

Inhibitory Effects of Lyophilized Dropwort Vinegar Powder on Adipocyte Differentiation and Inflammation

Yun-Hee Park¹, Jun-Hyeok Choi¹, Key Whang¹, Syng-Ook Lee¹, Seun-Ah Yang^{2*} and Mi Hee Yu^{1*}

¹Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

²The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Received March 10, 2014 / Revised April 14, 2014 / Accepted April 14, 2014

Obesity, which is characterized by a state of mild chronic inflammation, is known to cause metabolic diseases. This study was carried out to investigate the effect of lyophilized dropwort vinegar powder (DVP) on adipocyte differentiation and inflammation in T3-L1 preadipocyte and RAW 264.7 macrophage cell lines. DVP inhibited the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes induced by a mixture of IBMX, dexamethasone, and insulin (MDI). Western blot analysis of cell lysates showed that DVP decreased the levels of two major transcription factors involved in adipogenesis, peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) and CCAAT-enhancer-binding protein α (C/EBP α). DVP also significantly suppressed lipopolysaccharide (LPS)-induced production of nitric oxide (NO), and this was accompanied by a decrease in inducible NO synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) protein expression. These results demonstrate that DVP inhibits MDI-induced adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells and LPS-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells. The findings indicate that this natural product may be a good candidate as to prevent metabolic diseases.

Key words: 3T3-L1 adipocyte, anti-inflammatory, anti-obesity, dropwort vinegar, RAW 264.7 macrophages

서 론

현대 사회는 에너지의 과잉 섭취, 서구화 된 식생활 습관, 대분비 장애, 유전적인 요인 등으로 인해 비만 인구가 급격히 증가함에 따라 비만이 심각한 사회문제로 다루어지고 있으며, 건강상 많은 문제점의 원인이 된다[34]. 비만은 에너지의 섭취와 소비 사이의 불균형으로 인해 체내 지방 축적이 필요 이상으로 증가하고 지방세포의 크기와 숫자가 비정상적으로 증가하여 발병하며, 염증, 2형 당뇨병, 고혈압 및 심혈관계 질환과 같은 만성대사질환의 원인이 되는 것으로 알려져 있다[1, 2].

Adipogenesis는 지방 세포를 형성하는 과정으로, 지방 조직 세포에 특징적으로 발현되는 전사인자들의 발현이 수반된다[16, 25]. 지방 세포 분화 시에 중요한 역할을 하는 전사인자는 peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR- γ)와 CCAAT-enhancer-binding-protein α (C/EBP α)가 있으며[28], 이 전사 인자들의 발현 증가로 상호 전사 유도를 통한 지방의 축적, 합성, 수송에 관여하는 인자들의 발현이 증가되고, 에너

지를 과량 생산하게 되어 비만에 이를 수 있다[14]. 따라서 비만 관련 대사성 질환들을 효과적으로 억제하기 위해서는 지방 세포 분화 과정에 관여하는 전사인자들의 발현을 억제하는 것이 중요하다.

한편, 염증반응은 활성화된 면역세포(macrophage)에 의해 일어나는 일련의 면역반응이다. 그러나 지속적인 염증반응은 오히려 점막손상을 촉진하고, 그 결과로 일부에서는 암과 같은 질환을 유도하기도 한다. iNOS는 interferon- γ , lipopolysaccharide (LPS)와 같은 염증 유도 사이토카인에 노출되면 혈관투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시키는 nitric oxide (NO)를 합성한다. COX-2는 arachidonic acid를 prostaglandin E₂ (PGE₂)로 전환시키는 효소로 prostaglandin (PG)류의 다양한 염증반응 매개체들을 생성한다[7, 37].

최근 영양소나 대사물질의 공급이 과잉됨에 따라 발생하는 염증 반응에 대해 'meta-inflammation'이라는 용어를 사용함으로써 비만과 함께 심혈관계 질환, 제 2형 당뇨병, 인슐린 저항성과 같은 질환을 면역 체계와 관련하여 대사 증후군의 범주에서 그 관계를 연구하는 활동이 활발히 진행되고 있다[10]. Hotamisligil등[13]은 비만 쥐의 지방조직에서 TNF- α 와 같은 염증성 사이토카인이 과도하게 증가한 것을 확인하였고, 3T3-L1 preadipocyte와 RAW 264.7 macrophage의 coculture 시 TNF- α , MCP-1, NO와 같은 염증 매개체의 분비가 증가한다는 보고[31]들에 의해 비만에 의한 염증반응이 대사성 질환의 주요한 원인으로 작용한다는 것이 확인되었다. 따라서 비만은 감염원 없이 진행되는 낮은 수준의 만성적 염증 상태

*Corresponding author

Tel : +82-53-580-5538, Fax : +82-53-580-5538

E-mail : yumh55@kmu.ac.kr (Mi-Hee Yu)

seunahy@kmu.ac.kr (Seun-Ah Yang)

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.

(chronic and low-level inflammation)로 간주되며, 염증 반응은 비만으로 유도되는 대사질환의 발생 mechanism에서 중요한 역할을 담당한다[8, 35].

본 연구에 사용된 미나리(Dropwort, *Oenanthe javanica*)는 산형과의 미나리 속에 속하는 다년생 초본으로 한국, 중국, 일본, 대만 등 많은 지역에 분포하며, 식용으로 많이 재배되고 있다. 미나리의 주요성분으로는 수분 94.9%, 단백질 2.1%, 탄수화물 1.5%, 비타민 A와 B₁을 비롯하여 비타민 B₂와 C도 풍부하며, 칼슘, 인 및 철과 같은 무기성분이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다[26]. 또한 isorhamnetin, α -pinene, myrcene 등의 성분에 의해 독특한 향을 가지고[6], 혈액 정화, 해열, 폐렴, 혈압 강하, 변비 예방, 일사병 및 하혈에 효과가 있다고 알려져 있다[24]. 한편 최근에는 건강 기능적 측면에서 발효 식품의 다양한 기능성과 함께 식초의 효능이 주목되면서 과일류나 채소류를 이용한 발효식초의 수요가 급증하고 있으며, 더욱 고급화되고 다양화되려는 경향을 보인다[21]. 식초는 고혈압, 동맥 경화 등의 성인병 예방 효과, 콜레스테롤 저하 및 체지방 감소 효과, 살균 효과, 피로회복 등의 효능이 알려지면서 다양한 재료와 용도로 발효될 수 있어 더욱 주목 받고 있다[17]. 미나리에 관한 연구로 미나리의 향기 성분에 관한 연구[27], 미나리 추출물의 항돌연변이 효과[19] 등에 관한 연구들이 보고되고 있지만, 미나리의 지방세포 분화에 미치는 영향이나 항염증 효과에 관한 연구는 미비한 실정이며, 특히 미나리 식초에 관한 연구는 거의 없다. 따라서 본 연구에서는 자연 발효 공정 과정을 거쳐 제조된 미나리 발효 식초의 지방세포 분화 억제 및 항염증 활성을 3T3-L1 지방전구세포와 RAW 264.7 대식세포를 통해 관찰함으로써 비만에 의한 대사성 질환과 염증 억제에 대한 기능성 소재로서의 활용 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

미나리 발효 식초 제조

본 연구에서 사용된 미나리는 비슬청록농장(Deagu, Korea) 으로부터 제공받았으며, 흑설탕은 CJ 제일제당(CJ Cheiljedang Co., Seoul, Korea) 으로부터 구입하여 사용하였다. 먼저 미나리를 수세한 후 세척 및 살균된 용기에 넣고 상온에서 1년간 자연발효 시키고, 고형분을 제거한 발효액을 저장 용기에 옮겨 4°C에서 2년간 더 숙성시켜 미나리 발효액으로 이용하였다. 미나리 발효액과 (주)생생초에서 제공 받은 효모(*S. cerevisiae*, KCTC 188224P)와 초산균(*gluconobacter* sp.KSH-B1, KCTC 18223P)을 이용하여 미나리 발효 식초를 제조하였다. 이때 총 산은 초산으로서 5 내지 6 중량% 되도록 하였다. 발효가 완료된 후 상등액을 취하여 구조토 여과를 통한 정제 과정을 거친 후 동결 건조하여 분말 형태로 만들어 -20°C에서 보관하며 실험에 사용하였다.

3T3-L1 지방전구세포의 배양 및 분화 유도 및 샘플 처리

실험에 사용한 3T3-L1 지방전구세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양 받아 사용하였다. 세포 배양 및 분화에 사용된 배지는 Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (DMEM) (Welgene, Daegu, Korea)에 10% calf serum (Welgene, Daegu, Korea)과 1% antibiotics (penicillin/streptomycin) (Welgene, Daegu, Korea)를 첨가하여 5% CO₂, 37°C incubator에서 배양하여 세포가 confluent 상태가 되기 전에 trypsin/EDTA를 처리하여 세포를 떼어낸 후 원심분리 (L-70, Beckman, Coulter, Fullerton, CA, USA)하여 분주하여 계대 배양 하였다. 분화 유도 시 3×10⁵ cells/well의 밀도로 6 well에 분주하고 100% confluent 상태가 되면 48시간 방치 후 DMEM에 10% FBS (fetal bovine serum) (Welgene, Daegu, Korea)와 23 mg/ml isobutylmethylxanthine (IBMX) (Sigma Chemical Co., st. Louis, Mo, USA), 1 mM dexamethasone (Sigma Chemical Co., st. Louis, Mo, USA), 5 mg/ml insulin (Sigma Chemical Co., st. Louis, Mo, USA)이 첨가된 배지 MDI (M: IBMX, D: dexamethasone, I: insulin)를 처리하여 48시간 동안 분화를 유도한 후, 10% FBS DMEM 배지에 5 mg/ml의 insulin이 첨가된 배지로 이를 동안 배양하였다. 그 후 2일마다 4일 동안 10% FBS DMEM 배지로 교체하면서 지방세포를 분화시켰다. 시료의 처리는 분화 유도 배지 첨가 시점과 동시 처리하였다.

RAW 264.7 대식세포의 배양

실험에 사용한 RAW 264.7 대식세포는 한국 세포주 은행 (KCLB, Seoul, Korea) 으로부터 분양 받아 사용하였다. 10% FBS (fetal bovine serum) (Welgene, Daegu, Korea)와 1% antibiotics (penicillin/streptomycin) (Welgene, Daegu, Korea)를 첨가한 DMEM (Welgene, Daegu, Korea) 배지를 이용하여 5% CO₂, 37°C incubator에서 1주일에 2~3회 계대 배양하였다. 세포는 D60 culture dish (1×10⁶ cells/dish) 및 6 well plate (5×10⁵ cells/dish)에 주입하여 부착시키고, 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후, lipopolysaccharide (LPS) 100 ng/ml를 첨가하여 24시간 배양시킨 후 실험에 이용하였다. 이때, LPS를 처리하지 않은 실험군을 negative control로 하였으며, LPS를 처리한 것을 positive control로 하였다.

세포 독성 측정

시료의 세포 증식과 독성을 측정하기 위해 Green 등의 방법 [9]에 따라 3-(3,4-dimethyl-thiazolyl-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay를 실시하였다. MTT assay는 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의해 노란색의 수용성 기질인 MTT가 불용성의 보라색 formazan으로 환원되는 원리를 이용한 방법으로, 생성된 formazan의 흡광도는 대사가 왕성하고

살아있는 세포의 농도를 반영한다. 세포를 1×10^4 cells/well의 밀도로 96 well plate에 분주하고 24시간 배양 후 농도 별 시료를 처리하여 24시간 incubation한다. 그 후 MTT 시약 (Amresco, Solon Ind., columbus, Ohio, USA)을 5 mg/ml 농도로 10 μ l를 각 well에 처리하고 4시간 동안 incubation하였다. 배양 종료 후 상층액을 제거하고 각 well에 100 μ l의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan결정을 용해시켜 biotekmicroplate spectrophotometer (Epoch, Biotek instruments, Winooski, VT, USA)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포 독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

미나리 발효 식초의 지방전구세포 분화 억제 활성

미나리 발효 식초의 지방세포 분화억제 활성을 확인하기 위해 Oil-red-O staining을 실시하였다. Oil-red-O staining은 중성지방을 염색하는 방법으로 지방 세포 내 중성지방 축적 정도를 시각화 할 수 있다. 3T3-L1 지방전구세포를 8일 동안 분화 시킨 후 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)로 세척하여 10% formaldehyde 용액으로 세포를 고정시켰다. 1시간 이상 충분히 고정 시킨 후 다시 PBS로 세척하고 Oil-red-O 염색시약(Sigma Chemical Co., st. Louis, Mo, USA)을 첨가하여 30분간 실온에서 염색하였다. Oil-red-O 시약을 제거한 후 증류수로 세척한 다음 위상차 현미경을 이용하여 관찰하였다. 흡광도 측정을 위해 100% isopropyl alcohol로 염색된 지방구를 용출시켜 biotekmicroplate spectrophotometer (Epoch, Biotek instruments, Winooski, VT, USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

미나리 발효 식초의 항염증 활성

RAW 264.7 대식세포로부터 생성되는 활성질소종인 nitric oxide (NO)의 양은 Titheradge등[33]의 방법에 의해 세포 배양액 중 존재하는 NO₂ 형태를 Griess Reagent와 반응시켜 측정하였다. RAW 264.7 cell을 DMEM 배지를 이용하여 1×10^5 cells/well농도로 96 well plate에 분주한 후 시료를 농도 별로 처리하여 24시간 배양하였으며 100 ng/ml 농도의 LPS (Sigma Chemical Co., st. Louis, Mo, USA)를 첨가하여 다시 24시간 배양시켰다. 세포 배양 상층액 100 μ l와 Griess Reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylendiamine in 2.5% phosphoric acid) 100 μ l를 혼합하여 96 well plate에서 10분간 반응시킨 후 biotekmicroplate spectrophotometer (Epoch, Biotek instruments, Winooski, VT, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선은 NaNO₂를 농도 별로 조제하여 사용하였다.

Western blot법에 의한 단백질 발현 확인

미나리 발효 식초가 지방세포 분화과정과 염증반응에서 발

현하는 인자들의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 western blot을 실시하였다. 먼저 분화와 샘플처리가 완료된 세포를 PBS로 2-3회 세척한 후 100 μ l의 lysis buffer를 첨가, 30분 동안 용해시킨 후 12,000 rpm, 4°C에서 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 정량 하였다. 4°C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심분리 하여 얻은 상등액은 단백질을 정량 한 후 8~10% running gel과 4.5% stacking gel을 이용하여 125 V에서 SDS-polyacrylamide gel 전기영동(SE260, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)을 실시하였다. 전기영동으로 분리한 단백질은 immobilon-P transfer membrane (PVDF transfer membrane, Port Washington, NY, USA)과 transfer buffer (20% methanol, 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine)를 사용하여 350 mA에서 120분간 transfer하였다. 단백질이 이동된 membrane은 transfer의 유무를 확인한 후, 5% non-fat skim milk solution으로 blocking하였다. 일차 항체의 발현 정도를 검토했기 위하여 TST (Tris-Buffered Saline and Tween 20) 용액에 1:1000으로 희석하여 24시간 동안 4°C에서 반응시킨 후 TST로 3회 세척하였다. 계속하여 이차 항체를 2시간 TST용액에 1:2000으로 희석하여 반응시키고 다시 TST로 3회 세척하였다. 증류수로 한 번 더 세척한 membrane에 ECL detection kit (WSE-7120s, ATTO Co., Tokyo, Japan)의 발색시약 A와 B를 1:1로 섞은 후 혼합액을 도포하고, X-ray film (CP-G plus, Agfa Healthcare Ltd, New Orleans, LA, USA)에 현상한 후 film상의 band 농도를 관찰하였다.

통계처리

모든 결과는 평균표준편차로 나타내었으며, 유의성 검사는 SPSS™ version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)을 이용하여 one-way ANOVA를 실시하였고, 대조구인 분화 Control에 대한 시료 처리구의 통계적 유의성은 Tukey's multiple comparison test로 검증하였다. $p < 0.05$ 이상일 때만 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

미나리 발효 식초가 3T3-L1 지방전구세포의 생존율에 미치는 영향

미나리 발효 식초의 지방분화 억제능을 평가하기 위해 앞서 3T3-L1 preadipocytes의 세포 생존율에 미치는 영향을 MTT assay를 통해 분석하였다 (Fig. 1). 샘플 처리 후 생존율을 확인한 결과 100 μ g/ml에서 2000 μ g/ml의 전 농도 범위에서 80% 이상의 생존율을 보여 세포의 성장에 큰 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하였다. 일반적으로 세포의 적정 생육 조건은 pH 6.9~7.8 이다[4]. 미나리 발효 식초의 유기산 성분이 배지

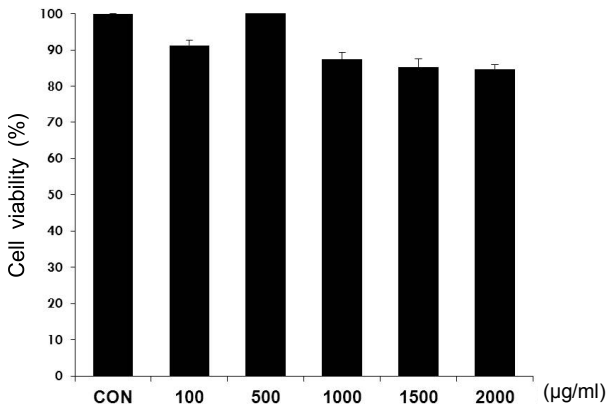


Fig. 1. Effect of lyophilized dropwort vinegar on cell viability in 3T3-L1 preadipocytes. 3T3-L1 preadipocytes were treated with dropwort vinegar at various concentration (100~2000 µg/ml) for 24 hr. Cell viability was calculated as a percentage using MTT assay. Results represent the mean ± SD of three independent experiments.

의 pH를 변화시켜 세포의 생육에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 pH strip 방법을 이용하였다. pH strip 방법은 pH meter 사용에 비해 비교적 간편하고 빠르게 pH의 측정이 가능하다. MTT assay에 사용한 것과 동일한 조건의 배지에 미나리 발효 식초를 농도 별로 희석한 후 pH test paper (Advantec Tokyo Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 pH를 측정한 결과 전 농도 구간에서 pH 7정도를 나타내어, 세포 생존 시 pH에 따른 영향은 받지 않는 것을 확인하였다(data not shown). 따라서 3T3-L1 adipocytes의 성장에 영향을 끼치지 않으면서 세포 독

성을 나타내지 않는 2000 µg/ml 이하의 농도 범위에서 실험을 진행하였다.

미나리 발효 식초가 3T3-L1 지방전구세포의 lipid droplet 생성에 미치는 영향

미나리 발효 식초가 3T3-L1 preadipocytes의 지방구 형성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 지방전구세포의 분화를 유도한 후 lipid droplet만을 특이적으로 염색시키는 Oil-red-O 염색 시약을 사용하여 염색 시킨 후 200배 배율의 현미경으로 관찰하였다(Fig. 2). Lipid droplet은 phospholipid monolayer로 둘러 싸여진 중성지방으로 precursor fibroblast에서부터 지방세포로의 분화 과정에 나타나며, peroxisome-proliferators-activated-receptor-γ (PPAR-γ)와 같은 중요한 adipogenic transcription factor들에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다[3]. Oil-red-O 시약으로 분화된 지방세포를 염색시키면 cholesterol, 중성지방만 염색되고, 유리지방산이나 인지질은 염색되지 않는다. Lipid droplet은 대부분 중성지방으로 축적되어 있기 때문에 염색이 가능하다[20]. 따라서 분화가 유도된 3T3-L1 지방전구세포의 분화과정에서 미나리 발효 식초가 lipid droplet의 형성을 저해하는지 확인하기 위하여 Oil-red-O 염색 후 lipid droplet 생성 정도를 위상차 현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 미나리 발효 식초를 처리하지 않고 분화만 유도하였을 때 세포질 내 lipid droplet의 형성이 활발하게 이루어진 것을 확인하였고, 미나리 발효 식초를 10, 100, 500, 1000 µg/ml 농도로 처리하였을 때 농도 의존적으로 지방구의 형성이 억제되는 것을 관찰하였다. 이 실험 결과에 의해 미나

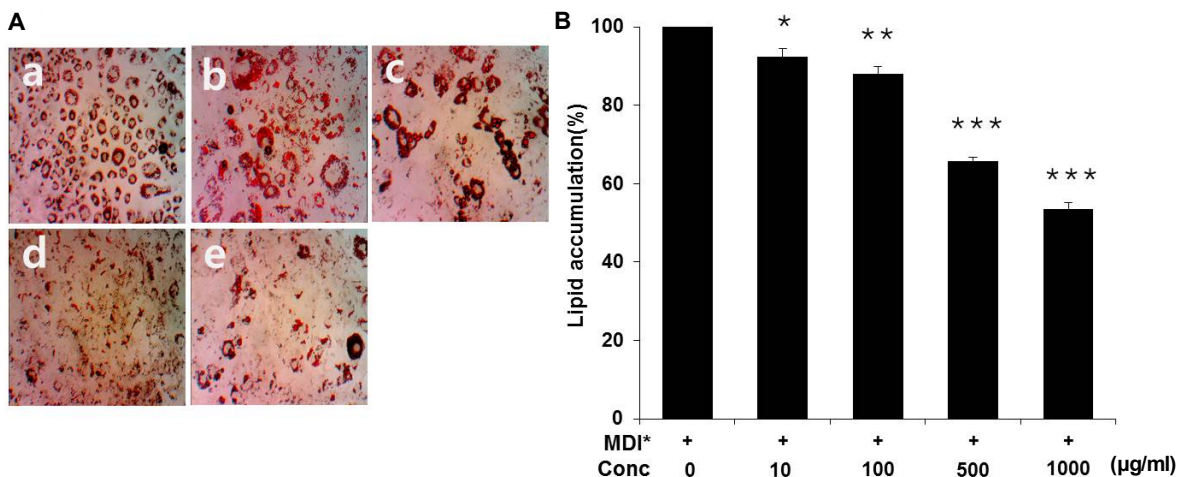


Fig. 2. Inhibitory effect of lyophilized dropwort vinegar on the lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocyte. Differentiating 3T3-L1 cells were treated with every 2 days with dropwort vinegar for 8 days in adipocyte-induction media. Intracellular lipids were stained with (A) Oil-red-O. To determine the accumulation of lipid content, (B) Oil-red-O dye was dissolved in isopropanol and optical density detected at 520 nm. Results represent the mean ± SD of three independent experiments. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 compared to MDI treated positive control cells. a: differentiated control, b: 10 µg/ml of dropwort vinegar, c: 100 µg/ml of dropwort vinegar, d: 500 µg/ml of dropwort vinegar, e: 1000 µg/ml of dropwort vinegar. MDI: 5 mg/ml insulin, 1 mM dexamethasone, 23 mg/ml isobutylmethylxanthine (IBMX).

리 발효 식초가 lipid droplet 형성을 저해시켜 지방의 축적을 억제하는데 효과가 있을 것으로 생각된다.

미나리 발효 식초가 PPAR-γ, C/EBPα 단백질 발현에 미치는 영향

미나리 발효 식초가 adipogenic transcription factor의 발현에 미치는 영향을 western blot법을 이용하여 단백질 수준에서 확인하였다. Adipogenesis는 지방전구세포(pre-adipocyte)가 증식 및 분화되는 과정을 거쳐 성숙한 지방세포(adipocyte)로 되는 과정을 의미하며, 이 과정에서 지질의 축적, 호르몬에 대한 민감성 변화가 초래되고, lipogenesis 및 lipolysis에 관여하는 일련의 유전자 발현이 변화된다. 유전자들의 발현은 궁극적으로 peroxisome-proliferators-activated-receptor-γ (PPAR-γ)와 CCAAT enhancer-binding-proteins (C/EBPs) family 등의 전사인자에 의해 조절된다. C/EBP family와 PPAR-γ는 호르몬에 의해 adipogenesis가 유도되는 과정에서 중요하게 작용하는 전사인자이다. Nuclear receptor superfamily에 속하는 PPAR-γ는 adipogenesis를 총괄적으로 조절하는 역할을 하며, adipocyte로 분화된 상태를 유지하는데 필수적인 인자이다. C/EBPα는 PPAR-γ와의 강한 상승 작용을 통해 pre-adipocyte의 말기 분화 과정을 촉진한다[5, 11, 23]. Pre-adipo-

cyte에서 분화 유도와 동시에 미나리 발효 식초를 100, 500, 1,000, 1,500, 2,000 μg/ml 농도로 처리하고 FBS와 insulin이 첨가된 배지로 갈아 줄 때마다 시료를 동시 처리하여 분화 종료 후 단백질 발현 정도를 확인한 결과는 Fig. 3과 같다. 시료를 처리하지 않은 분화 유도군에서는 PPAR-γ 및 C/EBPα의 발현이 현저하게 증가하는 것으로 나타났으며, 미나리 발효식초를 농도 별로 처리하였을 때 PPAR-γ 및 C/EBPα의 발현이 분화 유도군에 비하여 유의적으로 감소하는 결과를 나타냈다. PPAR-γ는 리간드 활성화 전사요소의 핵 호르몬 수용체 상위군 중 하나로 이는 지방대사, 대사증후군, 염증반응 그리고 동맥경화증에 있어서 여러 가지 유전자의 발현을 조절하는 중요한 역할을 한다. PPAR-γ의 발현증가는 C/EBPα의 지방세포 분화후기의 발현을 유도하여 지방세포의 증식과 인슐린 민감도 향진에 관여한다. 따라서 미나리 식초는 지방세포 분화의 핵심적인 역할을 하는 PPAR-γ 및 C/EBPα의 발현을 억제하여 지방세포 분화를 감소시키는 것으로 생각된다. 또한 식초 또는 초산의 섭취는 항비만 및 항당뇨에 효과가 있는 것으로 보고되고 있으며[22], 비만을 예방하고, 대사 증후군과 대사 증후군으로 인한 심혈관계 질환 예방에 도움이 되는 것으로 알려져 있다[32]. 본 실험에 사용된 미나리의 주요 향기 성분 중 하나인 isorhamnetin은 항산화, 항염증 및 항비만에

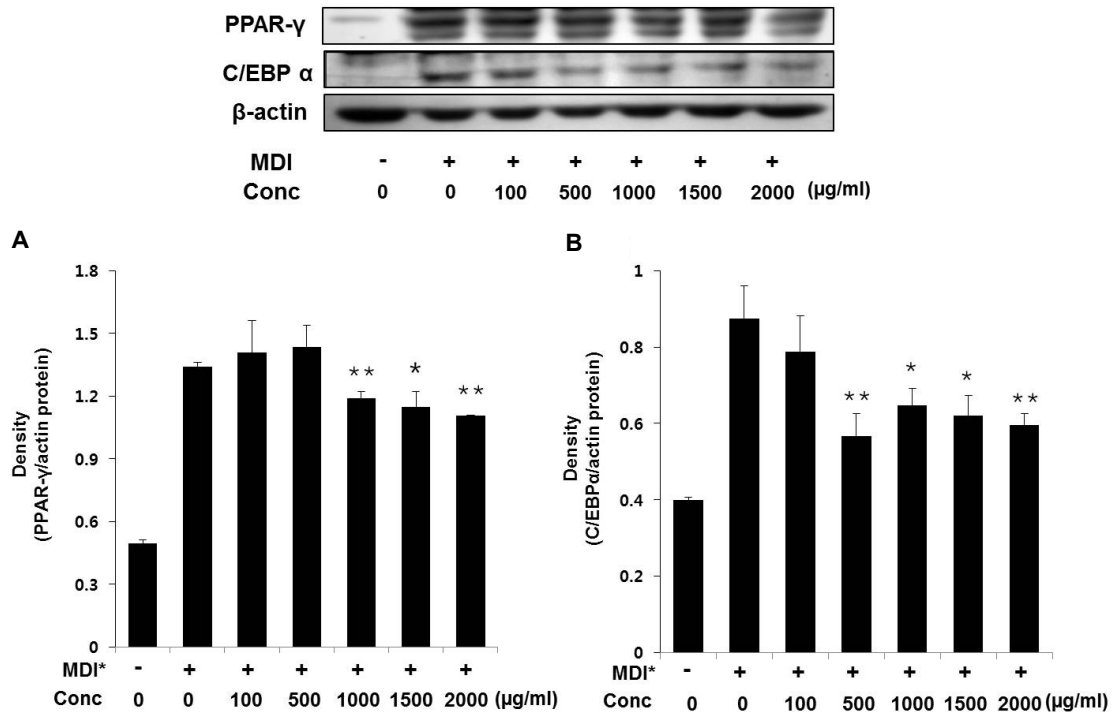


Fig. 3. Effect of lyophilized dropwort vinegar on adipogenic transcription factors. Differentiating 3T3-L1 cells were treated every 2 days with dropwort vinegar for 8 days in adipocyte-induction media. At day 9, adipocytes protein was isolated and protein expressions of (A) PPAR-γ and (B) C/EBPα were determined by Western blot analysis. Results represent the mean ± SD of three independent experiments. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 compared to MDI treated positive control cells. MDI: 5 mg/ml insulin, 1 mM dexamethasone, 23 mg/ml isobutylmethylxanthine (IBMX).

효과가 있다고 알려져 있다[30]. 또한 본 연구팀의 이전 연구에 따르면 실험에 사용된 미나리 발효 식초의 산도는 4.86%, 주요 유기산은 acetic acid 함량이 4.8%로 총 유기산의 대부분을 차지하였으며, 그 외에 소량의 malic acid (0.08%)와 oxalic acid (0.01%)를 함유하고 있다[15]. 따라서 미나리의 독특한 향기 성분 중 하나인 isorhamnetin 성분과 미나리를 초산 발효시킨 식초의 유기산 성분이 3T3-L1 지방전구세포의 분화과정에 주요 transcription factor인 PPAR- γ 및 C/EBP α 의 발현을 억제하는데 영향을 미쳐 지방세포 분화 조절에 도움을 준 것으로 생각된다. 향후 미나리 발효 식초가 가진 지방 세포 분화 억제에 관여하는 성분들에 대해서는 추가 연구가 필요할 것이다.

미나리 발효 식초가 RAW 264.7 대식세포의 생존율에 미치는 영향

미나리 발효 식초의 항염증 효과를 평가하기 위해 RAW 264.7 macrophages의 세포 생존율에 미치는 영향을 MTT assay를 통해 확인하였다(Fig. 4A). 샘플 처리 후 생존율을 확인한 결과 10 μ g/ml에서 1000 μ g/ml의 전 농도 범위에서 80% 이상의 생존율을 보여 세포의 성장에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다. 3T3-L1 cell과 동일하게 RAW 264.7 macrophages의 MTT assay에 사용한 것과 동일한 조건의 배지에 미나리 발효 식초를 농도별로 희석한 후 pH test paper (Advantec Tokyo Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 pH를 측정 한 결과 전 농도 구간에서 샘플에 의한 pH의 변화를 보이지 않아 세포 생존 시 pH에 따른 영향은 받지 않는 것을 확인하였다(data not shown). 따라서 RAW 264.7 macrophages의 생존에 영향을 미치지 않고 세포 독성이 낮은 1,000 μ g/ml이하의

농도 범위에서 실험을 진행하였다.

미나리 발효 식초가 Nitric Oxide (NO) 생성에 미치는 영향

대식세포에서는 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 외부 자극 등에 의해 염증반응이 일어나면 Nitric oxide (NO), prostaglandins (PGs)와 interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)와 같은 pro-inflammatory cytokine와 같은 다양한 염증성 cytokine을 증가시키고, 염증 반응을 조절하여 다양한 병리적인 반응을 유도한다[36]. 본 연구에서는 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 미나리 발효 식초의 NO 생성 억제 활성을 측정하기 위하여 10, 100, 500, 1,000 μ g/ml의 농도로 미나리 식초를 처리하여 생성된 NO의 양을 측정하였다(Fig. 4B). LPS 처리군은 LPS 무첨가 군에 비하여 NO 생성량이 현저히 증가하는 것을 확인하였고, 미나리 식초를 농도별로 처리한 결과, 500, 1,000 μ g/ml의 농도에서 유의적으로 NO의 생성량이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 미나리 식초가 독성을 나타내지 않으면서 LPS에 의해 생성이 증가된 NO를 효과적으로 억제시킨다는 것을 나타낸다.

미나리 발효 식초가 COX-2, iNOS단백질 발현에 미치는 영향

미나리 발효 식초가 COX-2와 iNOS 단백질 발현에 미치는 영향을 측정하기 위해 western blot 법을 이용하여 iNOS와 COX-2의 단백질 발현량을 조사하였다(Fig. 5). 대식세포에서 cytokine이나 LPS와 같은 자극은 염증 반응 전사 인자인 nuclear factor kappaB (NF- κ B)를 활성화 시켜 iNOS와 COX-2를 발현시키는 것으로 알려져 있다[29]. iNOS는 LPS와 같은 외부 자극으로 인해 생성되는 효소로, 장시간 동안 다량의 NO를

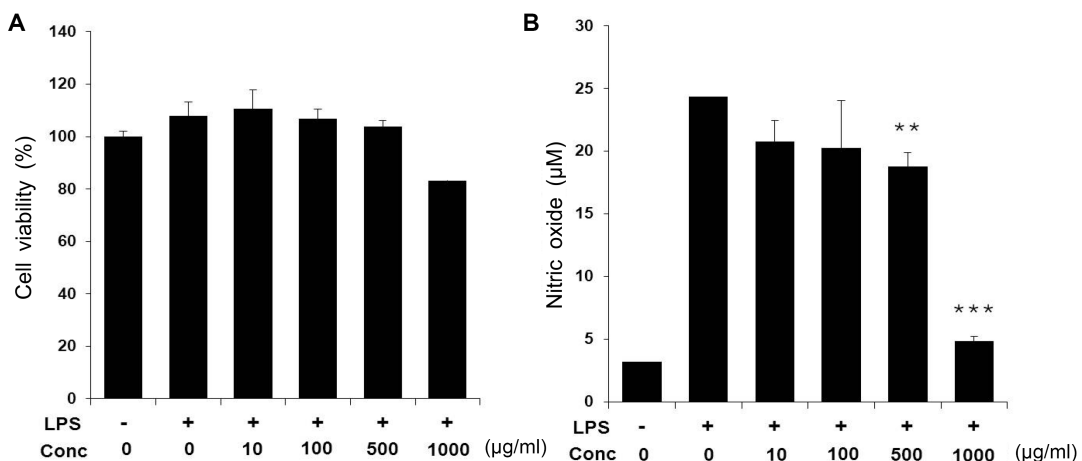


Fig. 4. Effect of lyophilized dropwort vinegar on cell viability and NO production in LPS-induced RAW 264.7 macrophage. RAW 264.7 macrophage were treated with dropwort vinegar and LPS (100 ng/ml) for 24 hr. Cell viability was calculated as a percentage of MTT metabolism in controls. NO production was determined in culture supernatant by Griess reagent. Results represent the mean \pm SD of three independent experiments. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 compared to the group treated with LPS.

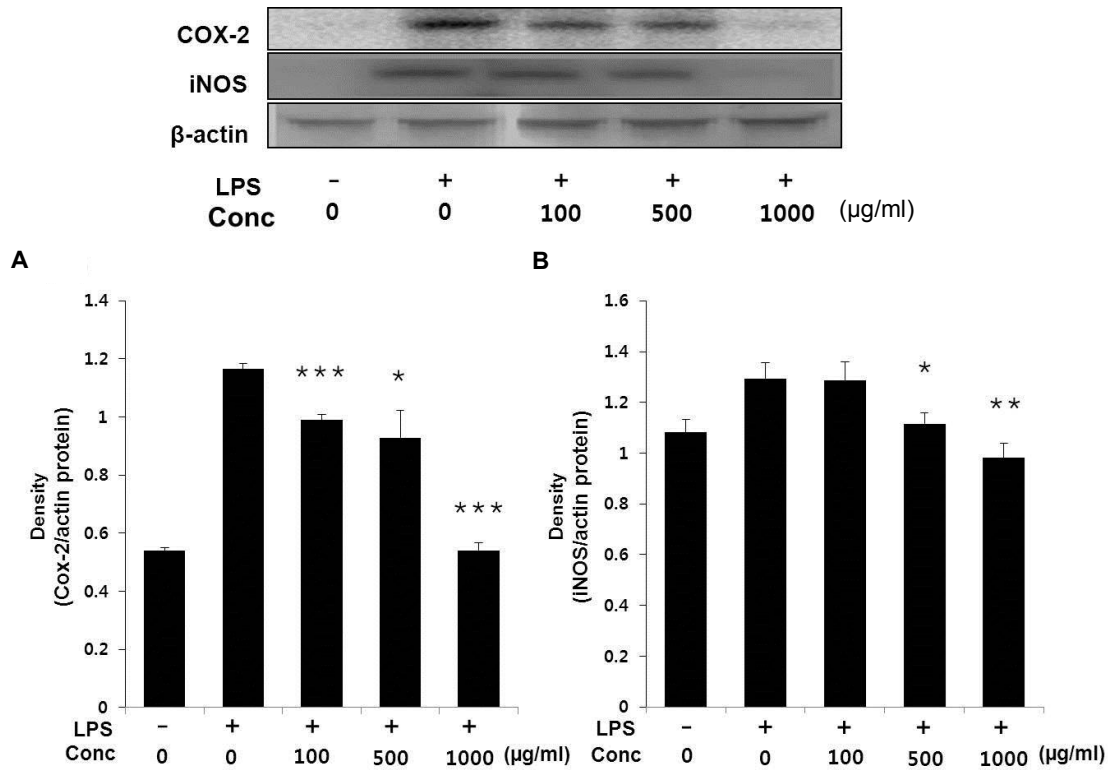


Fig. 5. Effect of dropwort vinegar on the expression of COX-2 and iNOS protein in LPS-induced RAW 264.7 macrophage. The RAW 264.7 cells were incubated 24 hr and then pretreated with dropwort vinegar in presence or absence of LPS (100 ng/ml) for 24 hr. Equal amounts of total protein were resolved by SDS-PAGE and protein expressions of (A) COX-2 and (B) iNOS were determined by Western blot analysis. Results represent the mean \pm SD of three independent experiments. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 compared to the group treated with LPS.

생성한다. 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 염증반응과 염증매개체의 생합성을 촉진시켜 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다[18]. COX-2는 염증 자극원에 의해 macrophage와 같은 염증성 세포에서 유도되며, 염증 반응에서의 prostaglandin은 대부분 COX-2에 의해 생성된다[12]. 실험을 통해 LPS 처리 대조군에서 일반 대조군에 비하여 iNOS와 COX-2 단백질의 발현이 현저히 증가한 것을 확인하였고, LPS와 미나리 발효 식초를 100, 500, 1000 µg/ml의 농도로 처리한 그룹에서는 iNOS와 COX-2의 발현이 LPS 처리 대조군에 비하여 농도 의존적으로 감소하였다. 따라서 본 연구에서 미나리 식초는 MDI의 처리에 의하여 분화가 유도된 3T3-L1 adipocytes의 PPAR- γ 와 C/EBP α 의 발현을 억제하였고, LPS 처리에 의해 염증이 유도된 RAW 264.7 세포의 iNOS와 COX-2 단백질 발현을 저해하는 것을 확인하였다. 향후 비만세포와 대식세포의 coculture를 통해 비만에 의해 유발된 염증반응에는 미나리 식초가 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구가 추가되어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 2013학년도 2학기 계명대학교 대학원 학생 학술

연구 장학금 및 2011년도 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 기초 연구 사업 지원을 받아 수행되었음(No. 2011-0014190) 감사드립니다.

References

- Attie, A. D. and Scherer, P. E. 2009. Adipocyte metabolism and obesity. *J Lipid Res* **50**, 395-399.
- Bradford, B. L. and Bruce, M. S. 2000. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* **404**, 652-660.
- Cornelius, P., MacDougald, O. A. and Lane, M. D. 1994. Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr* **14**, 99-129.
- Costante, C. and Harry, E. 1971. pH as a Determinant of cellular growth and contact inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**, 229-233.
- Darlington, G. J., Ross, S. E. and MacDougald, O. A. 1998. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* **273**, 30057-30060.
- Fujita, T., Kadoya, Y., Aota, H. and Nakayama, M. 1995. A new phenylpropanoid glucoside and other constituents of *Oenanthe javanica*. *Biosci Biotechnol Biochem* **59**, 526-528.

7. Funk, C. D. 2001. Prostaglandins and leukotrienes; advances in eicosanoid biology. *Science* **294**, 1871-1875.
8. Gokhan, S. H. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**, 860-867.
9. Green, L. M., Reade, J. L. and Ware, C. F. 1984. Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J Immunol Methods* **70**, 257-268.
10. Gregor, M. F. and Hotamisligil, G. S. 2011. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* **29**, 415-445.
11. Hauser, S., Adelmant, G., Sarraf, P., Wright, H. M., Mueller, E. and Spiegelman, B. M. 2000. Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation. *J Biol Chem* **275**, 18527-18533.
12. Herschman, H. R. Prostaglandin synthase 2. 1996. *Biochem Biophys Acta* **1299**, 125-140.
13. Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S. and Spiegelman, B. M. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259**, 87-91.
14. Kim, J. B. and Park, J. Y. 2002. Molecular insights into fat cell differentiation and functional roles of adipocytokine. *J Korean Soc Endo* **17**, 1-9.
15. Kim, M. J., Lee, S. B., Choi, J. H., Kwon, S. H., Kim, H. D., Bang, M. H. and Yang, S. A. 2013. Characteristics of fermented dropwort extract and vinegar using fermented dropwort extract and its protective effects on oxidative damage in rat glioma C6 cells. *Korean J Food Sci Technol* **45**, 350-355.
16. Koutnikova, H. and Auwerx, J. 2001. Regulation of adipocyte differentiation. *Ann Med* **33**, 556-561.
17. Kwon, S. H., Jeong, E. J., Lee, G. D. and Jeong, Y. J. 2000. Preparation method of fruit vinegars by two stage fermentation and beverage including vinegar. *Food Ind Nutr* **5**, 18-24.
18. Kawamata, H., Ochiai, H., Mantani, N. and Terasawa, K. 2000. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS activated RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line. *Am J Chin Med* **28**, 217-226.
19. Lee, K. L., Park, K. Y. and Rhee, S. H. 1992. Antimutagenic effect of green-yellow vegetables toward aflatoxin B1 and 4-nitroquinoline-1-oxide. *J Korean Soc Food Nutr* **21**, 143-148.
20. McNeel, R. L. and Mersmann, H. J. 2003. Effects of isomers of conjugated linoleic acid on porcine adipocyte growth and differentiation. *J Nutr Biochem* **5**, 266-274.
21. Nanba, T. and Kato, H. 1985. Applications of mirin and non-salt miso to vinegar brewing. *Nippon shokuhin Kogyo Gakkaishi* **32**, 731-737.
22. Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B. A., Morrison, A. R., Lefkowitz, J. B. 1996. Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem*; **55**: 69-102, Herschman, H. R. Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta* **1299**: 125-40.
23. Ohshima, T., Koga, H. and Shimotohno, K. 2004. Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* **279**, 29551-29557.
24. Park, J. C., Yu, Y. B. and Lee, J. H. 1993. Isolation of steroids and flavonoids from the herb of *Oenanthe javanica* D.C. *Korean J Pharmacogn* **24**, 244-246.
25. Park, S. J., Choi, J. H., Jung, Y. S. and YU, M. H. 2013. Inhibitory effect of *Rumex Crispus* L. fraction on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Korean J Food Sci Technol* **45**, 90-96.
26. Park, S. J., Lee, K. S. and An, H. L. 2007. Effects of dropwort powder on the quality of castella. *J East Asian Soc Diet Life* **17**, 834-839.
27. Rhee, H. J., Koh, M. S. and Choi, O. J. 1995. A study on the volatile constituents of the water dropwort (*Oenanthe Stolonifera* DC). *Korean J Food Sci* **11**, 386-395.
28. Rosen, E. D., Hsu, C. H., Wang, X., Sakai, X., Freeman, M. W., Gonzalez, F. J. and Spiegelman, B. M. 2001. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPAR: a unified pathway. *Genes Dev* **16**, 22-26.
29. Shew, R. L., Papka, R. E., Mcneill, D. L. and Yee, J. A. 1993. NADPH-diaphorase-positive nerves and the role of nitric oxide in CGRP relaxation of uterine contraction. *Peptides* **14**, 637-641.
30. Si, Y. X., Wang, Z. J., Park, D., Jeong, H. O., Ye, S., Chung, H. Y., Yang, J. M., Yin, S. J. and Qian, G. Y. 2012. Effects of isorhamnetin on tyrosinase: inhibition kinetics and computational simulation. *Biosci Biotechnol Biochem* **76**, 1091-1097.
31. Suganami, T., Nishida, J. and Ogawa, Y. 2005. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 2062-2068.
32. Tamashita, H., Fujisawa, K., Lto, E., Idei, S., Kawaguci, N., Kimoto, M., Hiemori, M. and Tsuji, H. 2007. Improvement of obesity and glucose tolerance by acetate in type 2 diabetic otsuka long-evans tokushima Fatty (OLETF) rats. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**, 1236-1243.
33. Titheradge, M. A. 1998. The enzymatic measurement of nitrate and nitrite. *Methods Mol Biol* **100**, 83-91.
34. Visscher, T. L. S. and Seidell, J. C. 2001. The public health impact of obesity. *Annu Rev Public Health* **22**, 355-375.
35. Wasserman, F. 1965. *The development of adipose tissue. In Handbook of physiology*, pp. 87-100, Renold, A., Cahill, G.F. eds., American Physiological Society: Washington, D. C., USA.
36. Willeaume, V., Kruys, V., Mijatovic, T. and Huez, G. 1996. Tumor necrosis factor-alpha production induced by viruses and by lipopolysaccharide in macrophages: similarities and differences. *J Inflamm* **46**, 1-12.
37. Yun, H. Y., Dawson, V. L. and Dawson, T. M. 1996. Neurobiology of nitric oxide. *Crit Rev Neurobiol* **10**, 291-316.

초록 : 미나리 발효 식초의 지방세포 분화억제 및 항염증 효과

박윤희¹ · 최준혁¹ · 황 기¹ · 이승욱¹ · 양선아^{2*} · 유미희^{1*}

(¹계명대학교 식품가공학 전공, ²계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화 연구(TMR)센터)

비만은 감염원 없이 진행되는 낮은 수준의 만성적인 전신성 염증상태로 간주되며, 만성대사질환의 원인이 된다. 본 연구에서는 미나리를 발효하여 만든 식초가 3T3-L1 지방전구세포의 분화 및 RAW 264.7 세포에서의 항염증 효과에 미치는 영향을 확인하였다. MDI (IBMX, dexamethasone, insulin)에 의해 분화가 유발된 3T3-L1 지방전구세포에 대한 미나리 식초의 분화 억제능을 Oil-red-O staining을 통해 확인하였으며, western blot법을 통해 지방세포 형성 시 중요한 전사인자인 peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ)와 CCAAT-enhancer-binding protein α (C/EBP α)의 발현을 감소시키는 것으로 나타났다. 또한, 미나리 식초가 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 염증이 유발된 RAW 264.7 세포의 nitric oxide (NO) 생성을 억제시켰으며, inducible NO synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 단백질 발현을 감소시키는 것을 확인하였다. 이러한 결과들을 통해 미나리 발효 식초는 지방세포 분화와 염증 억제 효과를 가지고 있음을 확인하였다. 따라서 미나리 발효 식초는 대사성 질환을 예방할 수 있는 천연물 소재로 이용 가능할 것으로 생각된다.