

두메부추(*Allium senescens* L.) 메탄올 추출물의 지방세포 내 활성산소종 생성 및 지질축적 억제 효능

최혜영 · 김건희*

덕성여자대학교 식물자원연구소

Inhibitory Effects of *Allium senescens* L. Methanol Extracts on Reactive Oxygen Species Production and Lipid Accumulation during Differentiation in 3T3-L1 Cells

Hye-Young Choi and Gun-Hee Kim*

Plant Resources Research Institute, Duksung Women's University

Abstract *Allium senescens* L. is perennial plant of the Liliaceae family that grows throughout Korea. In this study, we investigated the effect of *Allium senescens* L. methanol extracts on reactive oxygen species (ROS) production and lipid accumulation during adipogenesis. Our results indicated that 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity of *Allium senescens* L. methanol extracts increased in a dose-dependent manner. *Allium senescens* L. methanol extracts suppressed ROS production and lipid accumulation during adipogenesis. In addition, *Allium senescens* L. methanol extracts inhibited the mRNA expression of the pro-oxidant enzyme, such as G6PDH and lead to a reduction in the mRNA levels of the transcription factors, such as sterol regulatory element binding proteins 1c, peroxisome proliferator-activated receptor γ , and CCAAT/enhancer-binding proteins α . These results indicate that *Allium senescens* L. methanol extracts inhibit adipogenesis by modulating ROS production associated with ROS-regulating genes and directly down-regulating adipogenic transcription factors.

Keywords: *Allium senescens* L., 3T3-L1 cell, adipocyte differentiation, reactive oxygen species, lipid accumulation

서 론

현대 사회는 식생활 및 생활습관의 서구화, 내분비 장애, 유전적인 요인 등으로 인하여 전 세계적으로 비만이 심각한 질환으로 대두되고 있다(1). 비만은 열량의 섭취와 소비의 불균형으로 인해 체내 지방이 과잉 축적되어 생기는 질환으로 지방세포의 비대(hypertrophy)와 과형성(hyperplasia)으로 초래되며, 고혈압, 심혈관계 질환, 제 2형 당뇨병, 고지혈증 및 암 등과 같은 다양한 성인병의 원인으로 밝혀졌다(2,3). 최근 연구에 의하면 에너지 소비 증가, 식이 조절 요법, 지방전구세포의 분화와 증식억제, 지방세포 형성(adipogenesis) 억제, 지방분해 등의 기전이 대사성 질환을 일으키는 주요 원인인 비만을 억제하기 위하여 제안되고 있다(4). 지방세포는 에너지 항상성 유지 및 지질대사에 중요한 역할을 하며, 3T3-L1 지방전구세포는 다양한 호르몬 및 전사인자들에 의해 지방세포로 분화되어 세포 내 중성지질을 축적한다. 이러한 지방세포 형성(adipogenesis)에 관여하는 중요한 전사인자로 sterol regulatory element binding proteins 1c (SREBP1c), peroxisome

proliferator-activated receptor (PPAR) γ , and CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP) α 가 있다. 따라서 지방세포 형성(adipogenesis) 과정에서 세포 내 중성지질 축적에 관여하는 다양한 adipogenic gene과 효소 활성이 증가되며, 효과적인 비만억제를 위해서는 지방세포 분화과정에 관여하는 전사인자들의 활성을 억제하는 것이 중요하다(5,6). 최근 여러 연구를 통해 지방세포 형성(adipogenesis)에 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)이 밀접한 연관을 갖는다는 연구가 보고되었다(7,8). 지방세포는 분화 과정에서 세포 내로 유입되는 포도당을 저장하기 위하여 지방합성과 연관된 에너지대사 경로를 거치게 된다. 이들 대사 경로 중 hexose monophosphate (HMP) shunt는 G6PDH에 의하여 지방 합성에 반드시 필요로 하는 NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)를 생성하게 된다. 이렇게 생성된 NADPH는 NADPH Oxidase (NOX)에 의하여 NADP+로 전환되며, 이 때 세포 내 superoxide와 같은 ROS가 발생한다(9). 체내 각종 세포에서 여러 대사과정으로 인하여 끊임없이 생성되는 ROS는 항산화 효소와의 항상성이 깨지면 산화적 스트레스로 인한 노화, 당뇨, 비만과 같은 각종 질병들을 야기하게 된다(10). 또한, 지방세포에서 과도하게 생성된 ROS는 3T3-L1 지방전구세포의 분화를 촉진시키거나 지방세포 주변에 위치한 macrophage를 자극하여 또 다른 ROS를 생성하기 때문에 비만의 주요 원인 중에 하나라고 보고된 바 있다(11).

백합과에 속하는 *Allium*속 식물은 세계적으로 500여종이 분포되어 있으며, 황을 함유하고 있는 화합물로 암 예방 활성, 심혈

*Corresponding author: Gun-Hee Kim, Plant Resources Research Institute, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea
Tel: 82-2-901-8496
Fax: 82-2-901-8661
E-mail: ghkim@duksung.ac.kr
Received April 23, 2014; revised June 10, 2014;
accepted June 17, 2014

관계 질환 예방 활성 등 여러 가지 생리적 유용성을 나타내는 것으로 알려져 있다(12,13). *Allium*속 식물의 함향 화합물은 원료 식물에 독특한 향미를 부여할 뿐 아니라 다양한 생리적 기능성을 나타내는 주된 물질로서 식품산업에서 활용가치가 높다. *Allium*속에 속하는 두메부추(*Allium senescens* L.)는 백합과의 다년생 초본으로 일반부추에 비하여 잎이 두껍고 길며, 향이 매우 강한 특성을 지니고 있다(14). 방향성 식물인 두메부추는 한방과 민간요법에서 비늘줄기와 잎을 이뇨, 해독, 소화, 구충, 진통 등의 약재로 사용되어 왔다(15). 국내에서는 *Allium*속 식물의 생리적 유용성에 대한 항산화 활성(16), 항혈전 활성(17), 항미생물 활성(18,19) 및 항염증 효과(20) 등 여러 가지 생리활성이 보고되었으나, 비만 및 당뇨병을 비롯한 만성질환 예방과 관련된 연구가 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 3T3-L1 지방전구세포에서 지방세포로 형성되는 과정에서 *Allium*속에 속하는 두메부추 메탄올 추출물의 ROS 생성 저해 및 중성지질 축적 억제 효능을 조사하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용된 시료는 한국식물추출물은행에서 두메부추 전초 메탄올 추출물을 분양 받아 사용하였다. 마우스 유래 3T3-L1 세포주는 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 분양 받았다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Phosphate buffered saline (PBS), Fetal bovine serum (FBS), 0.25% Trypsin-EDTA 및 Penicillin-streptomycin은 WellGENE (Daegu, Korea)에서 구입하였다. Insulin, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), Dexamethasone (DEX), Oil red O, Nitroblue tetrazolium (NBT), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), Dimethyl sulfoxide (DMSO) 및 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. RNA 분리에 사용되는 RNeasy mini kit, Taq-man 중합효소는 Qiagen (Valencia, CA, USA)에서 구입하였으며, Real-time PCR을 위해 사용한 SYBR green은 Bioline (London, UK)에서 구입하여 사용하였다.

항산화 활성 측정

DPPH radical 소거법은 Kim 등(21)의 방법을 변형하여 측정하였다. Ethanol에 용해시킨 0.1 mM DPPH 용액에 농도 별로 희석한 추출물을 첨가하여 30분 동안 반응시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 전자공여능은 다음 식에 의하여 나타내었다.

$$\text{전자공여능(\%)} = (1 - \text{시료흡광도} / \text{대조구흡광도}) \times 100$$

3T3-L1 세포 배양 및 분화

3T3-L1 지방전구세포를 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM을 이용하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 3T3-L1 지방전구세포를 분화 유도하기 위해서 100% confluency 상태에서 48시간 방치 후, DMEM에 분화유도 호르몬(0.5 mM IBMX, 0.5 μM DEX, 10 μg/mL Insulin: MDI)을 혼합한 mixture로 분화 유도를 시작하였다. 그 후 2일 마다 insulin (10 μg/mL)이 포함된 DMEM 배지로 교환하였고, 분화유도 8일까지 분화시켰다.

MTT assay

세포 독성 실험에 사용한 MTT solution (5 mg/mL)은 PBS에 녹인 뒤 여과하여 사용하였다. 3T3-L1 preadipocyte를 1×10⁴ cells/well으로 48 well plate에 분주하여 24시간 배양 후 새로운 배지와 함께 추출물을 농도별로(10, 25, 50, 100 및 200 μg/mL)로 처리하여 72시간 동안 배양하였다. MTT용액을 각 well에 첨가하고 2시간동안 배양한 후, 상층액을 제거하고 각 well에 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 ELISA reader (Spectra MAX M2, Molecular Devices Inc, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Oil red O 염색

3T3-L1 지방전구세포의 세포분화 후 배지를 제거한 뒤, 세포를 PBS로 2번 세척하고, 10% formalin 용액으로 상온에서 10분간 고정한 다음 PBS로 세척하였다. 세척된 세포는 생성된 lipid droplet과 특이적으로 반응하는 Oil Red O 용액(0.2% Oil red O-Isopropanol solution: Water=3:2)을 이용하여 1시간 동안 염색하고, PBS로 세척 후 지방세포의 염색 정도를 현미경을 통해 관찰한 다음 100% isopropanol을 이용하여 세포 내 염색된 Oil red O를 모두 용해한 뒤 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

NBT assay

3T3-L1 지방전구세포의 세포분화 후 각 well에 0.2% NBT를 첨가하여 90분간 반응시켜 생성된 dark blue formazan을 50% acetic acid를 이용하여 모두 용출시킨 다음 570 nm에서 흡광도를 측정한 후 대조군의 흡광도 값에 대한 백분율로 나타내었다.

RNA isolation 및 Real-time polymerase chain reaction

세포 내 총 RNA는 RNeasy mini kit를 이용하여 분리한 후 1 μg의 총 RNA를 oligo (dT) primer와 superscript II 역전사효소와 함께 반응시켜 1차 cDNA를 합성하였다. PCR 반응은 1 μg의 cDNA를 SYBR Green과 Table 1에 나타난 primer에 첨가하여 최종반응 용량을 20 μL로 하여 95°C에서 10분간 denature 시킨 후,

Table 1. Primer sequences used in Real-Time PCR

Primers	Sequences	
	Forward	Reverse
PPARγ	5'-CTCCTGTTGACCCAGAGCAT-3'	5'-AGCCTTGCATCCTTCAACAAG-3'
C/EBPα	5'-GCACAAGAACAGCAACGAGTA-3'	5'-GGCGGTCATTGTCACCTGGTC-3'
SREBP1c	5'-CCAGCAGGTCCAGTTGTAT-3'	5'-AGGTACTGTGGCCAAGATGG-3'
NOX4	5'-GAAGCCCATTTGAGGAGTCA-3'	5'-GGGTCCACAGCAGAAAACCTC-3'
G6PDH	5'-CGATGGCAGAGCAGGT-3'	5'-GATCTGGTCTCACG-3'
β-actin	5'-CCGTCTTCCCCTCCATCGT-3'	5'-ATCGTCCCAGTTGGTTACAATGC-3'

95°C에서 15초간, 61°C에서 1분간, 72°C에서 30초간 40 cycle 실시하였고, 최종적으로 72°C에서 5분간 extension 반응하여 원하는 형광 값을 검출했다. 실험에 사용된 장비는 Real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)이며 주요 유전자의 primer 및 sequence는 Table 1과 같다.

통계분석

본 실험결과는 SPSS (Statistical Package for Social Science, ver. 19, Chicago, IL, USA) 를 이용하여 분석하였다. 모든 측정 항목의 결과는 평균±표준편차로 표시하였고, 실험군간 평균의 차이는 one-way ANOVA로 유의성을 확인한 후 $p < 0.05$ 수준에서 유의성의 여부를 검증하였다.

결과 및 고찰

두메부추 메탄올 추출물의 항산화 활성

체내에서 생물학적 손상의 주요 요인으로 알려져 있는 free radical은 단백질, 지질 및 DNA에 손상을 일으키며, 암을 비롯한 뇌 질환, 피부 및 소화기 질환, 염증, 류마티스, 면역 질환 등 각종 질병의 원인이 되는 것으로 알려져 있다(22). DPPH radical 소거법은 항산화 물질의 전자공여능으로 인해 자색이 탈색되는 원리를 이용한 것으로 비교적 방법이 간단하여 항산화물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다(23). 두메부추(ASL) 메탄올 추출물의 DPPH radical 소거 활성을 보면 10, 50 µg/mL 농도에서는 거의 나타나지 않았지만(data not shown) 100-2,000 µg/mL에서 유의적으로 증가하였으며 특히, ASL 메탄올 추출물 2,000 µg/mL의 농도에서는 25.8%의 가장 높은 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다(Fig. 1). 이는 *Allium*속 식물의 하나인 산마늘 열수 추출물 2,000 µg/mL에서 58.5%의 DPPH radical 소거능을 나타낸 Cho 등(24)의 연구 결과와 비교해 볼 때, ASL의 radical 소거능은 다소 낮은 편이었다. 그러나 *Allium*속의 하나인 흑마늘 및 생양파의 메탄올 추출물 1,000 µg/mL 농도에서 각각 30.8%, 26.6%의 DPPH radical 소거능을 나타낸 Yang과 Park(25)의 연구 결과와 비교해 볼 때, ASL은 이와 비슷한 radical 소거활성을 나타내었다. 강원도 원주시 일대에서 두메부추를 채집하여 MeOH 추출물을 실험에 사용한 Nugroho 등(26)의 결과를 보면, HPLC로 정성 및 정량 분석하였을 때, caffeoylquinic acid (CQ)류 화합물인 3-*O*-p-coumaroyl-caffeoylquinic acids (3-pCQ) 함량이 44.3 mg/g으로 높게 나타났다. CQ 성분을 함유한 추출물은 지질과 단백질을 과산화시키고 세포독성을 야기하는 peroxynitrite 소거효과(27)와 항체양(28), 항비만(29)에 효과가 있는 것으로 보고되었다. 따라서, 본 실험에서 사용된 ASL 메탄올 추출물의 항산화 활성에 두메부추의 CQ 성분이 영향을 주었을 것으로 사료된다.

지방전구세포 내 두메부추 메탄올 추출물의 세포독성 평가

3T3-L1 지방전구세포에 추출물을 10-200 µg/mL로 72시간 동안 처리했을 때 세포 생존율을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. ASL 메탄올 추출물을 처리하였을 때, 10-100 µg/mL 농도에서는 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았지만 200 µg/mL에서 유의적인 감소를 보였다. 따라서 본 연구에서는 유의적으로 세포독성을 나타내지 않는 10, 50 및 100 µg/mL 농도에서 실험을 진행하였다.

지방세포 내 ROS 생성에 대한 두메부추 메탄올 추출물의 효과

지방세포로부터 과량으로 생성된 활성산소들은 세포내 산화적 스트레스를 증가시키게 되고 염증, 종양의 생성 등과 관련이 있

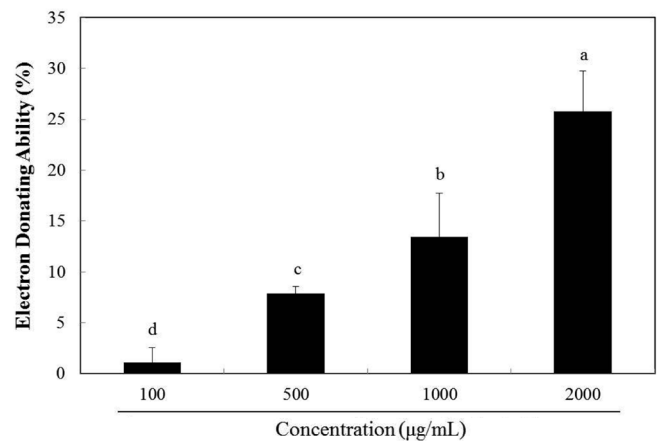


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of *Allium senescens* L. (ASL). The activity was evaluated by measuring DPPH radical scavenging detected at 525 nm. Data are expressed as mean±SD of triplicate experiments. Bars with different letters indicate statistically significant different by Turkey-HSD multiple comparison test at $p < 0.05$.

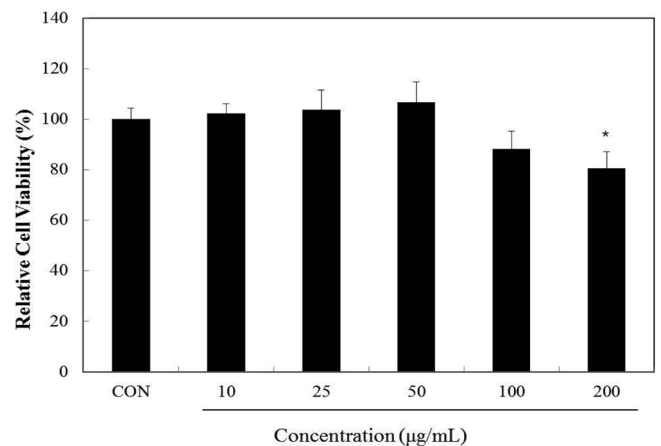


Fig. 2. Effect of *Allium senescens* L. (ASL) on the cell viability of 3T3-L1 preadipocytes. 3T3-L1 cells were treated with ASL methanol extracts (10, 25, 50, 100 and 200 µg/mL) for 72 h. Cell viability was determined by the MTT assay. Data are expressed as mean±SD of triplicate experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Turkey-HSD multiple comparison test. * $p < 0.05$ indicates statistically significant different.

는 것뿐만 아니라 세포 또는 조직의 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다(30). 또한, 지방세포에서 발생된 ROS가 지방세포 형성(adipogenesis) 과정에서 mitotic clonal expansion을 증가시켜 지방세포 분화를 촉진시키기 때문에 비만을 야기시키는 원인으로 보고되었다(31). 따라서 지방세포 형성(adipogenesis) 과정에서 ASL 메탄올 추출물에 의한 세포내 ROS 생성 변화를 측정하기 위하여 NBT assay를 이용하였다. 3T3-L1 지방전구세포에 분화유도 물질과 함께 추출물을 농도별(10, 50 및 100 µg/mL)로 처리하였고 지방세포 내 생성되는 ROS를 NBT로 염색한 뒤 흡광도를 측정된 결과는 Fig. 3에 나타내었다. ASL 메탄올 추출물을 처리한 결과, 세포내 ROS 생성량은 100 µg/mL 농도에서 분화된 대조군(MDI) 그룹에 비해 21.5%까지 유의적으로 감소하였다. 최근 연구에 따르면 지방세포 내 ROS 생성 억제제 ROS 관련 효소의 발현 감소에 의한 것이라고 보고되었다(7,8). 따라서, ASL 메탄

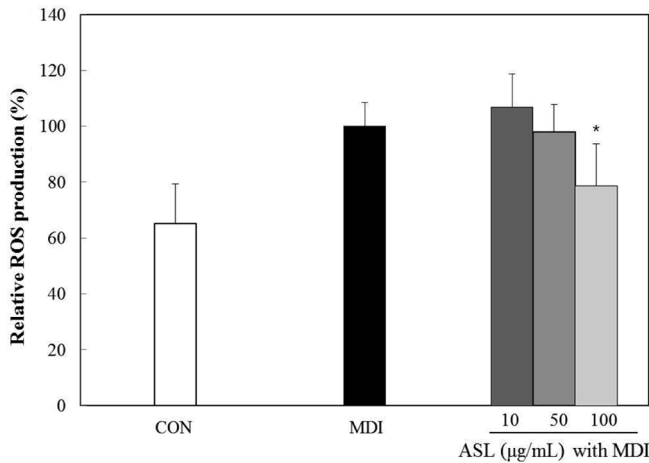


Fig. 3. Effect of *Allium senescens* L. (ASL) on ROS production during adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes. 3T3-L1 adipocytes were treated with ASL methanol extracts (10, 50 and 100 µg/mL) during adipogenesis. ROS production was assessed by the formation of dark-blue formazan and determined by the NBT assay at 570 nm. Data are expressed as mean±SD of triplicate experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Turkey-HSD multiple comparison test. **p*<0.05 indicates statistically significant different.

을 추출물에 의한 지방세포 내 ROS 형성 기전을 연구하기 위하여 ROS 생성과 연관된 주요 효소들의 유전자 발현 양상을 비교하였다.

지방세포 내 ROS 생성 유전자 발현에 대한 두메부추 메탄올 추출물의 효과

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) 효소는 세포 내에서 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)의 생산과 pentose phosphate pathway (PPP)를 통한 carbon flow에 반드시 필요한 효소로서 PPP의 대사경로 첫 번째 반응에서 glucose-6-phosphate가 6-phosphogluconolactone로 분해될 때 NADP+를 NADPH로 전환시켜 주는 역할을 한다. 또한, NADPH는 NOX4에 의해 다시 NADP+로 전환되는데 이때, 세포내 superoxide와 같은 ROS가 다량으로 생성된다. 생성된 ROS는 세포 생존과 사멸, redox 시스템 유지에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 지방세포의 cell cycle에 영향을 미쳐 지방세포의 분화를 촉진시키게 된다(32,33). 따라서 지방세포 내에서 G6PDH, NOX4의 mRNA 발현을 통해 ROS 생성을 조절할 수 있다. Fig 4에서 나타난 것과 같이, ROS 생성과 관련된 G6PDH의 유전자 발현 양상은 ASL 메탄올 추출물 농도 50, 100 µg/mL에서 대조군(MDI) 그룹에 비해 유의적으로 발현이 억제되었다. ASL 메탄올 추출물에 의한 G6PDH mRNA의 발현 감소 양상은 ROS 생성량 감소 효과와 유사한 경향으로, ROS 생성 유전자의 발현 억제가 지방세포 내 ROS 생성을 감소시킨 것으로 사료된다. 그러나 ROS 생성을 유도하는 주요 효소인 NOX4는 분화를 유도하지 않은 CON 그룹에 비해 분화가 유도된 대조군(MDI) 그룹에서 발현이 현저하게 감소했고, ASL 메탄올 추출물 농도 50, 100 µg/mL에서 대조군(MDI) 그룹에 비해 유의적으로 발현이 증가하였다. 많은 연구에서 NOX4는 분화유도와 함께 발현이 증가하였으며 추출물을 처리한 그룹은 대조군(MDI) 그룹에 비해 감소하는 경향을 보였다(7,8,34). 그러나 ASL 메탄올 추출물을 처리했을 때, 지방세포 내

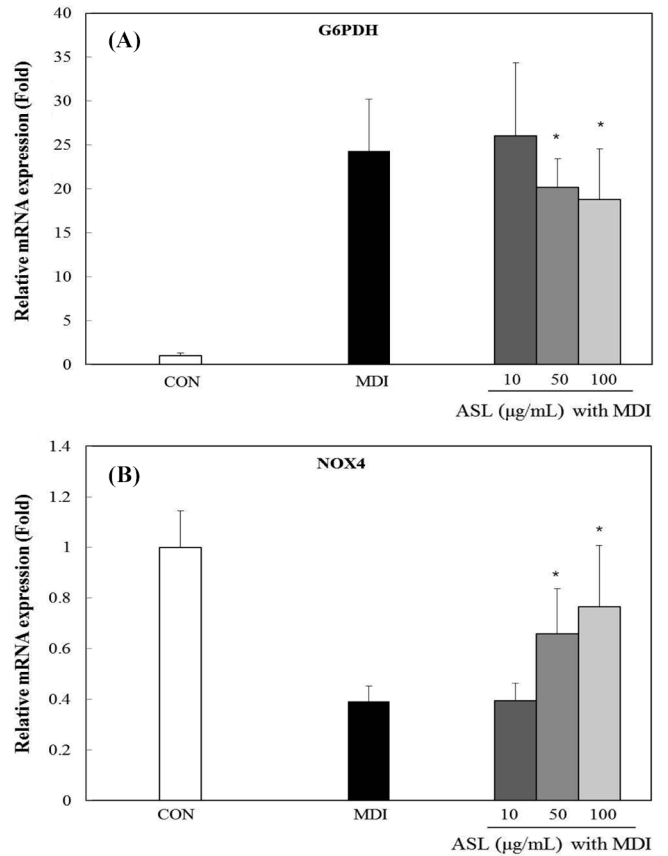


Fig. 4. Effect of *Allium senescens* L. (ASL) on G6PDH and NOX4 mRNA expression during adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes. 3T3-L1 adipocytes were treated with ASL methanol extracts (10, 50 and 100 µg/mL) during adipogenesis. Total RNA was extracted on day 8 and G6PDH and NOX4 mRNA was measured by quantitative real time PCR. Each mRNA was quantified and normalized to β-actin. Data are expressed as mean±SD of triplicate experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Turkey-HSD multiple comparison test. **p*<0.05 indicates statistically significant different.

NOX4의 mRNA 발현은 이러한 연구와 반대의 경향을 나타내었다. Mouche 등(35)의 연구를 보면, NOX4 mRNA는 지방전구세포에서 높은 수준으로 발현되었으나 지방세포의 분화와 함께 발현이 현저하게 감소하였고 NOX4의 mRNA와 단백질 발현은 지방세포 형성(adipogenesis)동안 여러 경로의 조절을 통하여 이루어진다고 보고되었다. Hecker 등(36)의 연구를 보면, G6PDH 효소에 의해 생성된 NADPH는 NOX, uncoupled nitric oxide synthase, xanthine oxidase 효소에 의해 NADP+로 전환되고, 이 과정에서 다량의 ROS가 생성된다고 보고되었다. 이를 토대로 본 연구의 ASL 메탄올 추출물은 NADPH에서 NADP+로 전환되는 과정에서 NOX4에 의한 ROS 생성 기전에는 관여하지 않고, 그 외의 다른 기전을 통하여 ROS 생성을 억제시킨 것으로 사료되며 구체적인 기전연구가 필요하다고 생각되어진다. 또한 향후 연구에서는 보다 명확한 지방세포 내 ROS 생성 억제 효과를 확인하기 위해 ROS 소거에 관여하는 Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, catalase 등과 같은 항산화 효소의 발현 양상을 비교하는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

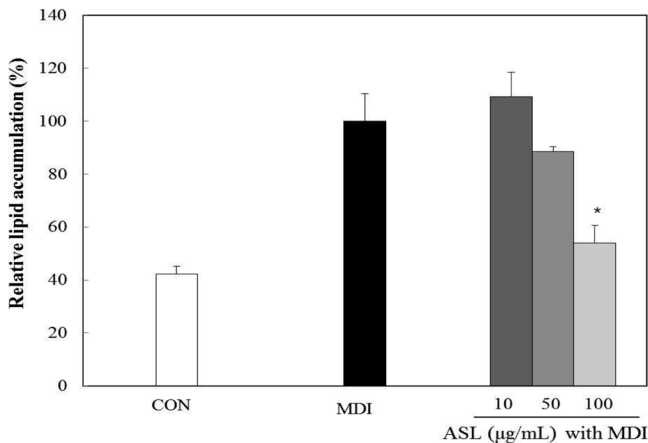


Fig. 5. Effect of *Allium senescens* L. (ASL) on lipid accumulation during adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes. 3T3-L1 adipocytes were treated with ASL methanol extracts (10, 50 and 100 µg/mL) during adipogenesis. Lipid accumulation was evaluated by Oil Red O staining. Data are expressed as mean±SD of triplicate experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Turkey-HSD multiple comparison test. * $p < 0.05$ indicates statistically significant different.

지방세포 내 중성지방 생성에 대한 두메부추 메탄올 추출물의 효과

체내에서 중성지방은 포도당과 함께 세포의 중요한 에너지원으로 사용되고 여분의 중성지방은 지방세포에 흡수되고 저장되어 과도하게 축적된 지방구는 비만의 원인으로 작용하여 다양한 만성질환의 원인이 된다(37). 따라서 ASL 메탄올 추출물에 의한 3T3-L1 지방세포 내 지방축적 억제 효능을 확인하기 위해 지방전구세포 분화 유도과 함께 추출물을 농도별(10, 50 및 100 µg/mL)로 처리하였다. ASL 메탄올 추출물을 처리했을 때, 지방세포 내의 중성지방 생성은 농도의존적인 감소를 보였다(Fig. 5). 특히, ASL 메탄올 추출물 50, 100 µg/mL에서 각각 11.6, 46.2%의 유의적인 세포 내 중성지방이 감소를 나타내었다. 이는 3T3-L1 지방전구세포의 분화유도과정에서 추출물에 의한 ROS 생성 감소와 지방세포 내 중성지방 생성 감소가 유사한 경향을 보였다. 세포 내에서 발생한 ROS는 지방세포의 growth arrest를 촉진시켜 mitotic clonal expansion을 증가시킴으로서 지방세포 분화를 유도한다는 Lee 등(30)의 결과를 비추어 볼 때, ASL 메탄올 추출물이 지방세포에 존재하는 ROS를 소거하거나 불활성화 시켜, 지방세포의 growth arrest를 억제하여 cell cycle의 억제를 통한 지방전구세포의 분화가 진행되지 않은 것으로 사료된다.

지방세포 분화 조절인자들의 발현에 대한 두메부추 메탄올 추출물의 효과

3T3-L1 지방전구세포는 지방세포로 분화되는 과정에서 지질 축적에 의해 지방구가 생성되는 형태학적인 변화뿐만 아니라 지방세포에 나타나는 특이적인 단백질 marker의 발현 증가와 같은 생화학적인 변화도 나타난다. 이러한 지방세포 형성(adipogenesis) 과정에서 지질 축적, 호르몬에 대한 민감성 변화가 초래되며, lipogenesis 및 lipolysis에 관여하는 일련의 유전자발현이 변화된다. 이들 유전자들의 발현은 SREBP1c, PPAR γ 및 C/EBP family 등의 전사인자에 의해 조절된다(38,39). SREBP1c는 지방산이나 콜레스테롤 합성에 필수 전사인자인 SREBP의 하나이며, 지방세포 분화과정 초기에 발현이 유도되며 PPAR γ 의 전사활성을 증가

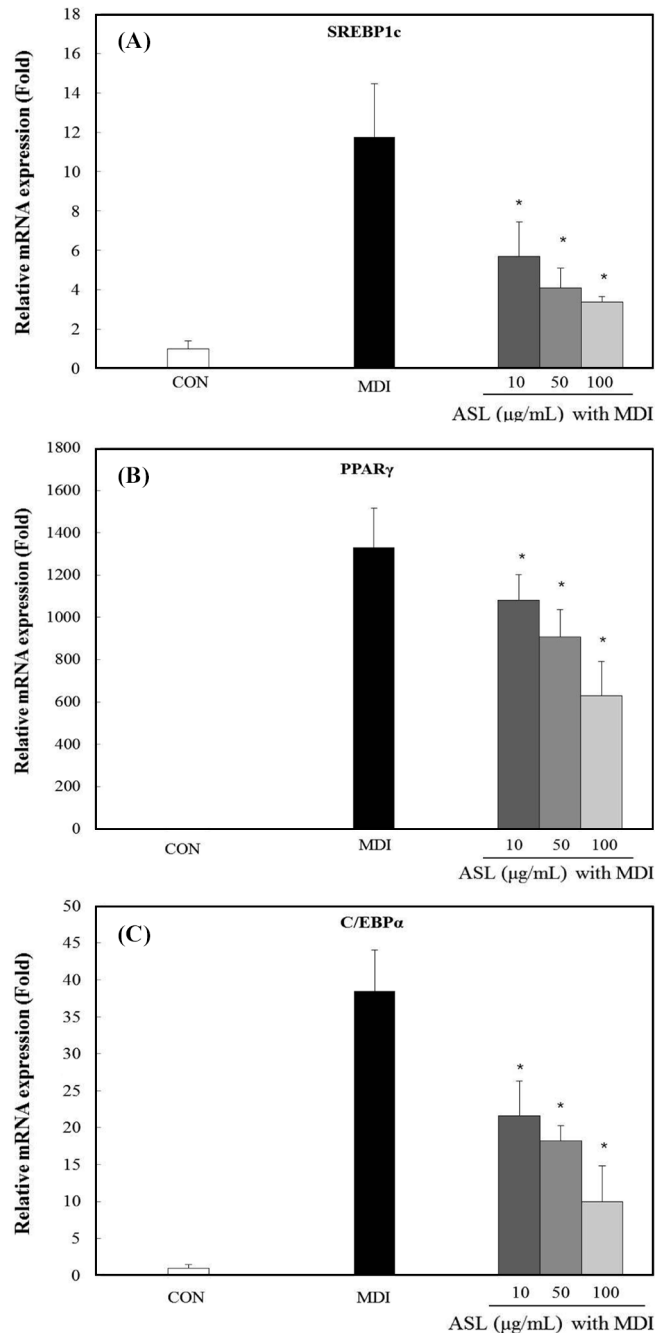


Fig. 6. Effect of *Allium senescens* L. (ASL) on SREBP1c, PPAR γ and C/EBP α mRNA expression during adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes. 3T3-L1 adipocytes were treated with ASL methanol extracts (10, 50 and 100 µg/mL) during adipogenesis. Total RNA was extracted on day 8 and SREBP1c, PPAR γ and C/EBP α mRNA was measured by quantitative real time PCR. Each mRNA was quantified and normalized to β -actin. Data are expressed as mean ±SD of triplicate experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Turkey-HSD multiple comparison test. * $p < 0.05$ indicates statistically significant different.

시킨다(40). PPAR γ 와 C/EBP family는 호르몬에 의해 지방세포 형성(adipogenesis)이 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 유도하여 지방전구세포의 초기 분화과정에서 중요한 역할을 하며 C/EBP α 는 PPAR γ 와의 강한 상승 작용을 통해 지방전구세포의 분화후기 과정을 촉진한다(41,42). 따라서 본 연구에서는 ASL 메탄을 추출물이 adipogenic transcription factor의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 SREBP1c, PPAR γ 및 C/EBP α 의 유전자 발현을 측정하였다. ASL 메탄을 추출물을 3T3-L1 preadipocyte에 농도별(10, 50 및 100 μ g/mL)로 처리하면서 분화를 유도하였고 분화된 대조군(MDI)과 비교하였다. 그 결과 분화를 유도한 대조군(MDI) 그룹에서는 SREBP1c, PPAR γ 및 C/EBP α 의 mRNA 발현이 증가하였으나, 분화과정에서 ASL 메탄을 추출물을 처리하여 분화를 유도한 경우 SREBP1c, PPAR γ 및 C/EBP α 의 mRNA 발현이 모두 농도 의존적으로 감소하였음을 확인하였다(Fig. 6). 이와 같은 결과는 Oil Red O 염색을 통한 중성지방 생성 감소 결과와 일치하는 경향을 보였다. 따라서 ASL 메탄을 추출물은 3T3-L1 지방전구세포에서 SREBP1c, PPAR γ 및 C/EBP α 의 유전자 발현을 억제함으로써 중성지방 생성을 감소시켜 지방세포로의 분화를 억제시킬 수 있는 것으로 생각된다. 최근 연구에 의하면 ROS는 PPAR γ 의 발현을 증가시킴으로서 지질 생성의 중요 단계인 mitotic clonal expansion phase를 촉진시키지만 항산화제는 mitotic clonal expansion phase를 정지시켜 PPAR γ 의 발현을 억제하는 것으로 보고되었다(30). 따라서 ASL 메탄을 추출물은 지방세포 내의 ROS 생성을 억제시킴으로서 adipogenic transcription factor 발현을 감소시켜 중성지방 생성을 저해시켰을 것이라 사료된다.

본 연구에서는 ASL 메탄을 추출물 처리에 의한 3T3-L1 지방세포 내 ROS 생성량 감소와 지질 축적 억제효과를 확인하고자 하였다. 그 결과 지방세포 형성(adipogenesis) 과정에서 ASL 메탄을 추출물을 처리하였을 때, 지방세포 내 ROS 관련 유전자 발현의 감소는 ROS 생성을 저해시켰다. 생성이 저해된 ROS는 adipogenic transcription factor 발현을 감소시킴으로써 결과적으로 중성지질 축적을 억제하여 ASL이 비만과 관련된 만성질환 개선을 위한 기능성 소재로서 가능성이 있음을 보여주었다.

요 약

본 연구에서는 3T3-L1 지방전구세포를 이용하여 *Allium*속 식물의 하나인 두메부추(ASL) 메탄을 추출물의 ROS 생성 저해 및 지질축적 억제 효과를 확인하고자 하였다. 먼저 ASL 메탄을 추출물 100-2,000 μ g/mL의 모든 농도에서 유의적인 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었으며, ASL 메탄을 추출물을 처리하였을 때 유의적인 세포 독성을 나타내지 않은 10-100 μ g/mL 농도에서 실험을 진행하였다. 지방세포 내 ROS 관련 효소와 분화관련 전사인자의 조절로 인한 중성지방 축적 저해 활성을 확인하기 위하여 지방전구세포의 분화를 분화 유도하면서 추출물을 농도별(10, 50 및 100 μ g/mL)로 처리하였다. 그 결과, ASL 메탄을 추출물은 대조군에 비해 ROS 생성량과 ROS 관련 효소인 G6PDH mRNA 발현을 농도 의존적으로 감소시켰다. 또한 ASL 메탄을 추출물 처리로 인하여 지방세포 내 중성지방 축적이 유의적으로 감소되었으며, adipogenic transcription factor인 SREBP1c, PPAR γ 및 C/EBP α mRNA 발현도 농도 의존적으로 억제되었다. 이상의 결과들로 볼 때, ASL 메탄을 추출물로 인한 ROS 생성 저해와 지질 축적 억제는 ROS 생성 및 ROS 관련 유전자의 발현 감소로 인한 지방 생성 주요 전사인자의 유전자 발현 억제로 인한 것으로 보이며, ASL이 항비만에 우수한 효능을 가지는 기능성 식품 소재로서의 개발 가능성이 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 덕성여자대학교 2014년도 교내 연구비(3000002148)의 지원에 의해 연구되었으며 이에 감사드립니다.

References

- Visscher TLS, Seidell JC. The public health impact of obesity. *Annu. Rev. Publ. Health* 22: 355-375 (2001)
- Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104: 531-543 (2001)
- Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Gene. Dev.* 14: 1293-1307 (2000)
- Wang YW, Jones PJH. Conjugated linoleic acid and obesity control: efficacy and mechanisms. *Int. J. Obesity* 28: 941-955 (2004)
- Morrison RF, Farmer SR. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J. Nutr.* 130: 3116S-3121S (2000)
- Ntambi JM, Kim YC. Adipocyte differentiation and gene expression. *J. Nutr.* 130: 3122S-3126S (2000)
- Lee OH, Seo MJ, Choi HS, Lee BY. Pycnogenol inhibits lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes with the modulation of reactive oxygen species (ROS) production associated with antioxidant enzyme responses. *Phytother. Res.* 26: 403-411 (2012)
- Seo MJ, Choi HS, Lee OH, Lee BY. *Grateloupia lanceolata* (Okamura) Kawaguchi, the edible red seaweed, inhibits lipid accumulation and reactive oxygen species production during differentiation in 3T3-L1 cells. *Phytother. Res.* 27: 655-663 (2013)
- Lee OH, Kwon YI, Hong HD, Park CS, Lee BY, Kim YC. Production of reactive oxygen species and changes in antioxidant enzyme activities during differentiation of 3T3-L1 adipocyte. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 52: 70-75 (2009)
- Halliwel B. Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.* 16: 33-50 (1996)
- Yamashita A, Soga Y, Iwamoto Y, Asano T, Li Y, Abiko Y, Nishimura F. DNA microarray analyses of genes expressed differentially in 3T3-L1 adipocytes co-cultured with murine macrophage cell line RAW264.7 in the presence of the toll-like receptor 4 ligand bacterial endotoxin. *Int. J. Obesity* 32: 1725-1729 (2008)
- Steiner RP. *Folk Medicine: The Art and the Science*. American Chemical Society, Washington, DC, USA. pp. 125-137 (1986)
- Scharfenberg K, Wagner R, Wagner KG. The cytotoxic effect of ajoene, a natural product from garlic, investigated with different cell lines. *Cancer Lett.* 53: 103-108 (1990)
- Korea National Arboretum. *Illustrated Rare and Endangered Species in Korea*. Korea National Arboretum, Seoul, Korea. p. 37 (1997)
- Kim TJ. *Korea Plants V*. Seoul National University Press, Seoul, Korea. p. 150 (1998)
- Hopia A, Heinonen M. Antioxidant activity of flavonol aglycones and their glycosides in methyl linoleate. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76: 139-144 (1999)
- Kim MJ, Song YS, Song YO. The fibrinolytic activity of kimchi and its ingredients *in vivo* and *in vitro*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27: 633-638 (1998)
- Kim OM, Kim MK, Lee SO, Kee KR, Kim SD. Antimicrobial effect of ethanol extracts from spices against *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* isolated from kimchi. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27: 455-460 (1998)
- Kim SJ, Park KH. Antimicrobial activities of the extracts of vegetable kimchi stuff. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27: 216-229 (1995)
- Kim HP, Mani I, Iversen L, Ziboh VA. Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 58: 17-24 (1998)
- Kim JH, Park JH, Park SD, Choi SY, Seong JH, Moon KD. Preparation and antioxidant activity of health drink with extract powders from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed. *Korean J.*

- Food Sci. Technol. 34: 617-624 (2002)
22. Jeong EJ, Sung SH, Kim JW, Kim SH, Kim YC. *Rhus vernici-flua* stokes attenuates glutamate-induced neurotoxicity in primary cultures of rat cortical cells. Nat. Prod. Sci. 14: 156-160 (2008)
 23. Kwon GJ, Choi DS, Wang MH. Biological activities of hot water extracts from *Enonymus alatus* leaf. Korean J. Food Sci. Technol. 39: 569-574 (2007)
 24. Cho JY, Park YJ, Oh DM, Rhyu DY, Kim YS, Chon SU, Kang SS, Heo BG. Amino acid contents and various physiological activities of *Allium victorialis*. Korean J. Plant Res. 24: 150-159 (2011)
 25. Yang YR, Park YK. Comparison of antioxidant activities of black onion extracts. Korean J. Food Preserv. 18: 954-960 (2011)
 26. Nugroho A, Kim MH, Lee JH, Kim JD, Lee KR, Choi JS, Yoo YM, Park HJ. Polyphenol analysis and peroxynitrite scavenging effect of the extracts from eight Korean mountainous vegetable. Kor. J. Pharmacogn. 42: 38-45 (2011)
 27. Nugroho A, Kim KH, Lee KR, Alam MB, Choi JS, Kim WB, Park HJ. Qualitative and quantitative determination of the caffeoylquinic acids on the Korean mountainous vegetables used for chwinamul and their peroxynitrite-scavenging effect. Arch. Pharm. Res. 32: 1361-1367 (2009)
 28. Lee BI, Nugroho A, Bachri MS, Choi J, Lee KR, Choi JS, Kim WB, Lee KT, PLee JD, Park HJ. Anti-ulcerogenic effect of the caffeoylquinic acid-rich extract from *Ligularia stenocephala* and HPLC analysis. Biol. Pharm. Bull. 33: 493-497 (2010)
 29. Nugroho A, Bachri MS, Choi J, Choi JS, Kim WB, Lee BI, Kim JD, Park HJ. The inhibitory effect of the caffeoylquinic acid-rich extract of *Ligularia stenocephala* leaves on obesity in the high fat diet-induced rat. Nat. Prod. Sci. 16: 80-87 (2010)
 30. Lee H, Lee YJ, Choi H, Ko EH, Kim JW. Reactive oxygen species facilitate adipocyte differentiation by accelerating mitotic clonal expansion. J. Biol. Chem. 284: 10601-10609 (2009)
 31. Lee KS, Kim MG, Lee KY. Antimicrobial effect of the extracts of cactus *Chounnyouncho* (*Opuntia humifusa*) against food borne pathogens. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33: 1268-1272 (2004)
 32. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. J. Clin. Invest. 114: 1752-1761 (2004)
 33. Park J, Choe SS, Choi AH, Kim KH, Yoon MJ, Suganami T, Ogawa Y, Kim JB. Increase in glucose-6-phosphate dehydrogenase in adipocytes stimulates oxidative stress and inflammatory signals. Diabetes 55: 2939-2949 (2006)
 34. Yoon BR, Lee YJ, Kim SG, Jang JY, Lee HK, Rhee SK, Hong HD, Choi HS, Lee BY, Lee OH. Antioxidant effect of hot water and ethanol extracts from *Cheonnyuncho* (*Opuntia humifusa*) on reactive oxygen species (ROS) production in 3T3-L1 adipocytes. Korean J. Food Preserv. 19: 443-450 (2012)
 35. Mouche S, Mkaddem SB, Wang W, Katic M, Tseng YH, Carnesecchi S, Steger K, Foti M, Meier CA, Muzzin P, Kahn CR, Ogier-Denis E, Szanto I. Reduced expression of the NADPH oxidase NOX4 is a hallmark of adipocyte differentiation. Biochim. Biophys. Acta. 1773: 1015-1027 (2007)
 36. Hecker PA, Leopold JA, Gupte SA, Recchia FA, Stanley WC. Impact of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency on the pathophysiology of cardiovascular disease. Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 304: H491-500 (2013)
 37. Labreuche J, Touboul PJ, Amarenco P. Plasma triglyceride levels and risk of stroke and carotid atherosclerosis: a systematic review of the epidemiological studies. Atherosclerosis 203: 331-345 (2009)
 38. Cowherd RM, Lyle RE, McGehee RE Jr. Molecular regulation of adipocyte differentiation. Semin. Cell. Dev. Biol. 10: 3-10 (1999)
 39. Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. Nat. Rev. Mol. Cell Bio. 7: 885-896 (2006)
 40. Park MJ. Recent advances in regulating energy homeostasis and obesity. Korean J. Pediatr. 48: 126-137 (2005)
 41. 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)
 42. Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA. The role of *C/EBP* genes in adipocyte differentiation. J. Biol. Chem. 273: 30057-30060 (1998)