

조릿대 에틸아세테이트 분획물의 지방세포에서 분화전사인자 조절을 통한 지방형성 저해 효능

박희숙 · 김건희[†]

덕성여자대학교 식물자원연구소

Inhibitory Effects of *Sasa borealis* on Mechanisms of Adipogenesis

Hee Sook Park and Gun-Hee Kim[†]

Plant Resources Research Institute, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

Abstract

Sasa borealis is a major source of bamboo leaves used for traditional medicine in Korea. Obesity is a serious health problem in industrialized countries that has been implicated in various diseases, including type 2 diabetes, hypertension, cancer, and coronary heart disease. Recent reports have proposed mechanisms to reduce obesity by decreasing preadipocyte differentiation, and proliferation in 3T3-L1 preadipocyte. The preadipocytes play a key role by differentiation into mature adipocytes and increasing fat mass. In this study, we investigated whether ethanol-soluble extracts and ethyl acetate-soluble fractions from *Sasa borealis* inhibits intracellular accumulation of lipid droplets in a dose-dependent manner in 3T3-L1 cells (an important model system for studying adipogenesis). The down-regulation of PPAR γ and C/EBP α (key adipogenic transcription factors) were confirmed by the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Ethyl acetate-soluble fractions from *Sasa borealis* attenuated the expression of PPAR γ and C/EBP α . These results suggest that *Sasa borealis* inhibits adipogenic differentiation by regulating adipogenic transcription factors in 3T3-L1 cells. Therefore, *Sasa borealis* extracts may be a good candidate for the management of obesity.

Key words: *Sasa borealis*, ethyl acetate-fraction, adipocyte differentiaion, 3T3-L1, transcription factors

서 론

비만은 에너지 섭취량과 소비량 사이의 불균형으로 인해 체내 축적되는 지방이 과잉인 상태를 말하며 제2형 당뇨병, 심혈관계 질환, 각종 암 및 고지혈증과 같은 성인병의 발병 인자로 밝혀지면서 전 세계적으로 심각한 질환으로 대두되고 있다(1,2). 일반적으로 체내로 섭취된 영양소는 중성지방(triglyceride)의 형태로 지방 조직에 축적되는데, 비만의 경우는 이들 중성지방의 과잉된 축적으로 인한 지방세포의 비대(hypertrophy)와 과형성(hyperplasia)으로 초래된다(3). 비만은 지방전구세포의 분화과정에 의해 지방세포 내의 중성지방의 과잉 축적으로 발생되며, 이를 조절하는 기작을 밝혀내는 것이 비만 억제의 연구법으로 알려져 있다(4). 더불어 비만 환경에서 세포 내에 존재하는 중성지방(triglyceride)의 분해와 이로 인한 glycerol과 지방산의 분비 등도 세포 내 지방의 축적을 조절하는 중요한 기전이라고 할 수 있다(5). 따라서 항비만 기능성 소재개발 연구를 위해서는 지방조직 내의 중성지방의 과도한 축적 저해를 목표로 에너지 흡수의 최소화와 소비의 최대화를 꾀하거나 지방세포 분

화과정을 조절하는 소재를 탐색해야 한다.

지방세포는 에너지 항상성 유지 및 지질대사에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 특히 지방전구세포주인 3T3-L1은 다양한 호르몬과 전사인자들에 의해 중성지방이 축적된 지방세포로 분화된다. 3T3-L1 세포는 전지방세포에서 다양한 호르몬 및 transcription factor(peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), CCAAT/enhancer-binding proteins(C/EBP)) 등에 의해 지방세포로 분화되면서 세포 내 중성지방 축적에 관여하는 다양한 adipogenic gene과 효소 활성이 증가된다(6). PPAR γ 는 nuclear hormone receptor superfamily 중 하나로 retinoid X receptor(RXR)와 결합하여 표적유전자의 발현을 조절하는 전사인자로 알려져 있다. C/EBP α 는 basic leucine zipper 군에 속하는 전사인자로 지방세포분화 초기에 관여하는 인자로 알려져 있다(7,8).

벼과에 속하는 다년생 초본인 조릿대는 죽엽이라고도 불리고 한국, 중국, 일본 등의 아시아지역에서 자생하고 있으며, 잎과 줄기와 뿌리 모두 열 내림, 소갈, 소담, 강정, 항염 등 여러 효험이 있다고 알려져 한방이나 민간요법에서 사용되어 왔다(9). 조릿대 잎 추출물에는 syringaresinol과 fla-

[†]Corresponding author. E-mail: ghkim@duksung.ac.kr
Phone: 82-2-901-8496, Fax: 82-2-901-8661

vone 물질인 triclin 등의 물질이 함유되어 있다고 밝혀졌다(10,11). 또한 민간요법에서는 당뇨병, 고지혈증과 고혈압 등 대사성 질환에 사용되어 왔으며(12,13), 국내에서는 조릿대 추출물로 약리작용에 관한 연구(14), 대사증후군 개선 효과(15), 혈당 강하 효과(12), 물질 분리 연구(9) 등이 연구되어 왔지만 더 많은 연구가 필요한 실정이다. 특히, 비만 및 당뇨병의 성인병예방과 관련된 연구들이 다소 진행된 바 있다. 조릿대 잎 추출물의 식이성 비만이 유발된 C57BL/6J mice에서 비만과 대사증후군 개선 효과(15,16), 조릿대 잎 추출물의 탄수화물 소화효소 활성 저해를 통한 식후 혈당 강하 효과(12) 등이 밝혀진 바 있다. 그러나 이러한 만성질환의 중요한 조직으로 알려져 있는 지방 세포에서의 중성지방 축적과정 중 조릿대 추출물의 기능성에 대해서는 기존 연구가 매우 미흡한 실정이다. 이에 본 연구에서는 조릿대 잎의 70% 에탄올 추출물과 극성에 따른 분획을 통해 얻어진 분획물들의 항분화 효능을 탐색하고, 항분화 효능이 탁월한 에틸아세테이트 분획물의 3T3-L1 세포내 중성지방의 축적 억제효과와 이에 관여하는 PPAR γ 와 C/EBP α 발현억제 효과를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

추출물 및 분획물 제조

실험에 사용한 조릿대는 2007년 7월 전라남도 담양지역에서 수집했으며, 조릿대 추출물과 분획물의 제조로는 조릿대 50 g을 70% 에탄올 수용액 1,000 mL로 실온에서 24시간 동안 추출하고 여액을 감압 농축하여 에탄올 추출물을 얻었다. 수득한 조릿대 추출물에 정제수를 넣고 교반하여 현탁한 후 용매 분획법에 의하여 hexan, chloroform, 에틸아세테이트, 수포화부탄올 및 물로 분획하여 각각의 용매별 추출물을 제조하였다(Fig. 1). 얻어진 추출물 및 분획물은 DMSO에 녹여 stock 형태로 -20°C에서 보관하였다.

실험재료

본 실험에 사용된 mouse embryonic fibroblast 3T3-L1

(3T3-L1) 지방전구세포는 미국 세포주은행(American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양받아 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), phosphate buffered saline(PBS), fetal bovine serum(FBS), trypsin-EDTA 및 penicillin-streptomycin은 WelGene(Deagu, Korea)에서 구입하였다. Insulin, isobutyl methyl xanthine(IBMx), dexamethasone(Dex), Oil Red O 염색 시약 및 dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 중성지방 측정 시약 Cleantech TG-S는 아산제약(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 또한 RNA 분리를 위한 RNeasy mini kit, Taqman 중합효소는 Qiagen(Valencia, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Reverse transcription PCR을 위해 사용한 reagent는 Bioneer(Daejeon, Japan)에서 구입하여 실험하였다.

3T3-L1 지방전구세포 배양 및 분화 유도

본 실험에 사용된 지방전구세포는 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin이 포함된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 3T3-L1 지방전구세포의 분화유도를 위해 세포가 confluent 상태가 되도록 동일한 조건에서 배양하고 48시간 이후에 분화유도 배지(10 μ g/mL insulin, 0.25 μ M dexamethasone, 0.5 mM IBMx가 포함된 DMEM)로 교환하여 분화유도를 시작하였다(day 0). 분화유도 후 36시간(day 2)과 5일 후에(day 5) 지방세포로의 분화를 촉진하기 위해 10 μ g/mL insulin이 포함된 DMEM으로 교환하고 분화유도 8일까지 분화시켰다. 분화유도과정 중에 조릿대의 분화억제 효능을 확인하기 위해 분화유도 배지에 조릿대 추출물을 각각 10, 50, 100 μ g/mL 농도로 배지에 녹여 함께 처리하였으며, 조릿대 추출물을 처리하지 않고 분화 유도한 것을 대조군(MDI)으로 하였다.

Oil Red O 염색

3T3-L1의 세포분화 후 배지를 제거한 뒤 PBS로 세 차례 세척한 후 10% formalin 용액으로 상온에서 10분간 고정시킨다. 고정된 세포내 생성된 lipid droplet과 특이적으로 반응

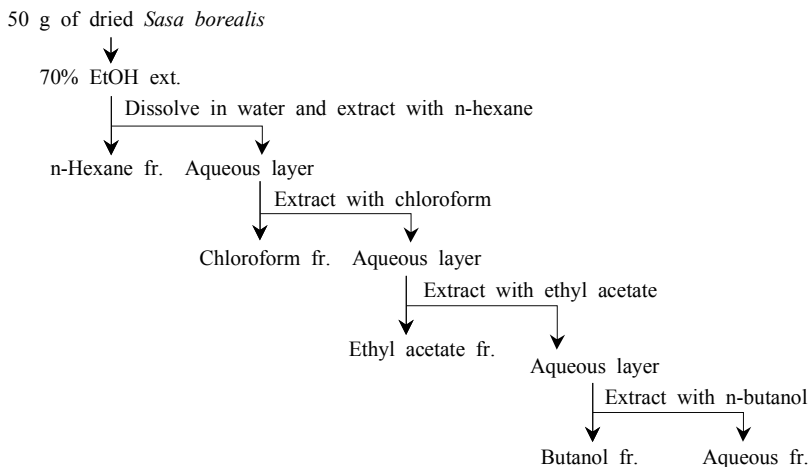


Fig. 1. Flow diagram for fractionation of 70% ethanol extract from *Sasa borealis* leaf.

하는 0.2% Oil Red O 용액(60:40=isopropanol: water)을 이용해 1시간 동안 방치하여 염색하고, PBS로 세척 후 현미경으로 지방세포의 염색정도를 관찰한 후 isopropanol을 이용하여 용해한 뒤 510 nm에서 흡광도를 측정한다. 다음 대조군의 흡광도 값에 대한 백분율로 나타내었다.

세포내 중성지방의 함량 측정

3T3-L1의 세포분화 후 배지를 제거한 뒤 PBS로 세척하고 1% NP-40으로 세포를 lysis 시킨 후 13,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등액만 취해 Cleantech TG-S 시약을 첨가하여 10분간 반응시킨 후 흡광도 540 nm에서 측정하였다. 중성지방의 양은 중성지방 standard를 이용하여 동일한 반응을 수행하여 standard curve를 작성한 후 이를 이용하여 계산하였다. 이때 단백질 양을 Bradford 방법으로 정량하여 세포수를 보정하였다.

Free glycerol의 측정

분화 8일째 완벽히 분화된 3T3-L1 세포에 시료를 처리한 후 72시간 배양한 배지를 eppendorf tube에 넣고 70°C에서 10분간 가열하여 세포로부터 유리된 효소들을 불활성화 시켰다. 50 μ L의 배지를 glycerol reagent에 첨가하여 1분간 반응시킨 후 흡광도를 540 nm에서 측정하였다. 이때 단백질량을 Bradford 방법으로 정량하여 세포수를 보정하였다.

Reverse-transcriptase polymerase chain reaction

세포 내 총 RNA를 추출하고 정량하기 위하여 RNeasy mini kit를 이용하였다. 1 μ g의 총 RNA를 oligo(dT) primer와 superscript II 역전사효소와 함께 반응시켜 1차 cDNA를 제작하였다. PCR 반응은 1 μ g의 cDNA를 AccuPower[®] CycleScript RT PreMix에 첨가하여 95°C에서 3분간 denaturation 시킨 후, 94°C에서 30초간, 55°C에서 30초간, 72°C에서 1분간 30 cycle 실시하였고, 최종적으로 72°C에서 5분간 extension 반응하였다. 반응물은 1.2% agarose gel에 전기영동한 후 EtBr로 염색하여 UV에서 DNA를 확인하였고 DNA의 정량적 분석은 BioRad Inc.(Hercules, CA, USA)에서 제공된 Quantity one software를 이용하여 측정하였다. PCR에 사용된 primer set은 다음과 같다. PPAR γ forward 5'-ACC ACT CGC ATT CCT TTG AC-3', reverse 5'-TCA GCG GGA AGG ACT TTA TG-3'(GeneBANK, NM_001127330), C/EBP α forward 5'-ATG GAG TCG GCC GAC TTC TAC-3', reverse 5'-CAG GAA CTC GTC GTT GAA GGC-3'(GeneBANK, NM_007678), GAPDH forward 5'-AAC TTT GGC ATT GTG GAA GGG C-3', reverse 5'-GAC ACA TTG GGG GTA GGA ACA C-3'(GeneBANK, XM_990238).

통계분석

본 실험 결과는 평균(mean)±표준편차(SD)로 나타내었고, 통계적 유의성은 IBM SPSS statistics(ver. 19, Statistical Package for Social Science, Chicago, IL, USA)를 이용

해서 one way-ANOVA로 분석하였고, 평균값의 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

조릿대 추출물의 3T3-L1 전 지방세포 중성지방 생성 억제 효능

조릿대 에탄올 추출물(SBE)에 의한 지방세포 내 중성지방 생성을 저해하는지 확인하기 위해 시료를 3T3-L1 지방전구세포에 농도별(0, 10, 50, 100 μ g/mL)로 처리하면서 분화를 유도하였다. 3T3-L1 adipocyte 내 중성지방 생성은 Oil Red O 염색에 의해 지방전구세포가 호르몬 유도에 의해 분화되면서 생성되는 세포 내 중성지방을 염색한 뒤 관찰하고 흡광도를 측정함으로써 조릿대 추출물의 효과를 확인하였다. Fig. 2A와 같이 염색된 세포내 중성지방을 현미경으로 관찰했을 때 대조군인 MDI 그룹에 비해 분화된 지방의 수가 감소하였다. 또한 세포내의 중성지방 생성은 SBE를 처리했을 때 농도 의존적으로 감소하였다. 특히 100 μ g/mL 처리했을 때 대조군인 MDI 그룹에 비해 33.4%까지 유의적으로 세포 내 중성지방이 감소하였다(Fig. 2B). 3T3-L1 세포에서 측정된 중성지방 함량을 측정하는 것은 지방세포를 이용한 가장 일반적인 항비만 탐색 방법으로 많은 연구들을 통해 보고된 항비만 소재들은 대조군과 비교 시에 분화과정에서 세포내 중성지방 축적을 감소시키는 것이 결과로 제시되고 있다(17,18). 따라서 본 연구에서 SBE는 지방세포의 분화과정 중에 작용하여 지방세포 내 중성지방 축적을 억제하는 것으로 사료된다. 또한 지방세포 내에 축적되어 있는 중성지방 함량을 측정할 경우에도 대조군(76.79 μ g/mL)에 비해 시료 처리군에서 농도 의존적으로 세포 내 중성지방 함량이 유의적으로 감소하였다(Fig. 2C).

조릿대 에틸아세테이트 분획물의 3T3-L1 전 지방세포 중성지방 생성 억제 효능

조릿대 에탄올 추출물이 지방세포분화를 억제하는 결과를 바탕으로 조릿대 추출물을 극성에 따른 용매별 분획물을 제조하여 지방세포 분화 억제 효능을 탐색하였다(Table 1). 용매별 분획물의 지방세포 억제 효능을 나타내는 IC50은 에탄올 추출물(146.23 μ g/mL)보다 낮게 나타났다. 이는 조릿대 에탄올 추출물에 비해 분획물들이 지방세포 분화 억제 효능이 더 탁월하다는 것을 보여준다. 이들 용매별 추출물 중 가장 지방세포 분화억제 활성을 나타낸 에틸아세테이트 분획물을 이용하여 이후의 실험을 진행하였다. 조릿대 에틸아세테이트 분획물(SBEA)을 지방세포 분화유도 시 함께 처리했을 때 대조군에 비해서 농도 의존적으로 지방세포 내 중성지방의 축적을 유의적으로 감소하였다(Fig. 3A). SBEA를 50, 100 μ g/mL 농도를 처리한 그룹에서 대조군(MDI)에 비해 각각 19.4, 54.4% 감소하였다. Oil red O 염색 분석과 마찬가지로 지방세포 내 중성지방 함량을 측정할 경우에도

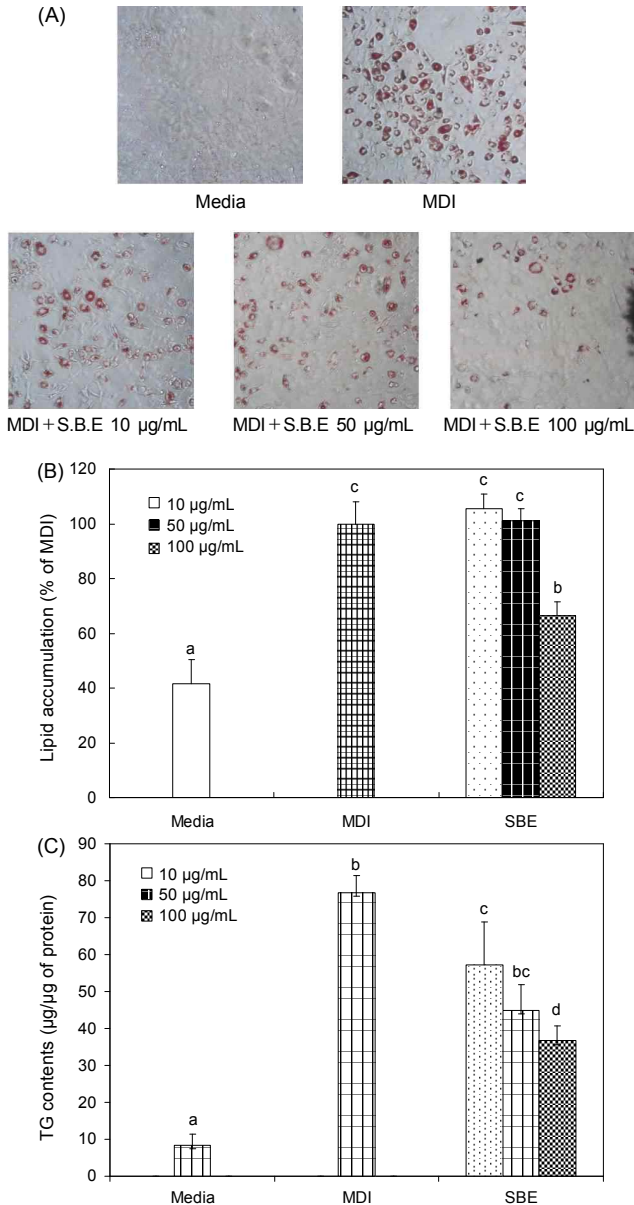


Fig. 2. Inhibitory effects of SBE on 3T3-L1 preadipocytes differentiation. 3T3-L1 cells were differentiated into adipocytes with vehicle (media) or SBE as indicated concentration for 8 days. (A) Photography of Oil red O staining, (B) lipid accumulation, and (C) intracellular TG contents were determined using Oil Red O staining and TG kit (Cleantech TG-S) assay, respectively. Values were calculated as µg TG content per µg total protein and are presented as relative TG contents of cells treated with the MDI mixture alone. Data are expressed as mean±SD of triplicate experiments. The same letters indicate no significant differences according to the Turkey-HSD multiple comparison test.

MDI 그룹(76.79 µg/mL)에 비해 SBEA 처리군 10, 50, 100 µg/mL 농도에서 지방세포 내 중성지방 양이 각각 51.73, 47.73, 39.68 µg/mL로 유의적으로 감소하였다(Fig. 3B).

조릿대 에틸아세테이트 분획물의 지방세포 내 중성지방 분해 효능 탐색

지방세포 내 축적된 중성지방이 분해되면 glycerol과 지

Table 1. The effects of soluble-fractions from SBE on adipocyte differentiation

Fractions	IC ₅₀ ¹⁾
Ethanol	146.2
Hexane	100.1
Chloroform	95.1
Ethyl acetate	60.5
Butanol	97.5

¹⁾IC₅₀ means the concentration required to inhibit 50% of adipocyte differentiation.

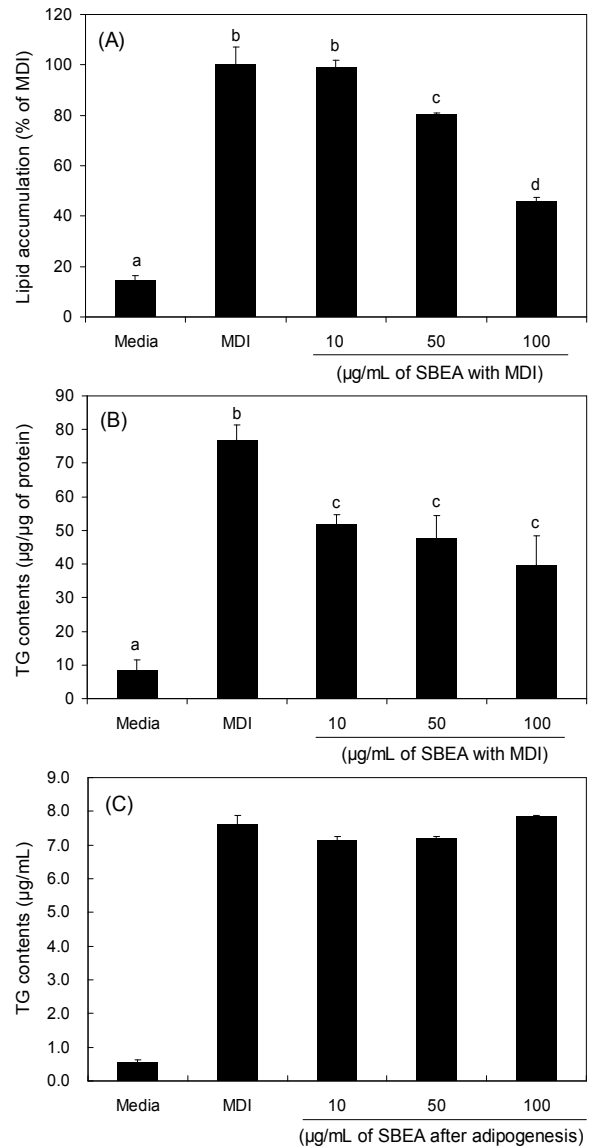


Fig. 3. Effects of SBEA on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. 3T3-L1 cells were differentiated into adipocytes with vehicle (media) or SBEA as indicated concentration for 8 days. (A) lipid accumulation, and (B) intracellular TG contents were determined using Oil Red O staining and TG kit (Cleantech TG-S) assay, respectively. And (C) free glycerol release. Values were calculated as µg TG content per µg total protein and are presented as relative TG contents of cells treated with the MDI mixture alone. Data are expressed as mean±SD of triplicate experiments. The same letters indicate no significant differences according to the Turkey-HSD multiple comparison test.

방산으로 나누어지는데 인체의 경우 glycerol은 세포 외 혈액으로 유리되어 간으로 이송되게 된다(19). 마찬가지로 3T3-L1 지방세포계에서는 free glycerol의 함량이 지방구 내 중성지방의 분해 정도를 간접적으로 나타내는 척도가 된다. 본 연구에서는 SBEA의 지방세포 내 중성지방의 분해 능력을 탐색하기 위해 분화된 지방세포에 농도별로 72시간 처리한 후 배지내로 분비된 free glycerol 양을 측정하였다. 분화 유도된 그룹 MDI와 비교했을 때 SBEA를 처리한 그룹에서 배지 내 free glycerol의 분비량은 통계적으로 변화가 없었다(Fig. 3C). 이러한 결과는 SBEA가 Fig. 3A와 B에서 나타난 것과 같이 지방세포의 중성지방 합성에는 관여하지만 이미 축적된 세포 내 중성지방의 분해에는 관여하지 않기 때문이라고 사료된다.

조릿대 에틸아세테이트 분획물이 지방세포 분화 조절인자들의 발현에 미치는 영향

3T3-L1 지방전구세포는 다양한 호르몬과 전사인자들의 상호작용을 통해 형태학적, 생화학적인 지방세포로 분화된다(3). PPAR γ 와 C/EBP α 는 지방세포에 나타나는 특이적인 전사인자로서 분화 초기에 발현이 유도되어 분화 후기가 되면 다양한 adipogenic 유전자들의 발현을 유도하며, 분화된 지방세포에서 발현양이 현저하게 증가되는 양상을 나타낸다(20). 본 연구에서는 SBEA 처리에 따른 세포내 중성지방 합성 저해 활성을 확인하기 위해 PPAR γ 와 C/EBP α 의 mRNA 발현을 측정하였다. 측정하기 위해 SBEA를 3T3-L1 preadipocyte에 농도별(0, 50, 100 μ g/mL)로 처리하면서 분화를 유도하였다. PPAR γ 와 C/EBP α 둘 다 MDI 그룹에서는 media 그룹에 비해 mRNA 발현이 각각 3.2, 4.5배 유의적으로 증가하였으며 SBEA 처리에 따라 농도 의존적으로 mRNA 발현이 감소되었다(Fig. 4). 따라서 SBEA의 지방세포 내 중성지방 축적 억제 활성은 지방세포 분화의 주요 전사인자의 발현 감소가 adipogenic protein의 발현을 억제시킴으로써 최종적으로 세포 내 중성지방의 생성을 줄일 수 있었던 것으로 생각한다. PPAR γ 는 지방세포의 분화에 관여하는 대표적 단백질로서 agonist로 알려져 있는 rosiglitazone은 당뇨병 환자에 있어서 임상적으로 탁월한 효과를 나타내고 있고, antagonist들은 비만억제 효과를 나타내고 있어 항비만을 타겟으로 활발히 개발 중에 있다(21). 이 연구에서 보여주는 SBEA의 PPAR γ 의 발현억제는 PPAR γ 의 antagonist로서 작용할 수 있는 가능성을 보여준 것이라고 할 수 있다. 또한 C/EBP α 는 PPAR γ 와 상호작용을 통해 서로의 발현을 증가시켜 지방세포의 분화를 유도하고 최종마커의 발현을 증가시킨다. Freytag 등(22)은 다양한 섬유아세포에 C/EBP α 를 과다 발현시켜 adipogenesis를 유도함으로써 C/EBP α 의 분화과정에 있어서의 중요성을 증명하였다. 지방세포 분화를 통한 세포 내 중성지방 합성과정에 있어서 여러 호르몬들과 세포분화 유도물질 등에 의해 분화가 시작되면 C/EBP β 와 C/EBP δ 를 포함한 초기 지방세포형성 조절

자(adipogenic regulator)들이 발현되면서 후기 분화를 유도한다. C/EBP β 와 C/EBP δ 에 의해 발현되는 C/EBP α 와 PPAR γ 는 후기 분화에서 adiponectin, lipoprotein lipase 및 fatty acid binding protein4와 같은 최종마커(terminal marker)들의 발현을 증가시킨다(8). 따라서 Fig. 4에서 나타난 것과 같이 조릿대 에틸아세테이트 분획물은 지방세포 분화의 중요 인자인 PPAR γ 와 C/EBP α 발현을 억제시킴으로써 최종마커의 발현을 감소시키고 세포 내 중성지방의 축적을 감소시킬 것으로 사료된다. 또한, 기존의 연구 보고에 의하면 PPAR γ 와 C/EBP α 발현은 cAMP-response element binding protein 및 extracellular signal-regulated protein의 activation이 C/EBP α 발현에 주요 역할을 하는 것으로 알려졌다(23). 따라서 본 연구에서 SBEA의 특이적인 PPAR γ 와 C/EBP α 의 조절기전을 밝히기 위해서는 upstream 단계의 신호전달 경로의 활성화에 관한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

지금까지 조릿대의 연구는 추출물 수준에서 항산화, 항균, 항염 및 미백 등에 초점이 맞추어져 있다. 대다수의 연구가 조추출물을 이용했으나, 이전에 우리 연구팀에서 수행한 연구에서는 조릿대의 에틸아세테이트 분획물에서의 항산화와 항균 활성을 토대로 천연물 식품소재 및 천연보존료의 가능성을 제시한바 있다(24). Park과 Lim(25)은 최근 연구를 통해 조릿대 잎의 70% 에탄올 조추출물의 분획 중 aqueous를 제외한 ethyl acetate, chloroform, n-hexane 및 n-butanol 분획에 폴리페놀이나 플라보노이드 함량이 지금까지 보고된 천연식품에 비해 상당히 높은 편이라고 보고하였다. 또한 Jeong 등(10)의 연구에서는 조릿대의 대표적 기능성 성분으로 알려져 있는 syringaresinol과 tricetin을 에틸아세테이트 분획층에서 분리하였다. 본 연구에서도 Table 1에서 나타내듯이 지방세포의 항분화 활성 또한 에틸아세테이트 분획물에서 가장 좋은 활성을 나타냈다. 이 같은 결과를 바탕으로 조릿대의 조추출물에 비해 에틸아세테이트 분획물에서 다양한 기능성물질이 포함되어있을 것이라 사료되고, 항분화 활성에 직접적인 영향을 주는 물질에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다. Kim 등(26)의 연구를 통해 식이 유도된 비만 마우스에서 조릿대 추출물이 체중 감소효과를 나타냈으나, 마우스 지방세포에서 분비되는 adipocytokine에는 영향이 없었다. 따라서 조릿대의 항비만 효능의 가능성은 증명이 되었으나 그 기전연구는 미흡한 실정이다. 본 연구에서는 3T3-L1 전지방세포에서 호르몬 유도에 의한 중성지방 축적 전사인자(PPAR γ 와 C/EBP α)가 발현되었으며 조릿대가 효과적인 억제활성이 있음을 증명하였다. 이는 지방세포의 항분화 기전연구로서 조릿대의 항분화 기전연구는 이 연구가 처음이다. Hwang과 Han(12)의 연구에서는 조릿대 추출물 및 분획물들의 탄수화물 소화효소 및 혈당의 감소효능을 보고하였다. 이 연구에서도 에틸아세테이트 층에서 가장 높은 활성을 나타냈다. 또한 streptozotocin으로

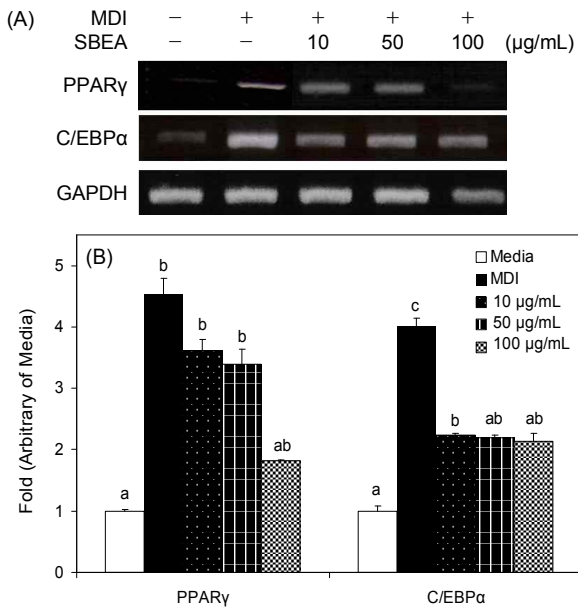


Fig. 4. Effect of SBEA extracts on the mRNA expression of adipogenic transcription factors PPAR γ and C/EBP α . 3T3-L1 cells were differentiated into adipocytes with vehicle (media) or SBEA as indicated concentration for 8 days. (A) The gene expression of PPAR γ , C/EBP α were determined by RT-PCR. (B) Relative mRNA expression was normalized with GAPDH expression. The values were calculated as fold of gene expression of the media group. Data are expressed as mean \pm SD of triplicate experiments. The same letters indicate no significant differences according to the Turkey-HSD multiple comparison test.

유도한 당뇨 마우스에서 식후 혈당증가 저해 효과가 있었다 (12). 대표적인 제2형 당뇨병 치료제로 알려져 있는 Thiazolidinedione 계열의 약물은 PPAR- γ 의 agonist로서 작용하는 것으로 알려져 있다. 그러나 본 연구에서는 지방세포에서 SBEA에 의해 PPAR- γ 발현을 억제하였다(Fig. 4). 이는 STZ에 의해 유도된 당뇨병 모델은 인슐린 결핍으로 인한 제1형 당뇨병 모델이며 그 작용 기전이 2형 당뇨병과는 다르다고 할 수 있다. 따라서 조릿대의 혈당강하 효능은 구체적인 기전연구를 통해 확인이 필요하다고 생각되어진다. 본 연구 결과로 조릿대가 지방세포에서 분화전사인자의 조절을 통해 중성지방 축적억제 효능이 있으며, 비만을 예방할 수 있는 기능성 식품 소재로서 가능성이 있음을 보여주었다.

요 약

본 연구에서는 3T3-L1 지방전구세포를 이용하여 조릿대 조추출물(SBE)과 에틸아세이트 분획물(SBEA)의 지방세포 내 중성지방 축적 저해 활성을 확인하고자 하였다. 먼저 SBE의 지방세포 분화 저해 활성을 확인하기 위해 추출물을 3T3-L1 지방전구세포에 분화를 유도하면서 농도별(10, 50, 100 μ g/mL)로 처리하였고, 그 결과 SBE가 지방세포의 분화를 억제시켜 지방세포 내 중성지방 축적을 저해시켰다. 또한 SBE를 용매 극성에 따른 분획한 분획물들의 항분화

효능을 확인하였다. 그중 항분화 효능이 가장 뛰어난 에틸아세이트 분획물로 지방세포 분화에 따른 세포 내 중성지방 축적이 억제 되었다. 그러나, 지방세포 분해를 통한 glycerol release의 증가는 나타나지 않았다. 이 같은 결과를 바탕으로 항분화 효능의 기전을 연구하기 위해 PPAR γ , C/EBP α 등 전사활성과 지방세포 분화에 관여하는 유전자들의 활성을 확인해 보았다. 실험 결과 SBEA는 PPAR γ 와 C/EBP α 의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 감소시켰다. 따라서 SBEA 항비만 효과는 지방 생성의 주요 전사인자인 PPAR γ 와 C/EBP α 의 유전자 발현조절을 통해 지방 분화 억제 및 지방 축적을 효과적으로 감소시키는 것으로 보이며, 효과가 있는 농도가 100 μ g/mL로 천연물질로써 비교적 낮은 농도에서 우수한 지방 분화억제 활성을 나타내어 경제적이며 효과적인 항비만 기능성식품으로서 개발 가능성이 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 2011년도 중견연구지원사업과(2011-0031386) 대학중점 연구소 지원사업(2012-041653)으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Visscher TL, Seidell JC. 2001. The public health impact of obesity. *Annu Rev Public Health* 22: 355-375.
2. Spiegelman BM, Flier JS. 2001. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104: 531-543.
3. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. 2000. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Gene Dev* 14: 1293-1307.
4. Kopelman PG. 2000. Obesity as a medical problem. *Nature* 404: 635-643.
5. Otto TC, Lane MD. 2005. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 40: 229-242.
6. Choi BH, Ahn IS, Kim YH, Park JW, Lee SY, Hyun CK, Do MS. 2006. Berberine reduces the expression of adipogenic enzymes and inflammatory molecules of 3T3-L1 adipocyte. *Exp Mol Med* 38: 599-605.
7. Morrison RF, Farmer SR. 2000. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr* 130: 3116S-3121S.
8. Rosen ED, MacDougald OA. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 885-896.
9. Yoon KD, Kim CY, Huh H. 2000. The flavone glycosides of *Sasa borealis*. *Kor J Pharmacogn* 31: 224-227.
10. Jeong YH, Chung SY, Han AR, Sung MK, Jang DS, Lee J, Kwon YJ, Lee HJ, Seo EK. 2007. P-glycoprotein inhibitory activity of two phenolic compounds, (-)-syringaresinol and tricetin from *Sasa borealis*. *Chem Biodivers* 4: 12-16.
11. Park HS, Lim JH, Kim HJ, Choi HJ, Lee IS. 2007. Antioxidant flavone glycosides from the leaves of *Sasa borealis*. *Arch Pharm Res* 30: 161-166.
12. Hwang JY, Han JS. 2007. Inhibitory effects of *Sasa borealis* leaves extracts on carbohydrate digestive enzymes and

- postprandial hyperglycemia. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 989-994.
13. Ko BS, Jun DW, Jang JS, Kim JH, Park S. 2006. Effect of *Sasa borealis* and white lotus roots and leaves on insulin action and secretion *in vitro*. *Korean J Food Sci Technol* 38: 114-120.
 14. Im MS. 1984. Studies on pharmacological actions on *Sasa borealis* Makino. *MS Thesis*. Sookmyung Women's University, Seoul, Korea. p 1-2.
 15. Jeong EY. 2006. Effect of the *Sasa borealis* leaves extract on metabolic syndrome in C57BL/6J mice fed a high fat diet. *MS Thesis*. Chonnam National University, Gwangju, Korea. p 14-40.
 16. Kim EY. 2007. Effect of the *Sasa borealis* leaves extract on cytokine levels in C57/BL6J mice. *MS Thesis*. Chonnam National University, Gwangju, Korea. p 20-48.
 17. Lee J, Yoon HG, Lee YH, Park J, You Y, Kim K, Jang JY, Yang JW, Jun W. 2010. The potential effects of ethyl acetate fraction from *Curcuma longa* L. on lipolysis in differentiated 3T3-L1 adipocytes. *J Med Food* 13: 364-370.
 18. Jeong HJ, Yoon SJ, Pyun YR. 2008. Polysaccharides from edible mushroom *Hinnmogi* (*Tremella fuciformis*) inhibit differentiation of 3T3-L1 adipocyte reducing mRNA expression of PPAR γ , C/EPB α , and leptin. *Food Sci Biotechnol* 17: 267-273.
 19. Liu F, Kim J, Li Y, Liu X, Li J, Chen X. 2001. An extract of *Lagerstroemia speciosa* L. has insulin-like glucose uptake-stimulatory and adipocyte differentiation-inhibitory activities in 3T3-L1 cells. *J Nutr* 131: 2242-2247.
 20. Kubota H, Morii R, Kojima-Yuasa A, Huang X, Yano Y, Matsui-Yuasa I. 2009. Effect of *Zizyphus jujuba* extract on the inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Am J Chin Med* 37: 597-608.
 21. Nakano R, Kurosaki E, Yoshida S, Yokono M, Shimaya A, Maruyama T, Shibasaki M. 2006. Antagonism of peroxisome proliferator-activated receptor γ prevents high-fat diet-induced obesity *in vivo*. *Biochem Pharmacol* 72: 42-52.
 22. Freytag SO, Paielli DL, Gilbert JD. 1994. Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein α promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes Dev* 8: 1654-1663.
 23. Saito T, Abe D, Sekiya K. 2007. Nobiletin enhances differentiation and lipolysis of 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 357: 371-376.
 24. Hong EY, Jang MR, Kim MK, Kim GH. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of *Sasa borealis* Makino extracts. *J Nat Sci* 15: 233-242.
 25. Park YO, Lim HS. 2009. Antioxidant activities of bamboo (*Sasa borealis*) leaf extract according to extraction solvent. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1640-1648.
 26. Choi YM, Lee SM, Kim YH, Jeon GU, Sung JH, Jeong HS, Lee JS. 2010. Defatted grape seed extracts suppress adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 927-931.

(2013년 2월 4일 접수; 2013년 3월 15일 채택)