

## Antiadipogenic Effects of Red Radish (*Raphanus sativus* L.) Sprout Extract in 3T3-L1 Preadipocytes

Da Hye Kim<sup>1</sup>, Sang Jun Kim<sup>1</sup>, Seung-Il Jeong<sup>1</sup>, Chun Jin Cheon<sup>2</sup> and Seon-Young Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Jeonju Biomaterials Institute, Jeonju, Jeonbuk 560-360, Korea

<sup>2</sup>Aenong Association, Jinan, Jeonbuk 567-807, Korea

Received August 12, 2014 / Revised October 29, 2014 / Accepted November 17, 2014

The red radish (*Raphanus sativus* L.; RR) sprout is a plant of the cruciferous family. In this study, we elucidated the effect of the water extract of RR sprout (RRSE) against  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, and pancreatic lipase enzyme activity and adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes.  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, and pancreatic lipase enzyme activity was inhibited in a concentration-dependent manner by RRSE treatment. RRSE also abolished adipocyte differentiation and lipid and triglyceride accumulation without cytotoxicity in 3T3-L1 adipocytes. In addition, RRSE modulated the expression of the proteins related to adipogenic transcription factors: peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\gamma$ , sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1), and CCAT/enhancer binding protein (C/EBP) $\alpha$ . RRSE also suppressed expression of the proteins responsible for lipid synthesis, transport, and storage: adiponectin, fatty acid synthesis (FAS), perilipin, and fatty acid binding protein-4 (FABP4). This study showed that RRSE treatment has the potential to inhibit obesity by controlling the expression of adipogenic transcription factors and adipogenic proteins.

**Key words** : Adipogenesis, lipase activity, lipid accumulation, obesity, red radish sprout

### 서 론

식생활의 서구화로 인해 비만인구는 전 세계적으로 폭발적인 증가를 보이고 있다. 일반적으로 체질량지수(BMI) 25 이상을 과체중, 30 이상이면 비만으로 정의하지만 일본이나 우리나라의 경우에는 25 이상을 비만으로 정의하고 있다. 이 기준을 적용할 경우 2012년 국민 건강 영양 조사 결과에 의하면 한국에서 성인 3명중 1명이 비만이다. 1980년과 2013년 사이 비만과 과체중은 성인에서 28%, 아동에서 47%까지 증가되었고, 1980년 BMI 25 이상인 인구의 수가 8억 5,700만 명에 달했던데 비해 2013년에는 21억 명까지 증가했다[19]. 비만은 고혈압, 고지혈증, 당뇨병, 심혈관질환, 호흡기계통의 질환(천식), 근골격계통의 질환(관절염), 기타 암을 포함하는 여러 가지 건강상 문제의 위험인자로 알려져 있다.

비만은 지방전구세포의 분화 및 지방생성 과정에 의하여 지방세포의 세포내 중성지방(triglyceride, TG)의 축적으로 발생하며 이러한 지방생성기전을 조절하는 것이 비만 억제에 효과적인 치료방법으로 알려져 있다[5, 7]. Pancreatic lipase는

co-lipase와 함께 triglyceride를 2-monoacylglycerol과 fatty acid로 분해한다. Pancreatic lipase 억제시 triglyceride는 intestine에서 흡수되지 않고 체외로 배출된다. 대표적인 pancreatic lipase 저해제는 현재 비만 치료제로 시판중인 lipstatin 유도체인 tetrahydropipstatin (Orlistat)로서 lipase inhibitor로서는 가장 우수하지만 위장장애, 과민증, 담즙분비장애, 지용성 비타민 흡수억제 등의 부작용이 있다[7, 8].

비만의 발생은 지방전구 세포의 분화 및 adipogenesis 과정에 의하여 지방세포내의 triglyceride 축적으로 발생되며, 지방세포의 형성 과정에 관여하는 주요 전사인자로는 CCAAT-enhancer-binding protein  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ )와 peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )가 있다[3, 21]. C/EBP $\alpha$ 는 preadipocytes의 mitosis를 억제하는 것으로 알려져 있고, PPAR $\gamma$ 는 preadipocytes는 물론 myoblasts, C3H10T1/2 stem cells의 adipocyte differentiation을 유발하는 것으로 알려져 있다[3, 4, 16]. PPAR $\gamma$ 와 직접 혹은 간접적으로 상호작용하는 또 다른 전사인자로서 Adipocyte determination and differentiation-dependent factor 1/sterol response element binding protein 1 (ADD1/SREBP1)은 지방세포내의 지방합성을 촉진시키는 유전자이다[22]. SREBP1c는 지방과 간 조직의 fatty acid와 cholesterol 대사에 매우 중요한 역할을 가지는 전사인자이며 지방세포에서 PPAR $\gamma$ 의 발현을 유도하고 PPAR $\gamma$ 의 ligand-binding domain의 활성화와 ligand 생산을 촉진시킨다[9, 14]. 이들 전사인자들은 지방세포의 분화 시 발현되어 상호작용을 통해 adiponectin, fatty acid synthetase (FAS),

#### \*Corresponding author

Tel : +82-63-711-1053, Fax : +82-63-711-1051

E-mail : seon02@jbmi.re.kr

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.

perilipin, fatty acid binding protein 4 (FABP4) 등의 지방분화 마커 유전자들의 발현을 증가시킨다[1].

새싹 채소는 성체에 비해서 비타민, 무기질, 미네랄, 효소 등 유용 영양소가 풍부한 것으로 알려져 있다. 그 중에서 브로커리 새싹은 항암물질인 sulforaphane의 함량이 성체에 비해 50배 이상, vitamin A는 40배 이상, 녹두 새싹은 씨앗에는 없는 vitamin C가 13.2 mg/100 g을 함유하고, vitamin B군은 발아 시작 후 4~16배 증가한다고 알려져 있다[6]. 적무(red radish, *Raphanus sativus* L.)는 십자화과 식물로 씨앗은 밝은 갈색의 둥근 모양이다. 적무의 새싹은 일반 무 새싹과 달리 줄기가 붉은 색을 띤다. 줄기의 배측색에 따라 적무(red), 홍무(pink), 적양무(violet)로 구분된다. 적무는 항산화효능이 우수한 것으로 알려져 있다. 주성분으로는 적무의 색소성분인 pelargonidin-type anthocyanins과 phenol성 compounds, phenolic acids 함량이 높고 kaempferol 같은 flavonoids 성분에 대해 보고되었다[15]. 지금까지 적무 새싹의 효능은 연구된 바 없고 무 새싹의 항산화 활성과 주요성분에 대한 결과가 보고된 바 있다[23].

본 연구에서는 적무 새싹 추출물이 pancreatic lipase와  $\alpha$ -glucosidase 활성을 저해하고, 3T3-L1 지방 전구세포에서 중성 지방 축적과 지방생성에 대한 억제 효능을 확인하였다. 이는 adipogenic transcription factor의 조절에 의한 결과임을 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 추출물 제조

실험에 사용한 적무 새싹(red radish sprout, RRS)은 전라북도 진안군 진안읍 영농조합법인 애농으로부터 공급받았다. 건조된 새싹은 분말화한 뒤 10 g을 칭량하여 증류수 100 ml을 혼합하여 90°C에서 3시간 동안 증탕하였다. 추출 완료 후 2,500 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액만 취하고 0.45  $\mu$ m 필터로 여과한 후 동결건조기(FDU-2100, EYELA, Japan)로 건조하여 분말형태로 회수하였다. 회수한 추출물(RRSE)을 -20°C에서 보관하면서 사용하였다. 추출물은 DMSO (dimethyl sulfide)에 녹여서 사용하였다.

### $\alpha$ -Amylase 저해 활성 측정

$\alpha$ -Amylase 저해 활성은 Ali [2] 등의 방법을 변형하여 측정하였다. 추출물 25  $\mu$ l과  $\alpha$ -amylase 용액(20 mM phosphate buffer, pH 6.9, 0.5 mg/ml) 25  $\mu$ l를 혼합하여 25°C에서 10분간 incubation 하였다. 10분 후 25  $\mu$ l의 1% starch 용액(20 mM phosphate buffer, pH 6.9)을 첨가하여 25°C에서 10분간 추가 incubation하였다. 50  $\mu$ l 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS, Sigma-Aldrich) 용액을 넣어 반응을 종결하고 100°C에서 5분간 incubation한 뒤 상온으로 냉각하여 540 nm에서 흡광도를

측정하였다. IC<sub>50</sub>을 도출하기 위한 RRSE의 농도범위는 0.0001~100  $\mu$ g/ml로 설정하였고, 9개의 농도로 나누어 분석하였다.

### $\alpha$ -Glucosidase 저해 활성 측정

$\alpha$ -Glucosidase 저해 활성을 측정하기 위하여 Tibbot 등의 방법[24]에 따라 반응 혼합액은 50 mM sodium succinate buffer (pH 4.2)에 *p*-nitrophenol- $\alpha$ -D-glucopyranoside (PNPG)를 용해시켜 1 mg/ml의 농도로 기질을 만들었다. 기질 50  $\mu$ l와 효소액 25  $\mu$ l를 혼합하고 대조구에는 시료를 녹인 용매(DMSO, vehicle) 25  $\mu$ l, 반응구에는 시료(0.1 mg/ml) 25  $\mu$ l을 넣어 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1N-NaOH 25  $\mu$ l를 첨가하여 발색시켰다. 이때 생성된 *p*-nitrophenol (PNP)은 400 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 양은 표준물질 PNP로부터 작성한 표준곡선으로부터 구하여 아래의 식으로 저해율을 구하였다. IC<sub>50</sub>을 도출하기 위한 RRSE의 농도범위는  $\alpha$ -amylase 저해활성과 같은 범위로 설정하였다. Acarbose (1.0 mg/ml)을 양성 대조구로 사용하였다.

Inhibition (%)=(1-반응구의 PNP 생성량/대조구의 PNP 생성량) ×100

### Pancreatic lipase 효소 활성 저해능

Pancreatic lipase 저해활성은 Gomes 등의 방법[11]을 변형하여 측정하였다. 먼저 96 well microplate에 0.05 M sodium acetate buffer (pH 5.6), 4% (v/v) triton X-100에 녹인 2.5 mM 4-nitrophenyl butyrate (PNPB) 기질에 0.25 M Tris (pH 7.7)에 녹인 pancreatic lipase (Sigma-Aldrich, USA)와 시료를 넣어 37°C에서 15분간 반응시켰다. 반응 완료 후 20% sodium dodecyl sulfate (SDS)를 첨가하여 반응을 종료하였다. 반응액을 4°C, 12,000 rpm에서 20분간 원심분리한 뒤 상등액을 96-well plate에 분주하고 405 nm에서 흡광도를 측정하여 시료를 넣지 않은 대조구 대비 백분율로 나타내었다. Orlistat를 양성 대조구로 사용하였다.

### 3T3-L1 preadipocyte 분화

3T3-L1 preadipocytes는 ATCC (American Type Culture Collection, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포는 10% NBCS (New born calf serum, Thermo Scientific, USA), antibiotic-antimycotic를 함유한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Thermo Scientific)에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였다. 분화를 위해 세포수를 100% confluence 시킨 후 MDI (Isobutylmethylxanthine 0.5 mM, dexametason 1  $\mu$ M, insulin 10  $\mu$ g/ml)와 10% FBS (fetal bovine serum, Thermo Scientific)를 함유한 DMEM 배지를 사용하여 2일간 배양하였다. 2일 후(D-2) insulin 10  $\mu$ g/ml 만을 첨가한 DMEM (containing 10% FBS)으로 교체하여 2일 추가 배양한 뒤, D-6 일째부터 10% FBS만을 포함한 DMEM 배지로 교체하여 D-8

이 되는 시점까지 배양하였다. 시료는 분화 배지 교환 시 매번 동일 농도로 처리하였다.

#### Oil Red O staining 및 triglyceride (TG) 생성 저해능 분석

3T3-L1 preadipocyte의 세포분화 및 지방축적에 미치는 영향을 비교하기 위하여 분화가 종료된 후 10% formalin 수용액으로 고정하고 Oil Red O working solution (Oil Red O : DW = 3:2)으로 지방을 염색하였다. 염색된 Oil Red O는 100% isopropanol을 이용하여 추출 후 ELISA (Perkin Elmer, Victor2 1420, Multilabel Counter)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. TG 생성 저해능은 TG assay kit (Asanpharm, Korea)를 사용하여 측정하였다.

#### 세포생존율 측정(MTT assay)

새싹 추출물이 지방세포의 세포생존에 미치는 영향을 확인하기 위하여 96 well microplate에  $1 \times 10^4$  cells이 되도록 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 3T3-L1 cell에 추출물을 처리하고 48시간 후 5 mg/ml의 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 용액 10  $\mu$ l를 첨가하고 4시간 추가 배양 후 침전물을 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 용해시킨 뒤 ELISA를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구의 흡광도를 기준으로 생존율을 산출하였다. 또한, 지방생성 유도 시킨 후 세포생존율을 비교하였다.

#### Immunoblotting을 통한 지방분화관련 단백질 발현 조절능 분석

분화된 3T3-L1 cells을 PBS 1회 세척하고 ice-cold RIPA buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM sodium orthovanadate, 120 mM sodium chloride, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 1  $\mu$ g/ml aprotinin)을 넣어 lysis 시킨 후  $10,000 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 동일한 양의 단백질(20  $\mu$ g/ml)을 SDS-polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동 후 PVDF membrane (Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA)에 transfer 하였다. 5% skim milk (0.1% Tween 20 containing PBS, PBST) 용액에서 1시간 동안 non-specific binding site를 blocking한 뒤 1차 항체[anti-C/EBP $\alpha$ , anti-SREBP-1, anti-PPAR $\gamma$ , anti-adiponectin, anti-perilipin, anti-FABP4, anti-FAS, anti- $\beta$ -actin (1:2, 500), Cell Signaling Technology, USA]로 상온에서 1시간 30분간 incubation하고 2차 항체(anti-rabbit IgG or anti-mouse IgG linked with horseradish peroxidase, SantaCruz Biotechnology, Inc. USA)로 상온에서 1시간 incubation 하였다. ECL solution을 이용하여 antibody-bound protein을 detection하고 relative protein expression은 Image J software로 정량하였다.

#### 통계처리

모든 실험은 3회 반복 측정하여 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. 통계적 분석은 SigmaPlot program (v10. 0, San Jose, CA, USA)를 이용하였고, 유의성 검정은 one-way-ANOVA와 Student's t-test 로 분석하여  $p < 0.05$ 일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

## 결과 및 고찰

#### 적무 새싹 추출물(RRSE)의 $\alpha$ -amylase, $\alpha$ -glucosidase 저해활성

건조한 적무 새싹(RRS) 10 g으로부터 증류수 추출을 통해 2.88 g의 추출물을 확보하였다(yield, 28.8%). RRSE의  $\alpha$ -amylase 와  $\alpha$ -glucosidase 효소 활성억제 효능 분석결과  $\alpha$ -amylase는 IC<sub>50</sub> 117.04  $\mu$ g/ml,  $\alpha$ -glucosidase는 IC<sub>50</sub> 48.93  $\mu$ g/ml에서 억제 효능을 나타냈다(Table 1). 탄수화물의 소화과정에 관여하는 효소 중  $\alpha$ -amylase는 타액 및 췌장에서 분비되는 효소로 starches나 glycogen의  $\alpha$ -glycogen을 glucose나 maltose로 분해하고, 소장 상피세포에 있는  $\alpha$ -glucosidase는 탄수화물 소화의 중추적인 효소이다. 두 효소의 활성을 저해시킴으로써 탄수화물 소화 속도를 지연시키며 식후 혈당 상승을 억제할 수 있다[12]. Starches의 소화 흡수를 저해하는 저해제는 당뇨병, 비만증, 과혈당증 등의 전분 흡수와 관련된 질병 치료제로 이용될 수 있다.

#### RRSE의 pancreatic lipase 저해활성

Pancreatic lipase는 triglyceride를 가수분해시켜 glycerol과 fatty acid으로 분해한다. 섭취한 지방은 lipase의 작용에 의해 주로 monoglyceride와 fatty acid로 분해되어 bile acid와 micelle을 형성해서 흡수된다. 흡수된 지방산은 소장상피세포에서 triglyceride로 재합성되어 순환혈액 속에 들어가고 간장, 지방조직, 근육 등으로 보내져 사용되고 남은 triglyceride는 각 조직에 축적된다. 이때 지방의 축적이 과도하면 비만을 초래할 수 있다. 지방 흡수의 중요한 역할을 하는 lipase의 활성 저해를 통해 지방이 체내에 소화, 흡수 되지 않고 체외로 배설되게 함으로 지방의 축적을 막을 수 있다[8].

RRSE의 pancreatic lipase 저해 활성을 비교한 결과는 그림 Fig. 1에서 나타내었다. RRSE는 50~400  $\mu$ g/ml 농도범위에서 처리하여 분석하였으며, Orlistat를 positive control로 사용하

Table 1. Effects of water extract of red radish sprout (RRSE) on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activity

Extraction yield (%)	$\alpha$ -Amylase*	$\alpha$ -Glucosidase*
28.8	48.93 $\pm$ 3.93**	117.04 $\pm$ 6.01**

\*IC<sub>50</sub> value in the concentration ( $\mu$ g/ml) of sample required for 50% inhibition.

\*\*Each value represents mean  $\pm$  SD (n=3).

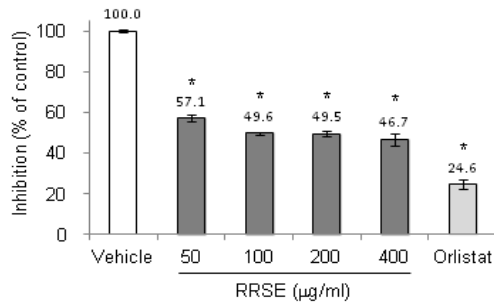


Fig. 1. Effect of red radish sprout extract (RRSE) on pancreatic lipase activation. Data represent the mean  $\pm$  SD (n=3 per group) of at least three independent experiments. Vehicle refers to the solvent for dissolving the RRSE (dimethyl sulfoxide, DMSO). \*,  $p < 0.001$  versus vehicle.

였다. 결과 Positive control인 orlistat (24.6 $\pm$ 0.4%)에 비해 pancreatic lipase 저해활성이 우수하지는 않았으나, RRSE 처리 농도 중 가장 낮은 농도인 50  $\mu$ g/ml (57.1 $\pm$ 2.5%)에서부터 통계적으로 유의한 억제 효능을 보였으며 농도가 증가할 수록 차츰 억제 효능이 증가하는 경향이 있었으나 농도범위간 유의성은 없었다.

**RRSE의 3T3-L1 preadipocyte 분화 억제 활성**

3T3-L1 preadipocytes에 IBMX, dexamethasone, insulin을

처리하여 지방분화를 유도하였으며 지방분화 저해활성을 측정하기 위해 RRSE를 50~400  $\mu$ g/ml의 농도범위에서 처리한 후 Oil Red O를 이용하여 생성된 지방의 양을 측정함으로써 지방분화에 미치는 시료의 효능을 판단하였다. 그 결과 MDI (339.3 $\pm$ 0.07%)만 처리한 대조군에 비해 RRSE를 처리한 군에서 농도가 증가할수록 lipid droplet 생성이 현저히 억제되는 것을 현미경으로 확인하였으며(Fig. 2A) 염색된 Oil red-O를 isopropyl alcohol로 추출하여 정량한 결과에서도 유의한 억제 효능을 확인하였다(Fig. 2B). 고농도인 400  $\mu$ g/ml(172.7 $\pm$ 5.0%)을 처리한 군은 positive control로 사용한 orlistat (186.6 $\pm$ 18.1%)와도 유사한 억제 효능을 보였다. Lipid droplet은 preadipocytes의 분화과정에서 생성되며 phospholipid monolayer에 둘러싸인 중성지방으로 구성되어 있으며, 중성지방인 triglyceride (TG)는 중요한 에너지원이나 과도하게 생성된 triglyceride는 지방세포에 흡수되고 저장되어 비만의 원인으로 작용한다[5, 7]. RRSE를 처리하여 생성된 TG 함량을 측정 한 결과 100  $\mu$ g/ml 이상의 농도범위에서 30% 이상 감소되는 것을 확인하였으며 최대 처리 농도인 400  $\mu$ g/ml(9.8 $\pm$ 0.9  $\mu$ g/mg)에서는 positive control인 orlistat (9.5 $\pm$ 0.8  $\mu$ g/mg)와 유사한 감소효과를 나타내었다(Fig. 2C). 이러한 지방생성 억제 효능이 지방세포에 대한 독성에 의한 것인지를 검토하기 위하여 MTT assay를 통하여 분화전과 분화후의 세포 생존율을 비교

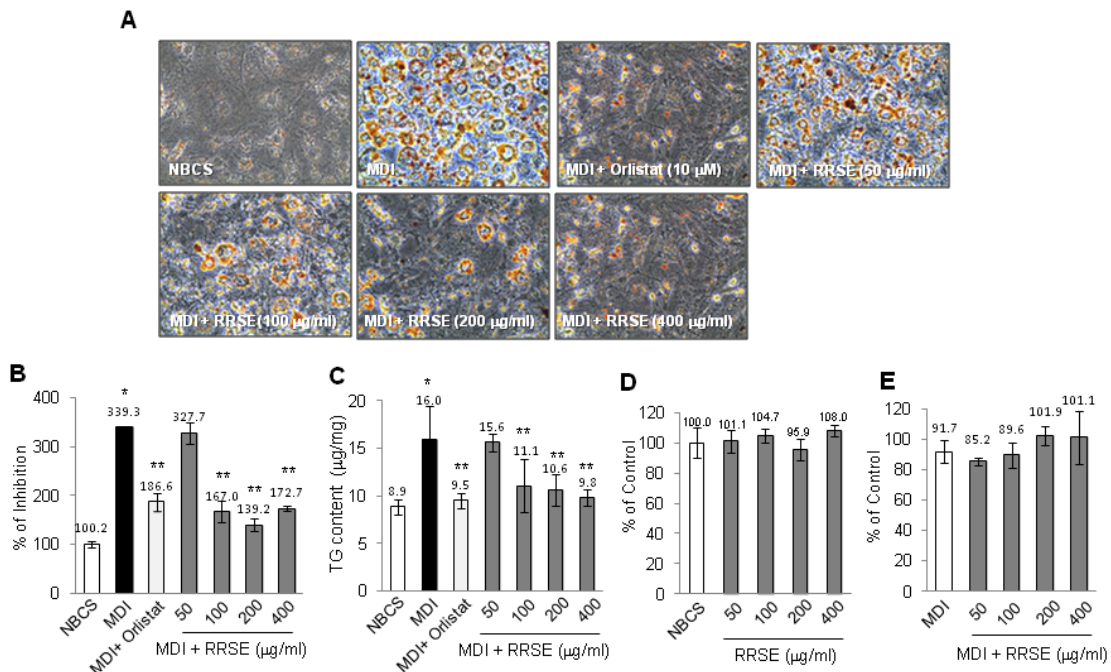


Fig. 2. Effect of RRS extract on 3T3-L1 adipogenesis and morphological change (A), lipid accumulation (B), triglyceride (TG) content (C), cellular cytotoxicity (D). (A) Oil Red O stains for lipids in 3T3-L1 cells in the presence or absence of RRSE (x200 magnification). (B) Total lipid content relative to NBCS control (C) TG contents in cell lysates (D) Cytotoxicity evaluated by MTT assay after exposure of 3T3-L1 preadipocytes to increasing concentration of RRSE for 48 hr. (E) Cytotoxicity after exposure of 3T3-L1 to RRSE for 48 hr after differentiation. Data represent the mean  $\pm$  SD (n=3-8 per group) of at least three independent experiments. \*,  $p < 0.001$  versus NBCS or MDI, \*\*,  $p < 0.05$  versus MDI.

하였다. 결과 분화 억제제를 보인 농도를 포함한 모든 처리 농도에서 세포 생존율에는 영향을 미치지 않았다(Fig. 2D, 2E).

**RRSE의 adipogenic transcription factor 발현 조절 효능**

Preadipocytes에서 adipocytes로 분화되는 adipogenesis 과정은 많은 종류의 adipogenic transcription factor들의 regulation에 의하여 유도되는 것으로 알려져 있으며 이러한 분화 과정에서 가장 중추적인 역할을 하는 transcription factors는 CCAT-enhancer binding protein (C/EBP) $\alpha$ , Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\gamma$ , Sterol regulatory element binding protein (SREBP)이다. 이러한 transcription factor는 지질 생합성 조절, 세포내 지질의 축적 조절, glucose 흡수 조절 등의 기능을 하는데 필요한 유전자들의 발현을 조절하여 분화를 유도한다[1, 3, 4, 16]. C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , SREBP의 발현은 상호작용을 통하여 세포내 lipid droplet 생성 및 세포 비대 등과 같은 형태적 변형과 더불어 FABP4, FAS, perilipin, adiponectin 등의 adipocytokine과 adipogenic protein 발현에 중요한 역할을 한다[1]. 지방세포 분화 과정에서 RRSE를 처리한 뒤 지방 세포에서 지방의 분화와 관련된 유전자의 발현을 Western blot analysis를 통하여 분석하였다. 그 결과 RRSE 처리 농도 200  $\mu\text{g/ml}$  이상에서는 C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , SREBP-1의 발현 증가를 유의하게 억제하였고, PPAR $\gamma$ 의 발현은 가장 낮은 농도인 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 억제 효능을 보였다(Fig. 3). 따라서 적무 새싹은 지방분화 유전자의 조절을 통하여 지방 생성 억제 효능을 나타낸 것으로 사료된다.

**RRSE의 adipogenic protein 발현 조절 효능**

지방세포 분화시 발현되는 transcription factor에 의해 유도되는 down stream signaling 단백질로는 adiponectine, FAS, perilipin, FABP4 등이 있다. Adiponectin은 지방조직에서만 발현되는 것으로 알려져 왔으나, 최근 연구에 의하면 골수,

조골세포, 태아 조직, 근육세포, 심근세포, 타액선상피세포에서도 일부 발현되는 것으로 보고되고 있다. 하지만 성인에서 adiponectin이 가장 많이 생성되는 곳은 지방세포이다[17, 20]. FAS는 acetyl-coenzyme A와 malonyl-coenzyme A로부터 long-chain fatty acid를 생성하게 하는 효소이다. Perilipin은 lipid droplets의 periphery에 localization되어 있고 lipid storage에 주요한 역할을 한다. Chang [18] 연구팀은 perilipin 유전자를 제거한 mouse는 지방을 축적하지 못하여 비만이 유발되지 않음을 보고하였다. 이는 perilipin이 지방 세포내에 있는 지방질 분해효소(hormone-sensitive lipase, HSL)을 억제하는 작용에 의한 것임을 밝혔다. FABP4은 다양한 cellular pathway에서 지방산 혹은 지질과 binding하여 transport되도록 한다. 최근까지 발표된 결과는 FABPs가 지방산 대사조절에서 핵심적인 역할을 할 수 있다는 사실을 보고하였다[10, 13]. 현재까지 밝혀진 FABP family는 9개의 member가 있으며 이중 adipocyte FABP family는 FABP4 (adipocyte protein 2, aP2)이다. FABP4 유전자를 제거한 obese diabetic mice (ob/ob)에서 blood glucose level 감소와 insulin sensitivity 증가 및 plasma TG 와 cholesterol levels이 감소되었다고 보고되었다 [25].

3T3-L1 분화시 RRSE를 50~400  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 뒤 Western bolt analysis를 통하여 adiponectin, FAS, perilipin, FABP4의 발현 조절능을 비교하였다. 결과, adipogenic transcription factor 발현 조절결과에서와 마찬가지로 200  $\mu\text{g/ml}$  이상의 도에서 adipogenic protein 발현이 감소하였다(Fig. 4).

이상의 결과는 적무 새싹이 지방합성을 유도하는 transcription factor와 transcription factor에 의해 조절되는 adipogenic protein 발현을 감소시켜 지방 생성과 축적을 억제하는 효능을 나타낸다고 할 수 있다. 이러한 결과를 바탕으로 향후 적무 새싹을 이용한 기능적 특성을 함유하는 체중조절을

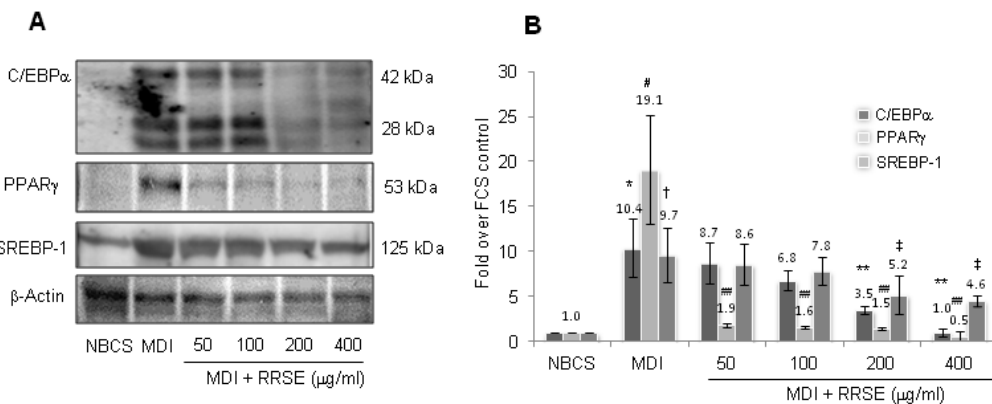


Fig. 3. Effect of RRSE on adipogenic transcription factors expression. (A) Modulation of adipogenic transcription factors by RRSE was evaluated by Western blot analysis. (B) The ratio to  $\beta$ -actin of the densitometric assay is presented. Data represent the mean  $\pm$  SD (n=3 per group) of at least three independent experiments. \*, #, †, p<0.001 versus NBCS, \*\*, \*\*#, ‡, p<0.05 versus MDI.

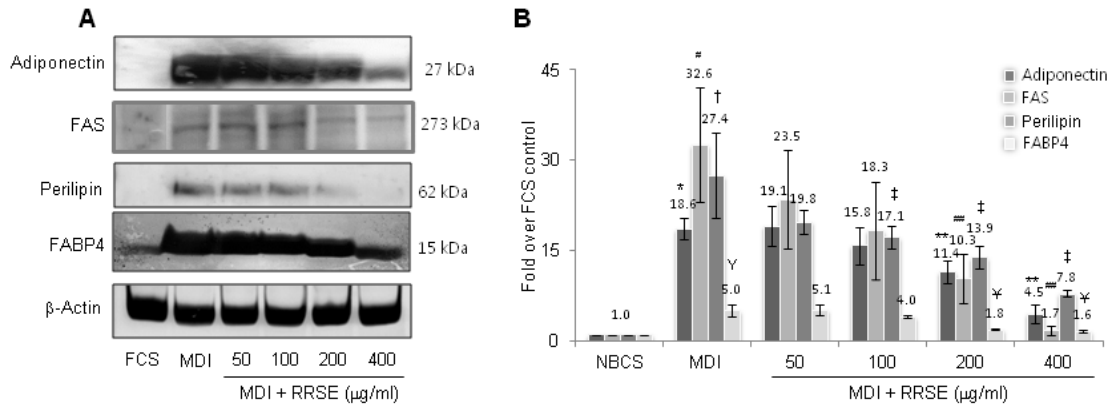


Fig. 4. Effect of RRSE on adipogenic protein expression. (A) Modulation of adipogenic protein expression by RRSE was evaluated by Western blot analysis. (B) The ratio to  $\beta$ -actin of the densitometric assay is presented. Data represent the mean  $\pm$  SD (n=3 per group) of at least three independent experiments. \*, #, †, ‡, ††, †††, ††††, †††††, p<0.001 versus NBCS, \*\*, ##, ††, †††, ††††, p<0.05 versus MDI.

위한 식품소재로의 활용도가 높을 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 산업통상자원부에서 지원하는 2012년도 지역산업기술개발사업(A004400156)과 2013년도 지역특화산업육성사업 기술개발(R&D) 사업(R0002759)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

### References

- Ahmadian, M., Suh, J. M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A. R., Downes, M. and Evans, R. M. 2013. PPAR $\gamma$  signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med* **99**, 557-566.
- Ali, H., Houghton, P. J. and Soumyanath, A. 2006.  $\alpha$ -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *J Ethnopharmacol* **107**, 449-455.
- Brandes, R., Arad, R. and Bar-Tana, J. 1995. Inducers of adipose conversion activate transcription promoted by a peroxisome proliferator's response element in 3T3-L1 cells. *Biochem Pharmacol* **50**, 1949-1951.
- Chawla, A. and Lazar, M. A. 1994. Peroxisome proliferator and retinoid signaling pathways co-regulate preadipocyte phenotype and survival. *Proc Natl Acad Sci* **91**, 1786-1790.
- Chen, H. C. and Farese, R. V. 2005. Inhibition of triglyceride synthesis as a treatment strategy for obesity: lessons from DGAT1-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 482-486.
- Cho, S. D., Park, J. Y., Kim, E. J., Kim, D. M. and Kim, G. H. 2007. Quality evaluation of fresh cut products in the market. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **36**, 622-628.
- Cooke, D. and Bloom, S. 2006. The obesity pipeline: current strategies in the development of anti-obesity drugs. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 919-1200.
- Drent, M. L., Larsson, I., William-Olsson, T., Quaade, F., Czubyayko, F., Von Bergmann, K., Strobel, W., Sjotoro, L. and Van der Veen, E. A. 1995. Orlistat (RO18-0647), a lipase inhibitor, in the treatment of human obesity: a multiple dose study. *Int J Obes Relat Metab Disord* **19**, 221-226.
- Fajas, L., Schoonjans, K., Gelman, L., Kim, J. B., Najib, J., Martin, G., Fruchart, J. C., Briggs, M., Spiegelman, B. M. and Auwerx, J. 1999. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol Cell Biol* **19**, 5495-5503.
- Furuhashi, M. and Hotamisligil, G. S. 2008. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 489-503.
- Gomes, N., Goncalves, C., Carcía-Román, M., Teixeira, J. A. and Belo, I. 2011. Optimization of colorimetric assay for yeast lipase activity in complex systems. *Anal Methods* **3**, 1008-1013.
- Hanfeld, M. 1998. The role of acarbose in the treatment of non insulin-dependent Diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* **12**, 228-237.
- Hertzel, A. V. and Bernlohr, D. A. 2000. The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. *Trends Endocrinol Metab* **11**, 175-180.
- Horton, J. D., Goldstein, J. L. and Brown, M. S. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* **109**, 1125-1131.
- Jing, P., Song, L. H., Shen, S. Q., Zhao, S. J., Pang, J. and Qian, B. J. 2014. Characterization of phytochemicals and antioxidant activities of red radish brines during lactic acid fermentation. *Molecules* **19**, 9675-9688.
- Lehmann, J. M., Moore, L. B., Smith-Oliver, T. A., Wilkison, W. O., Willson, T. M. and Kliewer, S. A. 1995. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). *J Biol Chem*



- 270, 12953-12956.
17. Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. and Matsubara, K. 1996. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* **221**, 286-289.
  18. Martinez-Botas, J., Anderson, J. B., Tessier, D., Lapillonne, A. and Chang, B. H. J. 2000. Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Leprdb/db* mice. *Nat Genet* **26**, 474-479.
  19. Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., Mullany, E. C., Biryukov, S., Abbafati, C., Abera, S. R., Abraham, J. P., Abu-Rmeileh, N. M. E., Achoki, T., AlBuhairan, R. S., Alemu, Z. A., Alfonso, R., Ali, M. K., Ali, R., Guzman, N. A., Ammar, W., Anwar, P., Banerjee, A., Barquera, S., Basu, S., Bennett, D. A., Bhutta, Z., Blore, J., Cabral, N., Nonato, I. C., Chang, J. C., Chowdhry, R., Courville, K. J., Michael, H. C., Cundiff, D., Dabhadkar, K. C., Dandona, L., Davis, A., Dayama, A., Dharmaratne, S. D., Ding, E. L., Durrani, A. M., Esteghamati, A., Farzadfar, F., Fay, D. F. J., Feigin, V. L., Flaxman, A., Forouzanfar, M. H., Goto, A., Green, M. A., Gupta, R., Hafezi-Nejad, N., Hankey, G. J., Harewood, H. C., Havmoeller, R., Hay, S., Hernandez, L., Husseini, A., Idrisov, B. T., Ikeda, N., Islami, F., Jahangir, G. J., Jassal, S. K., Jee, S. H., Jeffreys, M., Jonas, J. B., Kabagambe, E. K., Khalifa, S. E. A. H., Kengne, A. P., Khader, Y. S., Khang, Y. H., Kim, D., Kimokoti, R. W., Kinge, J. M., Kokubo, Y., Kosen, S., Kwan, G., Lai, T., Leinsalu, M., Li, Y., Liang, X., Liu, S., Logroscino, G., Loufo, P. A., Lu, Y., Ma, J., Mainoo, N. K., Mensah, G. A., Merriman, T. R., Mokdad, A. H., Moschandreas, J., Naghavi, M., Naheed, A., Nand, D., Narayan, K. M. V., Nelson, E. L., Neuhouser, M. L., Nisar, M. I., Ohkubo, T., Oti, S. O., Pedroza, A., Prabhakaran, D., Roy, N., Sampson, U., Seo, H., Sepanlou, S. G., Shibuya, K., Shiri, R., Shiue, I., Singh, G. M., Singh, J. A., Skirbekk, V., Stapelberg, N. J. C., Sturua, L., Sykes, B. L., Tobias, M., Tran, B. X., Trasande, L., Toyoshima, H., van de Vijver, S., Vasankari, T. J., Veerman, J. L., Velasquez-Melendez, G., Vlassov, V. V., Vollset, S. E., Vos, T., Wang, C., Wang, S. X., Weiderpass, E., Werdecker, A., Wright, J. L., Yang, Y. C., Yatsuya, H., Yoon, J., Yoon, S. J., Zhao, Y., Zhou, M., Zhu, S., Lopez, A. D., Murray, C. J. L. and Gakidou, E. et al. 2014. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the global burden of disease study. 2013. *Lancet* **14**, 60460-60468.
  20. Pineiro, R., Iglesias, M. J., Gallego, R., Raghay, K., Eiras, S., Rubio, J., Dieguez, C., Gualillo, O., Gonzalez-Juanatey, J. R. and Lago, F. 2005. Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS Lett* **579**, 5163-5169.
  21. Shao, D. and Lazar, M. A. 1997. Peroxisome proliferator activated receptor gamma, CCAAT/enhancer-binding protein alpha, and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation. *J Biol Chem* **272**, 21473-21478.
  22. Spiegelman, B. M. and Flier, J. S. 1996. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell* **87**, 377-389.
  23. Takaya, Y., Kondo, Y., Furukawa, T. and Niwa, M. 2003. Antioxidant constituents of radish sprout (*Kaiware-daikon*) *Raphanus sativus* L. *J Agric Food Chem* **51**, 8061-8056.
  24. Tibbot, B. K. and Skadsen, R. W. 1996. Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative  $\alpha$ -glucosidase gene from berley. *Plant Mol Biol* **30**, 229-241.
  25. Uysal, K. T., Scheja, L., Wiesbrock, S. M., Bonner-Weir, S. and Hotamisligil, G. S. 2000. Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. *Endocrinology* **141**, 3388-3396.

## 초록 : 적무 새싹 추출물의 3T3-L1 지방전구세포에서 지방합성 억제 효과

김다혜<sup>1</sup> · 김상준<sup>1</sup> · 정승일<sup>1</sup> · 천춘진<sup>2</sup> · 김선영<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> (재)전주생물소재연구소, <sup>2</sup>영농조합법인 애농)

적무(*Raphanus sativus* L.) 새싹은 십자화과 식물이다. 본 연구에서는 적무새싹 물 추출물의  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, 췌장 리파아제 효소에 대한 활성 억제능과 3T3-L1 지방 전구세포를 이용하여 지방합성 억제 효능을 평가하였다. 적무새싹 추출물을 처리한 결과  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, 췌장 리파아제 효소 활성을 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였다. 더욱이 적무새싹 추출물은 3T3-L1 지방 전구세포의 지방세포 분화, 지방 및 중성지방 축적을 억제하였으며 세포독성은 나타나지 않았다. 적무새싹 추출물은 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\gamma$ , sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) and CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) $\alpha$ 와 같은 지방합성 전사 인자의 발현 조절을 통하여 지방합성을 억제하였다. 또한, 적무새싹 추출물은 지방합성과 수송 저장에 관여하는 단백질인 adiponectin, fatty acid synthesis (FAS), perilipin, and fatty acid binding protein-4 (FABP4)의 발현을 억제하였다. 이 연구는 적무새싹이 지방합성 전사인자는 물론 지방합성 단백질 발현의 제어를 통해 비만을 억제할 수 있는 가능성을 보여주었다.