

발효올금 주정추출물부터 분리된 에틸아세테이트 분획물에 대한 3T3-L1 세포에서의 지방 형성 억제 효과

김지혜¹ · 박정진^{1,2} · 전우진^{1,2}

¹전남대학교 식품영양과학부

²전남대학교 생활과학연구소

Anti-Obesity Effect of Ethyl Acetate Fraction from 50% Ethanol Extract of Fermented *Curcuma longa* L. in 3T3-L1 Cells

Jihye Kim¹, Jeongjin Park^{1,2}, and Woojin Jun^{1,2}

¹Division of Food and Nutrition and ²Research Institute for Human Ecology, Chonnam National University

ABSTRACT In the present study, we investigated the effect of ethyl acetate fraction from 50% ethanol extract of fermented *Curcuma longa* L. (FCEE) on lipid metabolism in 3T3-L1 cells. The safety range of FCEE was up to 300 µg/mL. Effects of FCEE on lipid accumulation and intracellular triglyceride (TG) content in 3T3-L1 cells were examined by Oil Red O staining and AdipoRed assay. Compared to adipocytes, lipid accumulation and intracellular TG content were significantly reduced by 10.2% and 13.7%, respectively, upon FCEE treatment at a concentration of 200 µg/mL. Glucose uptake by 3T3-L1 cells was significantly reduced by 36.6% compared to adipocytes at a concentration of 200 µg/mL. On day 8, free glycerol release into the culture medium was significantly reduced compared to adipocytes at concentrations of 50, 100, and 200 µg/mL of FCEE. FCEE significantly stimulated RNA expression of AMP-activated protein kinase (AMPK) and suppressed mRNA expressions of sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c), CCAAT/enhancer binding proteins α (C/EBP α), and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in 3T3-L1 cells. These results suggest that FCEE inhibits adipogenesis through activation of AMPK mRNA expressions and inhibition of SREBP-1c, C/EBP α , and PPAR γ mRNA expressions.

Key words: turmeric, fermented *Curcuma longa* L., 3T3-L1, adipogenesis, anti-obesity

서 론

비만은 단순히 체중이 증가하는 것뿐만 아니라 에너지 섭취와 소비의 불균형으로 인해 체내에 지방이 과잉 축적되어 있는 상태를 말하며, 과도한 지방 축적은 당뇨병, 이상지질혈증, 고혈압, 관상동맥질환 등의 만성질환을 유발하는 원인으로 알려져 있다(1,2).

최근 천연물 및 식품소재를 대상으로 체지방 감소 기능성 평가 및 기작 규명에 관한 다양한 연구들이 진행되고 있다. 지방 축적을 위한 세포내 구획은 지방구라 불리며 이는 지방 대사에서 중요한 역할을 한다. 지방구에 축적되는 지질은 중성지방의 합성과 분해의 평형으로 조절된다. 따라서 비만 예방 및 관리에 있어 전지방세포로부터 지방세포로 분화되는 지방 형성 과정을 억제 또는 지연시키는 과정과 지방구 내에 존재하고 있는 중성지방이 분해되고 이로 인한 글리세롤의 유출과정은 중요한 기전으로 알려져 있다. 3T3-L1 전

지방세포는 분화유도물질 처리 후 지방세포로 변화하여 에너지 항상성 유지와 지질대사 조절에 중요한 역할을 하여 항비만 활성의 비교 모델로 널리 사용되고 있다(3). 지방세포 분화 또는 형성 과정에는 다양한 호르몬과 전사 인자들이 관여한다. 분화초기 CCAAT/enhancer-binding proteins β (C/EBP β), C/EBP δ 와 sterol regulatory element binding protein-1c(SREBP-1c)가 발현하고 이는 지방 형성을 가속화시킨다. 또한 후기 전사인자인 C/EBP α 와 peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)의 발현을 증가시킴으로써 전지방세포의 분화를 촉진한다(4,5). 발현된 C/EBP α 와 PPAR γ 는 adipocyte protein 2(aP2), lipoprotein lipase(LPL) 등의 지방합성 유전자 발현을 유도하며, 렙틴, 아디포넥틴과 같은 지방합성 유전자들의 발현을 조절한다(6).

SREBP-1c는 fatty acid synthase(FAS), acyl-CoA carboxylase(ACC) 및 acetyl-CoA carboxylase(ACC)의 발현을 조절하는 지방합성 관련 전사인자로 이는 에너지 항상성 조절을 위한 지방산과 당대사에서 중요한 역할을 한다(7). AMP-activated protein kinase(AMPK)는 지방산합성을 억제하는 동시에 지방산 베타산화를 촉진함으로써 체

Received 4 October 2014; Accepted 16 October 2014

Corresponding author: Woojin Jun, Division of Food and Nutrition, Chonnam National University, Gwangju 550-757, Korea
E-mail: wjjun@chonnam.ac.kr, Phone: +82-62-530-1337

내 에너지 평형을 조절하는 데 주요한 역할을 한다고 알려져 있다(8).

천연물 중 항비만 기능성 소재들로는 키토산, 이눌린, 카테킨, 캡사이신 등이 있으며(9-11), 특히 가르시니아 캄보지아의 주요 성분인 hydroxycitric acid(HCA)는 지방산과 콜레스테롤 생합성에 필요한 두 개의 탄소 이용률을 제한시킴으로써 acetyl-CoA를 줄여준다. HCA를 설치류에 경구 투여하였을 때, 지방조직에서 지방합성을 감소시키며 체중 및 식이섭취량 감소와 체중의 재 증가를 낮추어 준다고 보고되어 있다(12,13).

난대성 작물 중 하나인 울금(*Curcuma longa* L.)은 생강과에 속하는 다년생 초본식물로 인도, 중국, 미얀마 등의 열대지방에서 널리 재배되며, 최근 우리나라 남부지역인 진도군에서 지속적으로 재배되고 있다. 울금은 예로부터 한약재, 향신료, 염료로 사용되어져 왔다. 울금은 울금(乙今), 걸금(乞金), 옥금(玉金), 심황(深黃), 황제족(黃帝足) 등으로 불리며, 주요한 생리활성 성분은 curcumin, demethoxycurcumin 및 bisdemethoxycurcumin으로 알려져 있다(14). 이들은 항염, 간 기능 개선, 항산화, 항암, 콜레스테롤 및 지질저하 효과 등의 약리활성을 나타내는 것으로 보고되어 있다(15-17).

울금의 우수한 생리활성에도 불구하고 특유의 향미, 쓴맛, 이취로 인해 기능성 소재로 이용하는 데 어려움이 있어, 쓴맛과 이취를 줄이기 위해 *Aspergillus oryzae*를 이용하여 발효과정을 거쳐 발효울금을 제조하였다(18). 본 연구에서는 선행된 발효울금 50% 주정 추출물을 분획하여 활성을 나타낸 에틸아세테이트 층을 대상으로 3T3-L1 지방세포 분화과정 중의 영향과 기전을 통해 지방 형성 억제 효과를 보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 분획물의 제조

본 연구에서 사용된 발효울금은 전라남도 진도군에서 재배 수확된 울금을 세척·멸균한 후, 2% *Aspergillus oryzae*를 접종 발효하여 실험에 이용하였다. 발효울금은 추출기(Kyungseo machine, Incheon, Korea)에 50% 주정을 투입하고 85°C에서 4시간 0.7~0.75 kg/cm²의 압력 조건에서 추출하여 동결분말 후 분쇄(Hanil, Incheon, Korea)하여 한국인스팜(주)(Jeonnam, Korea)로부터 제공받았다(FCE 50). FCE50은 에틸아세테이트 용매를 이용하여 분획한 후, 감압 농축(EYELA, Tokyo, Japan)시켜 에틸아세테이트 분획물(FCEE)을 획득하였고(수율 3.0%) 이 분획물은 -20°C에서 보관하면서 실험에 이용하였다.

시약

3T3-L1 전지방세포는 ATCC(American Type Culture Collection, Manassans, VA, USA)에서 구입하였으며, 분

화에 사용되는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지와 newborn calf serum(NCS), fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin(PS), phosphate buffered saline(PBS)은 Hyclone사(Logan, UT, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 지방세포 분화에 사용되는 insulin, 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx), dexamethasone(DEX) 및 Oil Red O, XTT, 유리 글리세롤 시약과 유리 글리세롤 표준용액은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. AdipoRed™는 Lonza사(Walkersville, MD, USA), 2-NBDG는 Life Technologies사(Eugene, OR, USA)에서 구입하여 사용하였다.

3T3-L1 세포 배양 및 분화

3T3-L1 전지방세포의 배양과 유지는 10% NCS와 1% PS가 함유된 DMEM 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂의 조건에서 세포성장이 이루어졌을 때 계대배양을 하도록 하였다. 세포의 분화는 6-well plate에 well당 1×10⁶ 세포를 분주하여 세포가 100% 밀집되게 배양하였다. 2일 후 10% FBS, 1% 페니실린과 분화유도물질(0.5 mM IBMx, 0.5 μM DEX, 10 μg/mL insulin)이 들어있는 DMEM 배지를 이틀 동안 처리하고, 다시 10% FBS와 10 μg/mL 인슐린을 포함한 DMEM 배지를 처리하였다. 그 이후에는 10% FBS를 포함한 DMEM 배지로 교체하여 지방세포 분화를 유도하였다(19). 지방세포 분화유도 동안 시료를 처리하지 않은 군을 지방세포군으로 명명하였으며, 시료 FCEE는 50, 100, 그리고 200 μg/mL의 농도로 전지방세포의 분화 동안 처리하였다.

세포독성

3T3-L1 세포에 대한 FCEE의 세포독성은 XTT 시약을 이용하여 측정하였다. 3T3-L1 전지방세포는 24-well plate에 well당 5×10⁴ 세포를 분주하여 세포가 100% 밀집되게 배양하였다. 3T3-L1 전지방세포에서 지방세포로 분화하는 동안 각 농도의 FCEE를 처리하여 총 8일간 분화를 유도하였다. 8일째에 PBS에 100 μM phenazine methosulfate (PMS)와 1 mg/mL XTT(PMS : XTT=1:800) 시약을 혼합한 반응액을 각 well당 1 mL씩 분주하고 2시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 후 microplate reader(BioTek, Winooski, VT, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Oil Red O 염색법을 이용한 지방 축적 억제 효과

FCEE 처리에 의한 3T3-L1 지방세포의 지방 축적량을 측정하고자 8일 동안 분화된 3T3-L1 세포의 배양액을 제거한 후 PBS로 세척하고, 10% 포름알데히드를 첨가하여 1시간 이상 실온에 방치했다. 포름알데히드를 제거한 후 60% 이소프로판올 용액 2.4 mL를 넣어 세척하였다. 세포를 완전히 건조한 후 미리 제조해 놓은 Oil Red O 실험용액(Oil Red O : 증류수=6:4)으로 실온에서 20분간 지방구를 충분히 염

색하였다. Oil Red O 실험용액을 제거한 후 증류수로 3회 세척하고 완전히 건조하였다. 세포내 축적된 지방성분과 결합된 Oil Red O는 100% 이소프로판올로 30분 동안 용출시킨 후 microplate reader를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

AdipoRed를 이용한 세포내 중성지방 측정

세포내 중성지방 함량은 AdipoRed 시약에 지시되어 있는 정량법에 따라 수행하였다. 이 방법은 Nile Red 염색법으로 중성지방에 특이성이 높은 것으로 알려져 있다(20). 지방 세포 분화 동안 각 농도별로 FCEE를 처리하여 분화된 지방 세포에 대하여 배양액을 제거한 후 PBS로 2회 세척 후 동 용액을 5 mL를 분주하고, 140 µL의 AdipoRed 시약을 첨가하여 10분간 37°C 배양기에서 배양하고 microplate reader를 이용하여 excitation 485 nm와 emission 572 nm에서 형광도를 측정하였다.

포도당 유입 및 글리세롤 방출량 측정

포도당 유입량을 측정하기 위하여 8일간 분화된 3T3-L1 지방세포의 배양액을 제거한 후 PBS로 2번 세척하고 2-NBDG 실험용액을 처리하였다. 이후 37°C 배양기에서 1시간 동안 반응시키고 차가운 PBS로 3번 세척한 후, well 당 1 mL의 PBS를 넣은 후 excitation 485 nm, emission 535 nm에서 형광도를 측정하였다. 3T3-L1 지방세포의 글리세롤 방출량은 8일째 수득한 배양액 50 µL에 유리 글리세롤 시약을 50 µL 혼합하여 37°C에서 10분간 처리한 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 이용하여 그 함량을 계산하였다.

실시간 중합효소 연쇄반응

8일간 분화된 3T3-L1 세포를 PBS로 2회 세척한 후 세포를 수득하여 Trizol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)과 클로로포름을 넣고 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액과 이소프로판올을 섞은 후 상온에서 10분간 반응시켜 RNA를 침전시킨 후 에탄올로 1회 세척하여 RNA를 분리하였다. 추출된 RNA 1 mg을 QuantiFast™SYBR®Green RT-PCR kit(Qiagen, catalogue number 204174, Venlo, Netherlands)를 이용하여 GAPDH(5'-TGGCCTCCAAGGAGTAAGAAAC-3', 3'-GGCC TCTCTCTT-GCTCTCAGTATC-5'), AMPK(5'-TCCCAAGTTCTTCACGTTCA-3', 3'-CAGGCT-CCAAGTGGCGATAA-5'), C/EBP(5'-CTGCGAGCAC-GAGACGTCTA-3', 3'-GCCAGGAAGTTCGTCGTTGAA-5'), PPARγ(5'-TGACTTGCCATATTTATAGCT-GTCA-3', 3'-CGATGGGCTTACGTTTCAG-5')와 SREBP-1c(5'-CCAGAGGGTGAG-CCTGACAA-3', 3'-AGCCTC-TGCAATTTCCAGATCT-5') 프라이머와 함께 reverse transcription 반응을 55°C에서 10분 수행한 후, PCR ini-

tial activation 반응을 95°C에서 5분 수행하고 denaturation 반응을 95°C에서 5초, annealing과 extention 반응을 60°C에서 10초간 40 cycle을 반응시키고 Rotor-gene 6000 software version 1.7(Corbett, Sydney, Australia)을 이용하여 분석하였다.

통계처리

실험결과는 평균(mean)±표준편차(SD) 및 평균(mean)±표준오차(SE)로 나타내었다. 각 군 간의 결과 비교 및 유의성 검정은 Student t-test를 이용하여 통계처리한 후 P<0.05 수준에서 유의수준을 검정하였다.

결과 및 고찰

발효율금 분획물의 세포독성

3T3-L1 세포 분화과정 중 FCEE를 다양한 농도로 처리하여 분화 8일째에 XTT 방법으로 세포독성을 측정하였다. 선행연구에서 확인된 발효율금 50% 주정추출물의 독성 범위인 400 µg/mL의 농도에 기초하여 FCEE를 50~300 µg/mL의 농도로 처리한 후 세포생존 정도를 측정한 결과 300 µg/mL부터 유의적으로 세포 성장과 분화에 영향을 나타내었다(Fig. 1). 따라서 이후의 모든 실험에서는 50, 100 및 200 µg/mL의 안전한 분획물 농도에서 연구를 수행하였다. FCEE의 세포독성 결과를 다른 천연물 또는 식품소재의 분획물을 연구한 보고(21,22)와 비교해볼 때 안전 범위가 넓게 나타나고 있어 세포독성이 상대적으로 낮은 것으로 사료된다.

발효율금 분획물의 지방 축적 억제 효과

FCEE 처리에 의한 3T3-L1 세포의 분화과정 중 지방구의 생성 억제 유무를 Oil Red O 염색법을 이용하여 측정하였다. Oil Red O 염색시약은 중성지질, 콜레스테롤 등과 결합

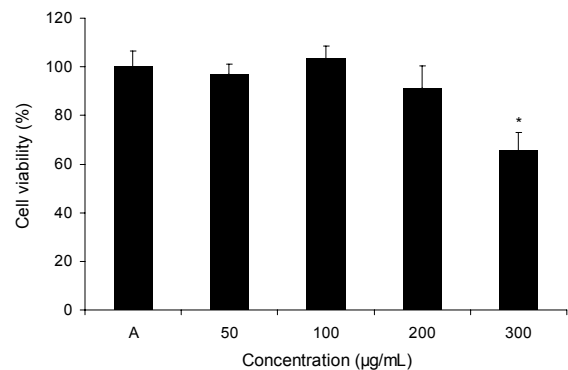


Fig. 1. Effect of ethyl acetate fraction from 50% ethanol extract of fermented *Curcuma longa* L. on cell viability in 3T3-L1 cells. Cell viability was determined by XTT assay. Each value is expressed as the mean±SD of three independent experiments. An asterisk above the bar is significantly different from adipocytes, P<0.05. A: adipocyte.

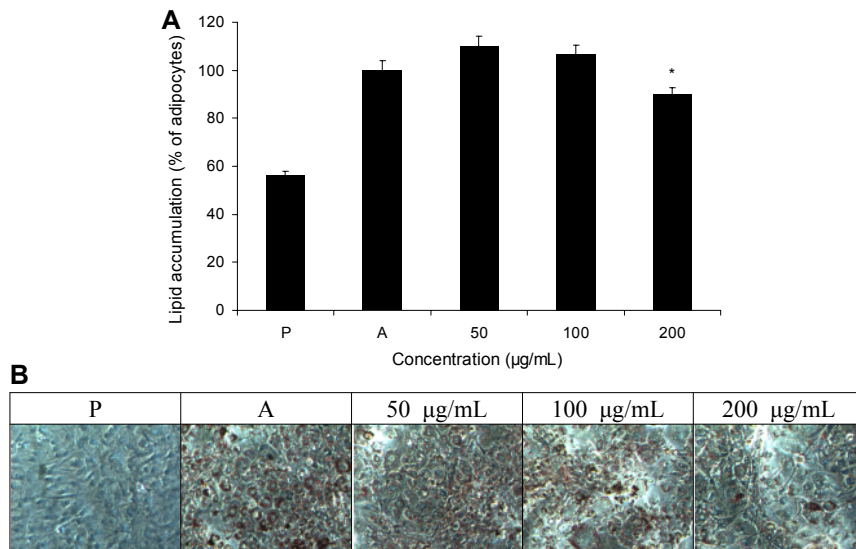


Fig. 2. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from 50% ethanol extract of fermented *Curcuma longa* L. on lipid accumulation in 3T3-L1 cells. The lipid accumulation was quantified by Oil Red O staining and calculated as relative values versus untreated control cells. Data express the mean±SD of three independent experiments. An asterisk above the bar is significantly different from adipocytes, $P < 0.05$. P: preadipocyte, A: adipocyte. (A) lipid levels were measured colorimetrically using a spectrophotometer. (B) Cells were observed using microscope (magnification $\times 100$).

하며, 지방분화로 인해 축적된 대부분의 지질은 중성지방으로 염색된 세포의 붉은색 정도를 통해 분화 정도를 확인할 수 있다(23). 완전히 분화된 지방세포(100%)와 비교하였을 때, FCEE 50 및 100 µg/mL를 처리한 군에서는 지방 축적이 유의적으로 감소하지 않았으나, 200 µg/mL의 농도를 처리한 군에서는 지방 축적이 10.2% 유의적으로 감소함으로써 지방구 생성 억제효과가 있음을 확인하였다(Fig. 2A). 또한 염색된 지방구를 현미경으로 관찰한 결과, 전지방세포와 비교하여 지방세포가 분화된 것을 확인할 수 있었으며, 분화가 유도된 지방세포와 비교하여 FCEE 200 µg/mL를 처리한 군에서는 지방구 염색율이 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). 이와 같은 결과는 Shon과 Kim(24)이 보고한 3T3-L1 전지방세포를 분화시키는 동안 시료를 처리하고 Oil Red O 염색법을 실시한 결과 지방 축적이 억제됨으로써 시료가 지방세포 분화를 억제한다는 결과와 일치하였으며, Park 등(22)의 연구 결과와도 일치했다.

발효율금 분획물의 세포내 중성지방 축적 억제 효과

지방구 감소의 확인을 위하여 AdipoRed 형광염색법을 이용하여 세포내 중성지방을 측정하였다. Oil Red O 염색 결과와 동일하게 FCEE 200 µg/mL 농도에서 지방구 내의 중성지방 함량이 13.7% 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 3). 따라서 FCEE는 3T3-L1 지방세포의 분화 유도과정에서 지방구의 생성을 억제하고, 지방 축적이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. Seo 등(25)은 지방세포로의 분화 과정 동안 시료에 의한 중성지방 축적량을 측정한 결과 시료를 처리한 군에서 완전 분화된 지방세포와 비교하여 그 축적량이 감소하는 결과를 보고하였다. 이는 본 연구의 결과와 일치한다.

발효율금 분획물의 포도당 유입 억제 효과

지방세포의 분화 시 유입되는 포도당이 중성지방으로 합

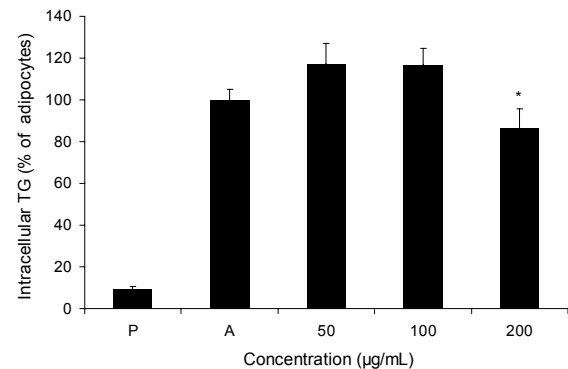


Fig. 3. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from 50% ethanol extract of fermented *Curcuma longa* L. on intracellular triglycerides in 3T3-L1 cells. The intracellular triglyceride content was fluorescently quantified by AdipoRed™ assay kit. Each value is expressed as the mean±SD of three independent experiments. An asterisk above the bar is significantly different from adipocytes, $P < 0.05$. P: preadipocyte, A: adipocyte.

성, 축적되므로 FCEE가 지방세포 분화 억제에 미치는 영향을 확인하기 위하여 세포내 포도당 유입량과 세포배양액으로 방출되는 유리 글리세롤 양을 측정하였다. Glucose transport 4(GLUT4)는 지방세포와 근육세포에서 주로 존재하는 포도당 수용체이며, 인슐린의 작용으로 세포 내로부터 세포막에 포도당 수송을 원활하게 하고 포도당 유입을 조절한다(26). 지방세포로 유입된 포도당은 해당과정을 통해 glyceraldehyde-3-phosphate와 dihydroxyacetone-phosphate를 거쳐 글리세롤로 전환되고, 지방산과 결합하여 중성지방을 생성하게 된다. 그러므로 지방세포 내로 포도당의 유입은 지방세포 내 지방의 축적에 중요한 역할을 한다고 볼 수 있다(27). 본 연구에서는 3T3-L1 지방세포의 분화 동안 FCEE를 처리함으로써 FCEE가 지방세포의 분화와 지방 축적에 미치는 영향을 확인하고자 포도당 유입량을 측정하였다. 그 결과 FCEE를 200 µg/mL의 농도로 처리했을

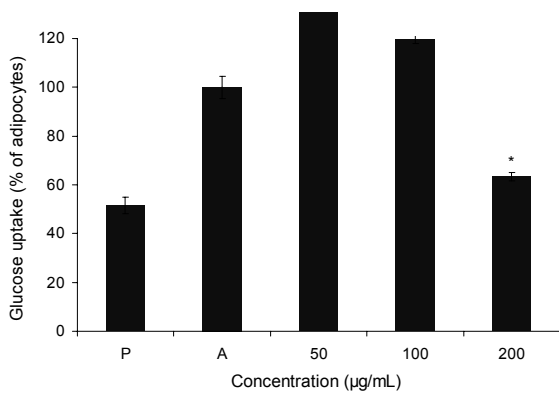


Fig. 4. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from 50% ethanol extract of fermented *Curcuma longa* L. on glucose uptake in 3T3-L1 cells. The glucose uptake was fluorescently quantified by 2-NBDG assay kit. Each value is expressed as the mean±SD of three independent experiments. An asterisk above the bar is significantly different from adipocytes, $P<0.05$. P: preadipocyte, A: adipocyte.

때 포도당 유입량이 지방세포와 비교하여 36.6% 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 4). Kang 등(28)의 연구에서는 세포내 포도당 유입량이 시료에 의하여 농도 의존적으로 유의하게 감소하는 결과를 보였으며, 이와 관련된 지방 형성 유전자의 발현량을 측정된 결과 그 발현량이 감소하는 결과를 제시하였다. 이러한 결과를 토대로 FCEE의 지방 합성 억제 효과는 일정부분 포도당이 지방세포 내로 유입되는 것을 억제하는 데 기인하는 것으로 볼 수 있다.

발효율금 분획물이 유리 글리세롤 방출에 미치는 영향

지방구내 중성지방의 분해와 유리 글리세롤의 배출은 에너지 항상성의 조절에 중요하다. 중성지방의 분해는 지방구 표면에 있는 perilipin A 단백질의 보호에 의하여 매우 적게 일어난다(29). 그러나 인슐린과 에피네프린 등의 호르몬 조절을 통해 protein kinase A(PKA)가 활성화되면, 이는 perilipin A와 hormone-sensitive lipase(HSL)를 인산화시켜 HSL이 지방구 표면으로 이동하고 perilipin A의 역할이 완화된 후 지방구 표면의 구조적 변화가 일어난다(20). 이후 adipose triglyceride lipase(ATGL)와 HSL의 작용에 의하여 지방으로부터 분해된 유리 지방산과 글리세롤은 에너지를 생산하거나 세포 신호전달과 지방 합성에 이용된다(30). 그러므로 3T3-L1 지방세포에서 유리된 글리세롤의 함량을 통해 지방구내 중성지방의 분해 정도를 간접적으로 확인할 수 있다. 본 연구에서는 FCEE를 처리한 결과 8일째에 수득한 배양액에서는 50, 100 및 200 µg/mL의 농도에서 모두 유의적으로 유리 글리세롤 방출량이 지방세포에 비하여 21.4%, 16.8% 그리고 57.9% 감소하는 것을 확인할 수 있다(Fig. 5). 특히 FCEE 200 µg/mL를 처리한 군에서 그 방출량이 크게 감소하였다. 지방 분해와 관련된 다른 연구에서는 시료 처리를 통해 유리 글리세롤 방출량이 증가하는 것으로 보고되었지만(27,31), 본 연구에서는 FCEE를 처리

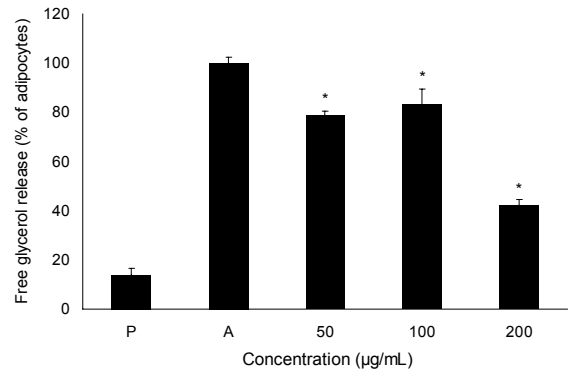


Fig. 5. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from 50% ethanol extract of fermented *Curcuma longa* L. on free glycerol release in 3T3-L1 cells. Each value is expressed as the mean±SD of three independent experiments. Asterisks above the bar are significantly different from adipocytes, $P<0.05$. P: preadipocyte, A: adipocyte.

함으로써 유리 글리세롤의 함량이 감소하는 것으로 확인되었다. 이는 지방세포의 분화과정 중에 FCEE의 처리로 분화가 억제되어 지방구의 형성이 억제되고, 배양액으로 배출되는 유리 글리세롤의 총량이 감소한 것으로 사료된다.

발효율금 분획물이 지방 합성 유전자에 미치는 영향

FCEE에 의한 지방 축적 감소가 지방 형성과 주요하게 관련된 전사인자들의 발현 억제로부터 유도되는지를 조사하기 위하여 각 농도별로 시료를 3T3-L1 전지방세포의 분화 동안 처리한 후, 지방형성 관련 전사인자로 AMPK, SREBP-1c, C/EBPα와 PPARγ mRNA 발현량을 확인하였다. 전지방세포에서 지방세포로의 분화는 다양한 호르몬과 분화 유도인자들의 작용으로 일어나며 세포내에 지방을 축적한다. 분화 초기에 발현되는 SREBP-1c와 C/EBP-β, -δ는 지방 형성을 가속화시키며, 후기 전사인자인 C/EBPα와 PPARγ의 발현 유도에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 또한 SREBP-1c는 LPL, ACC, stearoyl-CoA desaturase-1(SCD-1) 등을 포함한 다수의 지방 형성 유전자의 발현을 촉진시킨다. 발현된 C/EBPα와 PPARγ는 aP2와 FAS 등의 지방 형성 유전자를 발현시켜 지방 형성 과정을 촉진시킨다(6). AMPK는 ATP 농도 조절을 위한 대사적 센서로 작용하며, 에너지 항상성을 조절하는 주요한 역할을 한다. AMPK는 인산화를 통해 활성화되어 SREBP-1c와 PPARγ의 발현을 억제하고 FAS와 같은 지방 형성 효소의 발현을 억제함으로써 지방 생성을 억제시키며, ACC의 억제와 carnitine palmitoyltransferase-1(CPT-1)의 활성을 통해 지방산 베타산화를 촉진시킨다(8). 본 연구에서는 FCEE가 AMPK와 SREBP-1c 및 지방 형성의 주요 인자인 C/EBPα와 PPARγ의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 실시간 중합효소 연쇄반응을 실시하여 그 mRNA 발현 정도를 비교하였다. AMPK의 경우 완전 분화된 지방세포와

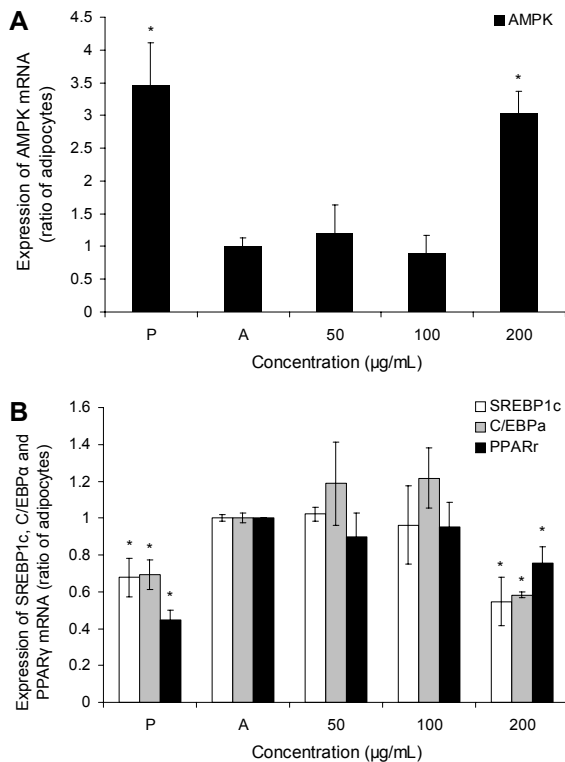


Fig. 6. Effect of ethyl acetate fraction from 50% ethanol extract of fermented *Curcuma longa* L. on mRNA expressions of adipogenesis-related genes in 3T3-L1 cells. The values were calculated as the relative mRNA expression versus GAPDH as an internal control. Each value is expressed as the mean±SE of three independent experiments. Asterisks above the bar are significantly different from adipocytes, $P < 0.05$. P: preadipocyte, A: adipocyte. (A) The mRNA expression of AMPK, (B) The mRNA expressions of SREBP-1c, and C/EBP α , and PPAR γ .

비교하여 FCEE 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 mRNA 발현량이 3배 증가하였다(Fig. 6A). 반면에 SREBP-1c, C/EBP α 와 PPAR γ 의 경우, 완전 분화된 지방세포와 비교하여 FCEE 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 mRNA 발현량이 각각 0.6, 0.6 및 0.8배 감소하였다(Fig. 6B). Kim 등(32)에 의하면 지방세포 분화는 지방 형성 관련 효소와 전사인자들의 상호작용으로 조절되고, 세포내 AMP/ATP 비율의 농도가 증가함에 따라 활성화된 AMPK는 SREBP-1c의 발현을 억제함으로써 이후 지방 형성을 억제한다고 보고하였다. 또한 Kang 등(33)의 연구에 따르면 시료가 AMPK의 발현을 활성화하여 SREBP-1c, C/EBP α 와 PPAR γ 의 활성을 억제함으로써 지방세포의 분화를 억제하였다. 이외에도 본 연구 결과는 지방 형성 유전자의 발현 억제를 통한 지방세포 분화 억제를 제시한 You와 Jun(21), Shon과 Kim(24) 그리고 Lee 등(34)의 연구 결과와 일치한다. 본 연구의 결과를 통해 FCEE에 의하여 AMPK의 활성이 증가됨으로써 SREBP-1c의 발현이 감소되고 SREBP-1c의 타겟유전자이며 지방형성 과정에 주요 인자인 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현이 억제되는 것을 알 수 있는데, 이는 3T3-L1 전지방세포에서 지방세포로의 분

화 억제를 이끌어 세포내 중성지방의 축적이 감소되는 것으로 판단된다.

요 약

FCEE를 3T3-L1 전지방세포의 분화과정 중에 처리한 후, FCEE가 지방의 축적에 미치는 영향을 확인하였다. FCEE (200 $\mu\text{g/mL}$)를 세포에 처리한 후 Oil Red O 염색법과 AdipoRed 형광염색법을 이용한 지방 축적과 세포내 중성지방 함량을 측정된 결과, 무처리한 지방세포와 비교하여 각각 10.2%, 13.7% 유의하게 감소하는 것을 확인하였다. 이러한 결과에 대한 기작을 확인하고자 포도당 유입량과 유리 글리세롤 방출량을 측정하였다. FCEE(200 $\mu\text{g/mL}$) 처리 시 지방세포와 비교하여 포도당 유입량이 36.6% 유의적으로 감소하였으며, 유리 글리세롤 방출량도 8일째에 유의적으로 감소하였다. 이는 지방세포의 분화과정 중에 FCEE의 처리로 분화가 억제되어 지방구의 형성이 억제되고 배양액으로 배출되는 유리 글리세롤의 총량이 감소한 것으로 판단된다. 이러한 결과가 지방세포 분화의 억제에 의한 것인지 판단하기 위해 지방 형성 관련인자의 mRNA 발현량을 측정하였다. FCEE(200 $\mu\text{g/mL}$)의 처리로 AMPK mRNA 발현량은 지방세포와 비교하여 3배 증가하였으며, SREBP-1c, C/EBP α 와 PPAR γ mRNA 발현량은 각각 0.6, 0.6 및 0.8배 감소하는 것을 확인하였다. 이상의 결과들로부터 FCEE는 지방 합성을 억제하는 활성을 보유하고 있는 바, 향후 항비만 기능성 식품소재로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 기술사업화지원사업(20114007)의 지원을 받아 수행된 연구 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Visscher TL, Seidell JC. 2001. The public health impact of obesity. *Annu Rev Public Health* 22: 355-375.
- No JK. 2012. The effective diet for obesity through preventive silent inflammation. *Kor J Aesthet Cosmetol* 10: 1-6.
- Ntambi JM, Kim YC. 2000. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 130: 3122S-3126S.
- Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA. 1998. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 273: 30057-30060.
- Rosen ED, Hsu CH, Wang S, Sakai X, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. 2002. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR: a unified pathway. *Genes Dev* 16: 22-26.
- White UA, Stephens JM. 2010. Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 318: 10-14.
- Kolehmainen M, Vidal H, Alhava E, Uusitupa MI. 2001. Sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c) expression in human obesity. *Obes Res* 9: 706-712.

8. Kohjima M, Higuchi N, Kato M. 2008. SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 21: 507-511.
9. Kong CS, Kim JA, Bak SS, Byun HG, Kim SK. 2010. Anti-obesity effect of carboxymethyl chitin by AMPK and aquaporin-7 pathways in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr Biochem* 22: 276-281.
10. Delzenne NM, Cani PD, Daubioul C, Neyrinck AM. 2005. Impact of inulin and oligofructose on gastrointestinal peptides. *Br J Nutr* 93: S157-S161.
11. Rhee SJ, Kim KR, Kim HT, Hong JH. 2007. Effects of catechin on lipid composition and adipose tissue in obese rats fed high fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 540-547.
12. Leonhardt M, Munch S, Westertep-Plantenga M, Langhans W. 2004. Effects of hydroxycitrate, conjugated linoleic acid, and guar gum on food intake, body weight regain, and metabolism after body weight loss in male rats. *Nutr Res* 24: 659-669.
13. Sugde MC, Watts DI, Marshall CE, McCormack JG. 1982. Brown-adipose tissue lipogenesis in starvation: effects of insulin and (-)-hydroxycitrate. *Biosci Rep* 2: 289-297.
14. Lee KJ, Ma JY, Kim YS. 2012. Identification of curcuminoids from turmeric (*Curcuma longa*) using ultrasonic wave and dipping method. *Korean Soc Biotechnol Bioeng J* 27: 33-39.
15. An BJ, Lee JY, Park TS, Pyeon JR, Bae HJ, Song MA, Baek EJ, Park JM, Son JH, Lee CE, Choi KI. 2006. Antioxidant activity and whitening effect of extraction conditions in *Curcuma longa* L. *Korean J Med Crop Sci* 14: 168-172.
16. Liu K, Zhang D, Chojnacki J, Du Y, Fu H, Grant S, Zhang S. 2013. Design and biological characterization of hybrid compounds of curcumin and thalidomide for multiple myeloma. *Org Biomol Chem* 11: 4757-4763.
17. Chai H, Yan S, Lin P, Lumsden AB, Yao Q, Chen C. 2005. Curcumin blocks HIV protease inhibitor ritonavir-induced vascular dysfunction in porcine coronary arteries. *J Am Coll Surg* 200: 820-830.
18. Kim Y, You Y, Jun W. 2012. Hepatoprotective activity of fermented *Curcuma longa* L. on galactosamine-intoxicated rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 790-795.
19. Park JJ, Lee J, Hwang JT, Park IJ, Shin JI, Lee YK, Lee SK, Bail HW, Ha JH, Park OJ. 2005. Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 694-699.
20. Clifford GM, Londos C, Kraemer FB, Vernon RG, Yeaman SJ. 2000. Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J Biol Chem* 275: 5011-5015.
21. You Y, Jun W. 2012. Effects of Fractions from *Benincasa hispida* on inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 895-900.
22. Park J, Lee J, Jun W. 2013. Radical scavenging and anti-obesity effects of various extracts from turmeric (*Curcuma longa* L.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1908-1914.
23. McNeel RL, Mersmann HJ. 2003. Effects of isomers of conjugated linoleic acid on porcine adipocyte growth and differentiation. *J Nutr Biochem* 14: 266-274.
24. Shon MS, Kim GN. 2014. Anti-oxidant and anti-obese activities of turmeric (*Curcuma longa* L.) extract in 3T3-L1 cells. *Korean J Aesthet Cosmetol* 12: 169-175.
25. Seo JG, Park SW, Choe SS, Jeong HW, Park JY, Choi EW, Seen DS, Jeong JY, Lee TG. 2012. Foenuloside B from *Lysimachia foenum-graecum* inhibits adipocyte differentiation and obesity induced by high-fat diet. *Biochem Biophys Res Commun* 417: 800-806.
26. Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA. 1996. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem* 271: 31372-31378.
27. Cha SY, Jang JY, Lee YH, Lee G, Lee HJ, Hwang KT, Kim Y, Jun W, Lee JM. 2010. Lipolytic effect of methanol extracts from *Luffa cylindrica* in mature 3T3-L1 adipocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 813-819.
28. Kang SI, Kim MH, Shin HS, Kim HM, Hong YS, Park JG, Ko HC, Lee NH, Chung WS, Kim SJ. 2010. A water-soluble extract of *Petalonia binghamiae* inhibits the expression of adipogenic regulators in 3T3-L1 preadipocytes and reduces adiposity and weight gain in rats fed a high-fat diet. *J Nutr Biochem* 21: 1251-1257.
29. Lee J, Yoon HG, Lee YH, Park J, You Y, 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.
30. Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, Gorkiewicz G, Meyer C, Rozman J, Heldmaier G, Maier R, Theussl C, Eder S, Kretky D, Wanger EF, Kklingspor M, Hoefler G, Zechner R. 2006. Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* 312: 734-737.
31. Lee J, Jun W. 2009. Methanolic extract of turmeric (*Curcuma longa* L.) enhanced the lipolysis by up-regulation of lipase mRNA expression in differentiated 3T3-L1 adipocytes. *Food Sci Biotechnol* 18: 1500-1504.
32. Kim EJ, Lee DH, Kim HJ, Lee SJ, Ban GO, Cho MC, Jeong HS, Yang Y, Hong JT, Youn DY. 2012. Thiocremone, a sulfur compound isolated from garlic, attenuates lipid accumulation partially mediated via AMPK activation in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr Biochem* 23: 1552-1558.
33. Kang SW, Kang SI, Shin HS, Yoon SA, Kim JH, Ko HC, Kim SJ. 2013. *Sasa quelpaertensis* Nakai extract and its constituent *p*-coumaric acid inhibit adipogenesis in 3T3-L1 cells through activation of the AMPK pathway. *Food Chem Toxicol* 59: 380-385.
34. Lee JA, Ahn EK, Hong SS, Oh JS. 2012. Anti-obesity effect of ethyl acetate extracts from *Agrimonia pilosa* Ledeb. in 3T3-L1 preadipocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 161-167.