2).

비정상적인 지방세포의 크기와 숫자로 지방세포는 지방축적의 직접적인 원인이며, adipokine의 생산과 분비를 통하여 adipogenesis 과정으로 분화가 일어나며 지방세포의 크기증가(hypertrophy)와 숫자증가(hyperplasia)는 비만뿐만 아니라 염증, 당뇨 등 만성대사 질환에 영향을 미친다(3-6).

지방세포의 체내기능은 몸에 필요한 에너지를 축적하는 세포로, 필요시 중성지방(triacylglyceride)을 분해시켜 이용한다. 하지만 최근 연구에 의하여 지방조직은 에너지 축적의 기능뿐만 아니라, 내분비 기관으로 지방대사, 당 대사를 포함한 체내 에너지 대사를 조절하는 기능을 수행하는 역할을 하는 것으로 알려졌다

(7-9). 지방세포는 mesenchymal precursor에서 preadipocyte를 거쳐 지방세포로 분화되며, 분화과정 동안 형태적, 생화학적 변화를 통하여 체내 지방을 축적하며, 지방조직은 크기의 증가, 새로운 preadipocyte로부터 분화된다(10).

지방세포의 분화는 지방 조직세포에 특징적으로 발현되는 유전자들의 조절부위에 작용하는 transcription factor들이 지방세포로 분화되는 과정에서 발현된다. 인슐린은 지방 세포의 분화를 유도하는 호르몬으로 지방세포 대사 조절에 관여하는 주요 외부 인자이다(11,12). 지방세포는 분화 동안 C/EBP family, PPAR- γ , ADD1/SREBP1 등의 전사인자들의 전사 발현이 증가하고 이들 전사인자들은 상호 전사를 유도하여 지방세포를 분화하여 지방 축적, 지방합성, 지방수송에 관여하는 인자들을 작용시켜 에너지 생산 및 비만에 이르게 한다(13,14).

현재 국내외에서 비만 치료를 위해 사용하고 있는 치료제에는 orlistat을 주원료로 하는 제니칼이 있다. 제니칼의 경우는 소장에서 리파아제의 작용을 억제하여 지방변, 가스생성, 지용성비타민 흡수저하 등의 위장계 부작용을 수반하여 부작용이 없는 천연물을 이용한 비만 연구가 필요하다(15-17).

소리쟁이(*Rumex crispus* L.)는 마디풀과(Polygonaceae)에 속하는 다년초 식물로서 우리나라 전국 각지에서 자생하고 있으며, 들이나 개울가 등의 습한 곳에서 잘 자란다. 소리쟁이는 부위별로 다양한 생리활성 성분을 함유하고 있으며, 본초강목에서는 굵은 부위나 부스럼에 붙이면 효능이 좋으며, 맛이 달고 성질은 미끄러우며 차고 독이 없다고 기록되어 있다. 민간에서는 변비, 소화불량, 장출혈 등에 효과가 있다고 보고되었다. 소리쟁이의 유용성분으로는 emodin, nepodin 등과 플라보노이드, 폴리페놀 등 다양한 항산화 물질이 함유되어 있다(18-21).

*Corresponding author: Mi Hee Yu, Department of Food Science and Technology, College of Natural Sciences, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea
Tel: 82-53-580-5538
Fax : 82-53-580-5538
E-mail : yumh55@kmu.ac.kr
Received August 16, 2012; revised October 22, 2012;
accepted November 7, 2012

본 연구에서는 3T3-L1 지방전구세포가 지방세포로 분화하는 과정에서 소리쟁이 추출물 및 분획물의 분화억제에 미치는 영향을 알아보기 위해서 소리쟁이의 극성, 비극성 성분을 70% ethanol (Et), hexane(H), chloroform(Ch), ethyl acetate(Ea), butanol (Bu), water(W) 순으로 순차 분획하였다. 각 추출물 및 분획물을 이용하여 3T3-L1 세포에서 Oil red O 염색 및 triglyceride 함량을 측정하였고, 분화 관련 전사인자 및 각종 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하여 현재까지 이용가치가 떨어지는 소리쟁이를 비만 억제 천연소재로 개발하기 위한 기초자료 마련에 도움이 되고자 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

추출물의 제조 및 계통적 분획

실험에 사용된 소리쟁이는 건조 상태의 것을 구입하여 사용하였다. 시료 무게의 10배량의 70% ethanol (Et) (w/v)로 24시간 동안 정치 배양하여 총 3회 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman No. 3, Clifton, NY, USA)를 사용하여 여과하고 상등액은 rotary vacuum evaporator(UNI TRAP UT-1000, Eyela, Tokyo, Japan)로 55°C에서 농축하여 동결 후 사용하였다. 동결된 에탄올 추출물을 20배(w/v)의 증류수에 녹인 후 *n*-hexane (H), chloroform (Ch), ethyl acetate (Ea) 및 butanol (Bu)을 순차적으로 3회 반복 추출하여 각 용매별로 계통 분획 하였고 남은 수용성 층은 농축하여 water 분획으로 감압 농축하여 speed vacuum으로 남은 유기용매를 휘발시켜 동결건조하여 사용하였다.

3T3-L1 지방전구세포의 배양 및 분화 유도 및 시료처리

실험에 사용된 3T3-L1 세포는 ATCC(Manassas, VA, USA)에서 분양 받아 사용하였다. 배양 및 분화 배지는 Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose(DMEM: Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 10% calf serum, antibiotics를 첨가하여 5% CO₂, 37°C 인큐베이터에서 배양하여 세포가 confluent 상태가 되면 trypsin/EDTA를 처리하여 세포를 원심분리(L-70, Bekman Coulter, Fuller-

ton, CA, USA)하여 세포를 모아서 3×10⁵ cells/well의 밀도로 6 well에 분주한 후 100% confluency 상태에서 48시간 방치 후 DMEM에 10% BCS와 23 mg/mL IBMX(Sigma-Aldrich, Chem. Co., St. Louis, MO, USA), 5 mg/mL insulin(Sigma-Aldrich), 1 mM dexamethasone(Sigma-Aldrich)이 첨가된 배지(MDI)를 처리하여 분화를 48시간 동안 유도하고 그 후 2일 마다 10% FBS DMEM 배지에 5 mg/mL의 insulin이 첨가된 배지를 교체해주었다. 시료의 처리는 분화유도 배지 첨가 시점부터 같이 처리하였다.

MTT assay

시료의 세포증식과 독성을 측정하기 위해 Green 등의 방법(22)에 따라 3-(3,4-dimethyl-thiazolyl-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) assay를 실시하였다. MTT assay는 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT가 불용성의 보라색 formazan으로 환원되는 원리를 이용한 방법으로, 생성된 formazan의 흡광도는 살아있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다. 세포를 1×10⁴ cells/well으로 96 well plate에 분주하고 24시간 배양 후 새로운 배지를 샘플과 함께 처리하여 24시간 후 MTT 시약을 5 mg/mL 농도로 10 µL를 각 well에 가하고 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 상층액을 제거하고 각 well에 100 µL의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 ELISA reader(Spectra MAX M2, Molecular Devices Inc, Sunnyvale, CA, USA)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

Oil red O 염색

3T3-L1 전구지방세포를 9일 동안 분화시킨 후 배지를 제거하고 phosphate buffered saline(PBS)로 세척하고 10% formaldehyde 용액으로 세포를 고정시켰다. 다시 PBS로 세척 후, Oil red O 용액을 첨가하여 30분간 실온에서 염색하고, Oil red O 용액을 제거한 후 증류수로 세척하여 건조시킨 다음 위상차 현미경을 이용하여 관찰하고 100% isopropyl alcohol로 염색된 지방구를 용해하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Table 1. The primer sequence used for real-time PCR

Target		Primer sequences	Accession No.
GAPDH	Sense	GTATGATCCACTCACGGCA	NM_002046.3
	Anti-sense	GGTCTCGCTCCTGGAAGAGG	
PPAR γ	Sense	GGAGCCTAAGTTTGAGTTTGCTGTG	NM_011146.3
	Anti-sense	TGCAGCAGGTTGTCTTGGATG	
C/EBP α	Sense	TTGAAGCACAATCGATCCATCC	NM_007678.3
	Anti-sense	GCACACTGCCATTGCACAAG	
SREBP/C	Sense	AGCCTGGCCATCTGTGAGAA	NM_011480.3
	Anti-sense	CAGACTGGTACGGGCCACAA	
ACS	Sense	GTCTTTGCCACATCCGACCTATC	NM_007981.3
	Anti-sense	TTAGTGCAAACCCAGTTGTGCTTC	
FAS	Sense	AGCACTGCCTTCGGTTCAGTC	NM_007988.3
	Anti-sense	AAGAGCTGTGGAGGCCACTTG	
FATP1	Sense	CAGACGGACGTGGCTGTGTA	NM_011977.3
	Anti-sense	GCCGAGCATAGGATGCAAGAA	
FABP4	Sense	TGGGAACCTGGAAGCTTGTCTC	NM_024406.2
	Anti-sense	GAATTCCACGCCAGTTTGA	
Perilipin	Sense	GATGAGAGCCATGACGACCAGA	NM_175640.2
	Anti-sense	TGTGTACCACACCACCCAGGA	

중성지방축적

Cell을 lysis하여 4°C에서 14,000×g으로 10분간 원심 분리하여 상등액을 취하고 0.02 mL 중성지방 표준용액에 조제한 반응시약은 (주)아산제약 중성지방 kit(AM 157S-K, Seoul, Korea)를 3 mL씩 첨가하여 혼합하고 37°C에서 5분간 반응시켜 550 nm에서 흡광도를 측정한다. 시료의 흡광도 값을 식에 대입하여 중성지방 농도를 계산하였다.

Western blot법

지방세포 분화과정에서 발현하는 인자 PPAR- γ , C/EBP- α 단백질을 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 western blot을 실시하였다. 분화와 샘플처리가 완료된 세포를 2-3회 PBS로 세척한 후 1 mL의 lysis buffer를 첨가, 30분-1시간 동안 용해시킨 후 13,000×g에서 10분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin(BSA)를 표준화 한 Bio-Rad protein assay kit(Hercules, CA, USA)를 사용하여 정량하였다. 4°C에서 13,000×g으로 10분간 원심 분리한 상등액은 단백질을 정량한 후 10% running gel과 4.5% stacking gel을 이용하여 125 V에서 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 실시하였다.

전기영동으로 분리한 단백질은 immobilon-P transfer membrane과 transfer buffer(20% methanol, 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine)를 사용하여 350 mA에서 120분간 transfer시켰다. 단백질이

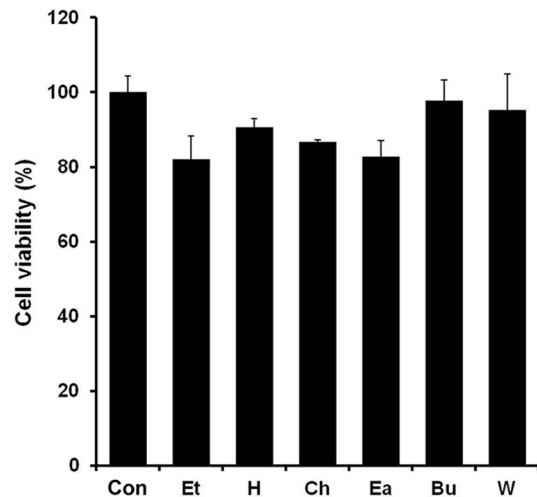


Fig. 1. Effect of RC on cell viability in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 preadipocytes were maintained with adipocyte-induction media for 9 days and treated with extracts and their fractions from *Rumex crispus* L. (50 μ g/mL) every 2 days. Cell viability was calculated as a percentage of MTT metabolism in controls. Results represent the mean \pm SD of three independent experiments. Con (control), Et (70% ethanol extract), H, (hexane fraction), Ch (chloroform fraction), Ea (ethyl acetate fraction), Bu (butanol fraction), W (water fraction)

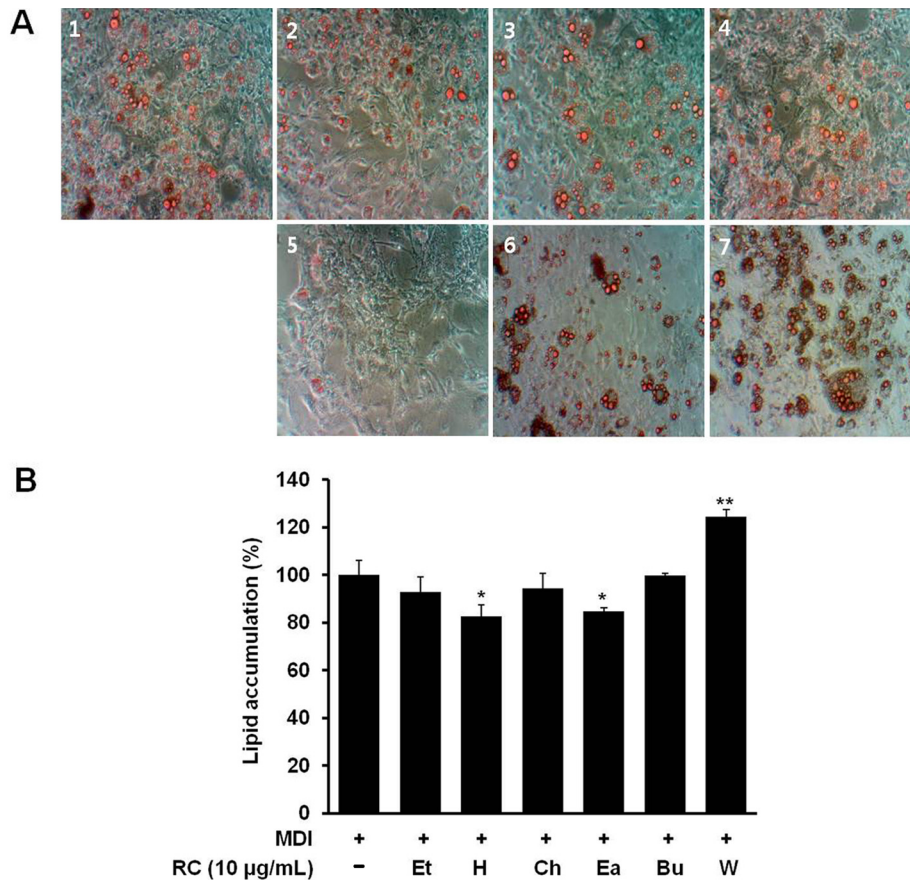


Fig. 2. Inhibitory effect of RC on the lipid accumulation in 3T3-L1 adipocyte. Differentiating 3T3-L1 cells were treated with every 2 days with extracts and their fractions from *Rumex crispus* L. (10 μ g/mL) for 9 days in adipocyte-induction media. Intracellular lipids were stained with Oil red O (A). To determine the accumulation of lipid content, Oil red O dye was dissolved in isopropanol and optical density detected at 510 nm (B). Results were presented as means \pm SD in triplicate. * p <0.05, ** p <0.01 compared to MDI treated positive control cells. 1: differentiated control, 2: 70% ethanol extracts of *Rumex crispus* L. (Et), 3: hexane fraction (H), 4: chloroform fraction (Ch), 5: ethyl acetate fraction (Ea), 6: *n*-butanol fraction (Bu), 7: water fraction (W).

이동된 membrane은 fast green solution으로 transfer의 유무를 확인한 후, 5% non-fat skim milk solution으로 blocking하였다. 이차항체의 발현 정도를 검토하기 위하여 TBST(Tris-Buffered Saline and Tween 20) 용액에 1:1000으로 희석하여 24시간 반응시킨 후 TBST로 3회 세척하였다. 계속하여 이차항체를 2시간 반응시키고 다시 TBST로 3회 세척하였다. 증류수로 세척하고 membrane에 ECL detection kit의 발색시약과 1:1로 섞은 후에 혼합액을 도포하고, X-ray film에 노출하여 현상한 후 film상의 band 농도를 관찰하였다.

Real-time PCR법

지방세포 분화가 완료된 세포에서 배지를 제거하고 PBS로 두 번 세척한 후 TRI reagent를 처리하였다. 이것을 1.5 mL tube에 1 mL씩 담고 1-bromo-3-chloropropane을 200 µL 첨가하여 30초간 vortex하여 원심분리(3,000×g, 15분, 4°C)하고, 상등액을 취해 새로운 tube에 옮겼다. 여기에 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20°C에서 2시간 이상 방치하고 나서 원심분리(13,000×g, 15분, 4°C)한 후 상등액을 제거하였다. 침전물에 75% ethanol을 첨가하여 제거한 후 diethyl pyrocarbonate(DEPC) 처리된 증류수를 첨가하여 65°C 수조에서 10분간 반응시켜 침전물을 녹였다.

추출된 RNA를 이용하여 cDNA를 합성 후 SYBER Green (Takara, Ohtsu, Japan)과 분화 발현 인자인 PPAR-γ, C/EBP-α, SREBP-1을 확인하고, 지방 축적, 합성, 저장에 관련된 ACS, FAS, FATP1, FABP4 그리고 perilipin의 유전자 발현을 알아보기 위해 real-time PCR(Takara)을 실시하였다. Primer(Bioneer Co., Granville, NY, USA)의 염기서열은 Table 1과 같다. Real-time PCR은 초기변성 95°C 30초, 변성은 95°C 5초, annealing은 60°C 15초, 신장반응은 72°C 10초로 하여 40 cycle을 진행했다. 용해 곡선은 55°C에서 시작하여 95°C를 종말점으로 0.5°C씩 상승시키며 80번을 반응하여 원하는 형광 값을 검출하였다.

통계처리

모든 결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 유의성 검사는

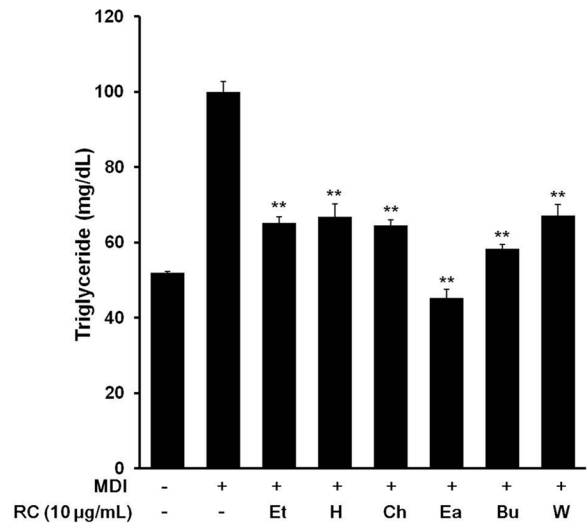


Fig. 3. Effect of RC on triglyceride contents in 3T3-L1 adipocyte. Differentiating 3T3-L1 cells were treated with every 2 days with extracts and their fractions from *Rumex crispus* L. (10 µg/mL) for 9 days in adipocyte-induction media. Triglyceride content was determined as described in Materials and Methods. Results were presented as means±SD in triplicate. **p*<0.05, ***p*<0.01 compared to MDI treated positive control cells. Con (control), Et (70% ethanol extract), H, (hexane fraction), Ch (chloroform fraction), Ea (ethyl acetate fraction), Bu (butanol fraction), W (water fraction)

SPSS™ version 17.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 one-way ANOVA를 실시하였고, 대조구인 분화 Control에 대한 시료 처리구의 통계적 유의성은 Tukey's multiple comparison test(23) 로 검증하였다. *p*<0.05 이상일 때만 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

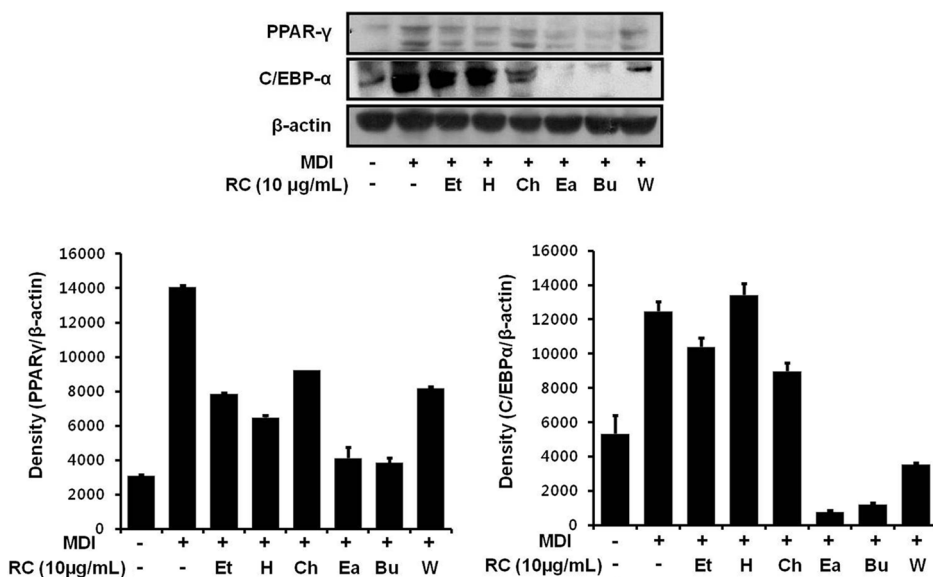


Fig. 4. Effect of RC on adipogenic transcription factors. Differentiating 3T3-L1 cells were treated with every 2 days with extracts and their fractions from *Rumex crispus* L. (10 µg/mL) for 9 days in adipocyte-induction media. At day 9 adipocytes protein was isolated and protein expressions of PPARγ and C/EBPα were determined by Western blot analysis. Results were presented as means±SD in triplicate. Con (control), Et (70% ethanol extract), H, (hexane fraction), Ch (chloroform fraction), Ea (ethyl acetate fraction), Bu (butanol fraction), W (water fraction)

결과 및 고찰

소리쟁이 추출물이 3T3-L1 지방전구세포의 생존율에 미치는 영향

소리쟁이 추출물 및 분획물의 3T3-L1 adipocytes의 세포 생존율을 측정하기 위해 50 µg/mL의 농도로 각 시료를 처리한 후, MTT assay를 실시하였다(Fig. 1). 샘플처리 결과 모든 분획층에서 50 µg/mL에서 80% 이상의 생존율을 나타내어 세포독성이 없는 농도에서 실험을 진행하였다.

소리쟁이 추출물이 3T3-L1 지방전구세포의 lipid droplet 생성에 미치는 영향

소리쟁이 추출물이 3T3-L1 전구지방세포의 지방구 형성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 전지방세포를 6 well에 3×10^5 cells/well로 분주하여 confluent 상태에서 48시간 경과 후 분화유도 배지(MDI)와 소리쟁이 분획층 각각을 10 µg/mL의 농도로 처리하면서 adipocyte로의 분화를 유도 하였다. 이 후 48시간 주기로 3번 10% FBS DMEM배지에 5 mg/mL의 insulin이 첨가된 배지로 교체하면서 시료 10 µg/mL을 처리하여 oil red O로 지방구를 염색하고 200 배율의 현미경으로 지방구를 관찰하였다(Fig. 2).

그 결과, 소리쟁이 추출물 및 분획물을 처리하지 않고 분화를 유도하였을 경우, 세포질 내 lipid droplet의 형성이 활발하게 유발되는 것으로 관찰되었으나, 소리쟁이 분획물 처리에 의해 지방구 형성이 억제되는 것을 관찰하였다. 특히 지방구 형성 억제효과를 ethyl acetate (Ea)와 hexane (H) 분획물에서 가장 우수한 결과를 보였다. Lipid droplet은 phospholipid monolayer에 의해 둘러싸인 중성지방으로 precursor fibroblast에서부터 지방세포로의 분화과정에서 나타나며, PPAR γ 와 같은 중요한 adipogenic transcription factor들에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다(24).

소리쟁이 추출물이 지방세포 내 triglyceride 생성에 미치는 영향

3T3-L1 지방전구세포에 소리쟁이 추출물 및 분획물을 처리한 결과 triglyceride 함량은 Fig. 3과 같이 분화된 지방세포와 비교했을 때, 모든 분획물에서 triglyceride 형성 억제 효과가 나타났다. 특히 ethyl acetate 분획물 10 µg/mL의 농도에서 triglyceride 생성 억제 효과가 큰 것으로 나타나 소리쟁이의 ethyl acetate 분획물이 3T3-L1 지방전구세포의 분화를 억제함으로써 비만 예방에 효과적일 것으로 생각된다.

Western blot에 의한 단백질 발현 조사

Adipogenesis는 지방전구세포(pre-adipocyte)가 증식 및 분화되는 과정을 거쳐 성숙한 지방세포(adipocyte)로 되는 과정을 의미하고, 이 과정에서 지질 축적, 호르몬에 대한 민감성 변화가 초래되며, lipogenesis 및 lipolysis에 관여하는 일련의 유전자발현이 변화된다. 이들 유전자들의 발현은 궁극적으로 sterol-regulatory-element-binding protein-1c(SREBP1c), peroxisome-proliferators-activated-receptor- γ (PPAR γ)와 CCAAT enhancer-binding-proteins(C/EBPs) family 등의 전사인자에 의해 조절된다. C/EBP family와 PPAR γ 는 호르몬에 의해 adipogenesis가 유도되는 과정에서 중요하게 작용하는 전사인자이다. Nuclear receptor superfamily에 속하는 PPAR γ 는 adipogenesis를 총괄적으로 조절하는 역할을 하며, adipocyte로 분화된 상태를 유지하는데 필수적인 인자이다. 또한 C/EBP β 는 PPAR γ 의 발현을 촉진시켜 pre-adipocyte의 초기 분화과정에서 중요한 역할을 하는 한편, C/EBP α 는 PPAR γ 와의 강한 상승작용을 통해 pre-adipocyte의 말기 분화 과정을 촉진한다(25-27).

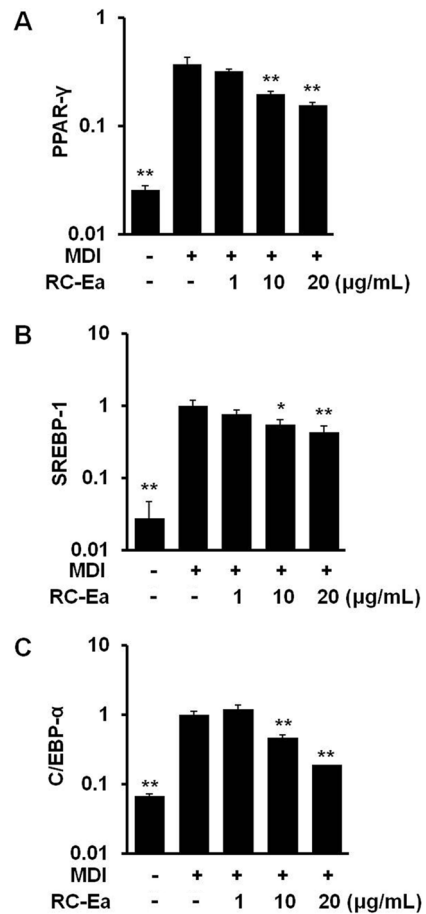


Fig. 5. Effect of RC-Ea on mRNA levels of transcription factors. Differentiating 3T3-L1 cells were treated with every 2 days with ethyl acetate (Ea) fraction of *Rumex crispus* L. for 9 days in adipocyte-induction media. At day 9 adipocytes RNA was isolated and mRNA expressions of PPAR γ , SREBP-1c and C/EBP α were determined by real-time PCR analysis. Ratio is calculated against GAPDH represented as arbitrary units of integrated density value. Results were presented as means \pm SD in triplicate. * p <0.05, ** p <0.01 compared to MDI treated positive control cells.

따라서 소리쟁이 추출물 및 분획물이 adipogenic transcription factor의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 단백질 수준에서 확인하였다. Pre-adipocyte에서 분화 유도와 동시에 소리쟁이 분획물을 10 µg/mL의 농도로 처리하고 FBS와 Insulin 배지로 갈아 줄 때마다 시료를 같이 처리하여 분화 종료 후 단백질 발현을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 시료를 처리하지 않은 분화 유도군에서는 PPAR γ 및 C/EBP α 의 발현이 현저하게 증가하는 것으로 나타났으며, ethyl acetate, butanol 분획물의 처리시에 PPAR γ 및 C/EBP α 의 단백질 발현이 현저하게 감소함을 확인하였다.

지방구 염색, TG 함량, 지방세포 전사인자 발현의 결과에서 ethyl acetate층에서 가장 좋은 효과를 나타내어 mRNA level에서 ethyl acetate층의 lipid synthesis, lipid transport, lipid storage에 관여하는 유전자들의 발현 억제능을 조사하였다.

Real-time PCR을 이용한 mRNA 발현조사

3T3-L1 전구지방세포의 분화억제 효과가 가장 우수한 소리쟁이 ethyl acetate 분획물을 이용하여 adipogenic transcription factor 및 관련 유전자들에 미치는 영향을 확인하기 위해 real-time PCR

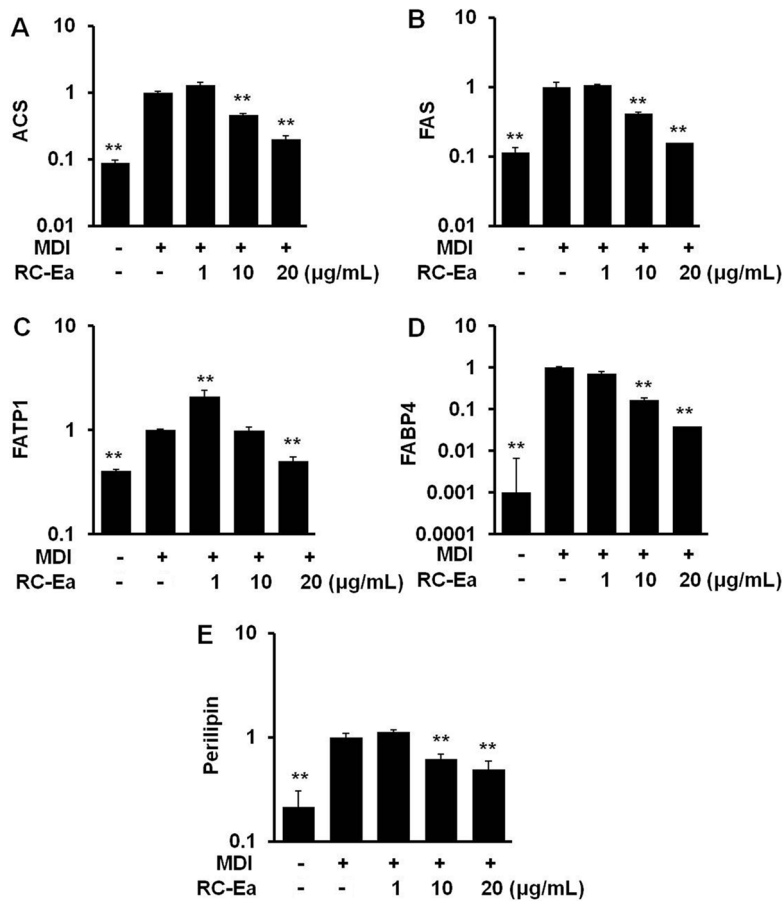


Fig. 6. Effect of RC-Ea on mRNA levels of proteins regulating synthesis, transport and storage of fatty acid. Differentiating 3T3-L1 cells were treated with every 2 days with ethyl acetate (Ea) fraction of *Rumex crispus* L. for 9 days in adipocyte-induction media. At day 9 adipocytes RNA was isolated and mRNA expressions of ACS, FAS, FATP1, FABP4 and Perilipin were determined by real-time PCR analysis. Ratio is calculated against GAPDH represented as arbitrary units of integrated density value. Results were presented as means±SD in triplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to MDI treated positive control cells.

을 이용하여 나타낸 결과는 Fig. 5, 6과 같다. 분화를 유도한 control에서는 PPAR γ , C/EBP α 및 SREBP1c의 mRNA 발현이 증가되었으나, RC-Ea 10, 20 µg/mL의 농도에서 그 발현이 유의적으로 감소됨을 확인하였다. 또한 이들 전사인자들의 하위 인자인 acyl-CoA synthetase-1(ACS1), fatty acid synthesis(FAS), fatty acid transport-1(FATP1), fatty acid binding protein-4(FABP4) 및 perilipin의 결과에서도 분화유도에 따라 각 유전자의 mRNA의 발현이 현저하게 증가하였으나, RC-Ea 처리에 의해 유의적으로 감소함을 관찰하였다.

이상의 결과에서 소리쟁이의 ethyl acetate 분획물은 3T3-L1 지방전구세포에서 adipogenic transcription factor인 PPAR γ , C/EBP α 그리고 SREBP1c 및 lipid synthesis, lipid transport, lipid storage에 관여하는 유전자들의 발현을 억제함으로써 lipid droplet 및 triglyceride 생성을 감소시켜 지방세포로의 분화를 억제시킬 수 있는 것으로 생각된다. 이러한 ethyl acetate 분획물의 지방세포 분화 억제 효과는 소리쟁이에 함유된 다양한 성분들 중 폴리페놀성 성분이 ethyl acetate층에 많이 함유되어 있기 때문이라고 생각된다. Kim 등(28)의 연구에 의하면 소리쟁이 ethyl acetate층의 폴리페놀 함량은 703.9 ± 75.6 mg/g으로 분획물 중 가장 높은 함량을 보였고, 다음으로 butanol층에서 303.4 ± 28.1 mg/g, ethanol 추출물 176.4 ± 5.8 mg/g, water층 33.5 ± 0.3 mg/g으로 조사되었다. 이러한 결과는 Ea층의 폴리페놀 함량은 water층, ethanol 추출물 보

다 각각 약 20배, 7배 정도 높다고 보고 되었다. 또한 α - α -diphenyl- β -picrylhydrazyl(DPPH) radical 소거활성에서도 RC₅₀값이 2.7 ± 0.2 µg/mL로 나타나 소리쟁이 ethyl acetate층에서 가장 높은 항산화 활성을 보였다고 알려졌다.

항비만 활성에 대한 tannin 등 수많은 phenolic compounds의 연구들이 보고(29,30)되어 있으므로 이러한 폴리페놀 화합물을 중심으로 소리쟁이의 ethyl acetate 분획물 내의 활성성분에 대한 연구가 추가적으로 이루어져야 할 것이다.

요 약

소리쟁이 추출물 및 분획물의 3T3-L1 전지방세포의 분화에 미치는 영향을 확인한 결과, 소리쟁이의 hexane, ethyl acetate 분획물에 의해 지방세포의 lipid droplet의 형성이 유의적으로 억제되었으며, 소리쟁이 에탄올 추출물과 모든 분획물 10 µg/mL의 농도에서 중성지질(triglyceride)의 함량이 유의적으로 감소되었다. 또한 지방세포의 분화에 관여하는 전사인자인 PPAR γ , C/EBP α 의 단백질 발현은 10 µg/mL의 ethyl acetate, butanol 분획물에 의해 현저하게 감소되었다. 따라서 소리쟁이 추출물과 분획물 중 가장 활성이 우수한 ethyl acetate 분획물을 이용하여 지방분화에 관여하는 전사 인자인 PPAR γ , C/EBP α , 그리고 SREBP1c 및 지질의 합성, 수송, 저장에 관여하는 ACS, FAS, FATP1, FABP4, Peril-

ipin의 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, ethyl acetate 분획물은 유의적으로 모든 유전자의 발현을 억제시켰다. 따라서 소리쟁이의 ethyl acetate 분획물은 지방세포의 분화에 관여하는 전사인자 및 유전자들의 발현을 감소시킴으로써 항비만 효과가 있는 천연물 소재로 이용 가능할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부 및 대구경북과학기술원의 지원을 받아 수행된 연구결과입니다 (12-BD-0401).

문 헌

- Smith PD, O'Halloran P, Hahn DL, Grasmick M, Radant L. Screening for obesity: Clinical tools in evolution, a WREN study. *Wisc. Med. J.* 109: 274-278 (2010)
- Pi-Sunyer X. The medical risks of obesity. *Postgrad. Med.* 121: 21-33 (2009)
- Despres JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444: 881-887 (2006)
- Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444: 860-867 (2006)
- Attie AD, Scherer PE. Adipocyte metabolism and obesity. *J. Lipid Res.* 50: 395-399 (2009)
- Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* 7: 885-896 (2006)
- Flier JS, Maratos-Flier E. Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell* 92: 437-440 (1998)
- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* 78: 783-809 (1998)
- Liu F, Kim J, Li Y, Liu X, Li J, Chen X. An extract of *Lagerstroemia speciosa* L. has insulin-like uptake-stimulatory and adipocyte differentiation-inhibitory activities in 3T3-L1 cells. *J. Nutr.* 131: 2242-2247 (2001)
- Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: Tracking obesity to its source. *Cell* 131: 242-256 (2007)
- Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Gene. Dev.* 14: 1293-1307 (2000)
- Ko BS, Lee MY, Kim HK, Chun JM, Choi SB, Jun DW, Jang JS, Park SM. Effect of *Cinnamomum camphora* leaf fractions on insulin action. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34: 1336-1343 (2005)
- Kim JB, Park JY. Molecular insights into fat cell differentiation and functional roles of adipocytokines. *J. Korean Soc. Endo.* 17: 1-9 (2002)
- Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: Transcriptional mediators of lipid homeostasis. *Cold Spring Harb. Sym.* 67: 491-498 (2002)
- Zhi J, Moore R, Kanitra L, Mulligan TE. Effects of orlistat, a lipase inhibitor, on the pharmacokinetics of three highly lipophilic drugs (amiodarone, fluoxetine, and simvastatin) in healthy volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* 43: 428-435 (2003)
- Ahmad FA, Mahmud S. Acute pancreatitis following orlistat therapy: Report of two cases. *J. Pancreas* 11: c61-c63 (2010)
- Karamadoukis L, Shivashankar GH, Ludeman L, Williams AJ. An unusual complication of treatment with orlistat. *Clin. Nephrol.* 71: 430-432 (2009)
- Jeong GT, Lee KM, Park DH. Study of antimicrobial and antioxidant activities of *Rumex crispus* extract. *Korean Chem. Eng. Res.* 44: 81-86 (2006)
- Chang SW, Kim IH, Han TJ. Anthraquinone productivities by the cultures of adventitious roots and hairy roots from culled dock (*Rumex crispus*). *Korean J. Plant Tissue Culture* 26: 7-14 (1999)
- Hwang SW, Ha TJ, Lee JR, Nam SH, Park KH, Yang MS. Isolation of anthraquinone derivatives from the root of *Rumex crispus* L. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 47: 274-278 (2004)
- Lee SS, Kim DH, Yim DS, Lee SK. Antiinflammatory, analgesic, and hepatoprotective effect of semen of *Rumex crispus*. *Korean J. Pharmacogn.* 38: 334-338 (2007)
- Green LM, Reade JL, Ware CF. Rapid colorimetric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J. Immunol. Methods.* 70: 257-268 (1984)
- Steel RGD, Torrie JH. Principles and Procedures of Statistics. McGraw Hill, New York, USA. pp.000-000 (1990)
- Cornelius P, MacDougald OA, Lane MD: Regulation of adipocyte development. *Annu. Rev. Nutr.* 14: 99-129 (1994)
- Hauser S, Adelmant G, Sarraf P, Wright HM, Mueller E, Spiegelman BM. Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation. *J. Biol. Chem.* 275: 18527-18533 (2000)
- Ohshima T, Koga H, Shimotohno K. Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is modulated by SUMO-1 modification. *J. Biol. Chem.* 279: 29551-29557 (2004)
- Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 273: 30057-30060 (1998)
- Kim HJ, Hwang EY, Im NK, Park SK, Lee IS. Antioxidant activities of *Rumex crispus* extracts and effects on quality characteristics of seasoned pork. *Korean J. Food Sci. Technol.* 42: 445-451 (2010)
- Rejman J, Kozubek A. Inhibitory effect of natural phenolic lipids upon NAD-dependent dehydrogenases and on triglyceride accumulation in 3T3-L1 cells in culture. *J. Agr. Food Chem.* 52: 246-250 (2004)
- Jeon T, Hwang SG, Hirai S, Matsui T, Yano H, Kawada T, Lim BO, Park DK. Red yeast rice extracts suppress adipogenesis by down-regulating adipogenic transcription factors and gene expression in 3T3-L1 cells. *Life Sci.* 75: 3195-3203 (2004)