

항비만소재의 lipoprotein lipase 억제 작용 연구

이성미¹ · 강운환² · 김경곤¹ · 김태우² · 최 먼^{1,2,*}

¹강원대학교 생명건강공학과, ²강원대학교 강원웰빙특산물산업화학지역혁신센터

Study of Lipoprotein Lipase Inhibitory Activity of Anti-obesity Herb Extracts

Sung Mee Lee¹, Yun Hwan Kang², Kyoung Kon Kim¹, Tae Woo Kim², and Myeon Choe^{1,2,*}

¹Department of Bio-Health Technology, Kangwon National University

²Well-being Bioproducts RIC, Kangwon National University

Abstract In this study, we evaluated the lipoprotein lipase (LPL) inhibitory activity of 11 water extracts derived from *Cinnamomum cassia* Blume, *Sarcodon aspratus*, *Cordyceps militaris*, *Crataegus pinnatifida* Bunge, *Corni fructus*, *Allium cepa*, *Coix lacryma-jobi*, *Plantago asiatica* L., *Lentinus edodes*, *Rosa rugosa*, and *Foeniculum fructus*. The results of the LPL secretion and activity assay showed *Sarcodon aspratus* (NE) extract have an LPL secretion inhibitory activity. The cause of reduction in LPL secretion after NE treatment was investigated using molecular biology methods. NE treatment affected the LPL content in cells, but did not affect LPL mRNA expression. It also increased the mRNA expression level of sortilin-related receptor LDLR class A (SorLA), a receptor that induces endocytosis and intracellular trafficking of LPL. Finally, cell fractionation revealed that NE treatment induced the expression of CCAAT-enhancer-binding protein beta (C/EBPβ), a SorLA transcription factor, in the nuclei of 3T3-L1 adipocytes. These results show that NE's anti-obesity effect involves inhibition of LPL secretion through C/EBPβ-mediated induction of SorLA expression.

Keywords: *Sarcodon aspratus*, lipoprotein lipase, sortilin-related receptor, CCAAT-enhancer-binding protein beta (C/EBPβ), anti-obesity

서 론

지단백 지질가수분해효소(lipoprotein lipase, LPL)는 간, 심장, 지방조직, 뇌 등에서 발현되는 lipase family에 속하는 효소이며 pancreatic lipase, hepatic lipase 및 endothelial lipase를 포함한다(1). LPL은 세포막, 세포외부 및 혈관내피세포로 분비되어 chylomicron이나 very low-density lipoprotein에 함유된 triglyceride를 fatty acid와 glycerol로 분해하여 fatty acid를 세포내로 유입시키는 기능을 한다(1,2). 세포내로 유입된 fatty acid는 근육조직에서는 활발한 에너지대사를 통해 산화되어 소진되는 반면 지방조직에서는 유입된 fatty acid가 에너지대사를 통해 모두 소진되지 못하고 triglyceride로 전환되어 저장된다(1,2). 지방조직 내 triglyceride 축적량이 증가하게 되면 산화스트레스, 비정상적 adipokine 분비, 염증반응 등의 유발로 인해 인슐린 저항성, 당내성 이상, 심근비대 등이 나타나게 되며 결국 비만, 당뇨, 고혈압, 죽상동맥경화, 심혈관 질환 등의 대사질환이 발생한다(3,4). 따라서 LPL을 포함한 lipase의 억제를 통한 지방 저장을 저해함으로써 생리대

사 이상 및 대사질환들을 예방 및 완화할 수 있을 뿐만 아니라 체중증가를 억제하는 효과도 기대할 수 있다(5,6).

계피(*Cinnamomum cassia* Blume)는 인류가 오랫동안 사용해 온 향신료로서 주요성분으로 cinnamaldehyde, cinnamic acid, eugenol 등의 방향성분이 보고되었으며, 말초혈관확장, 해열, 항산화작용, 장내가스제거 등의 효능이 알려져 있다(7). 최근 연구에 의해 계피오일의 지방세포 분화억제능과 계피 유기용매추출물의 pancreatic lipase 억제효능이 보고되었다(7,8). 능이(*Sarcodon aspratus*)는 한국, 중국, 일본 등지에 서식하는 버섯으로 자실체의 면역활성 기능이 알려져 있다(9). 또한 고지방식을 한 비만 쥐에서 비만지수의 감소를 확인함으로써 체중조절 또는 비만과 관련된 질환의 예방에 사용가능함을 제시한 바 있다(10). 동충하초(*Cordyceps militaris*)는 예로부터 천식, 자양강장 등에 사용되었으며, 최근의 연구에서는 cordycepin을 다량 함유하고 있으며 항균, 항암, 면역조절 등의 기능과 함께 혈중 중성지방 및 혈당의 감소에 영향을 미치는 것으로 보고되었다(11). 산사(*Crataegus pinnatifida* Bunge)는 식적과 어혈을 풀어주는 효능이 있어 전통의학에서 주로 사용되어 왔으며, 최근의 연구에서는 고지방식을 통해 비만을 유도한 쥐에서 지질저하효과 및 체중감소 등을 통한 비만지수의 감소가 확인되었다(12). 산수유(*Corni fructus*)는 산수유나무의 붉은색 열매에서 씨를 제거한 것을 말하며 전통한약제로 많이 사용되어왔다(13). 최근의 연구결과에서 지방세포 분화 및 지방축적 억제뿐만 아니라 신생혈관억제에 따른 항비만제로서의 가능성이 제시되었다(14). 양파(*Allium cepa*)는 야채와 향신 조미료로 널리 사용되고 있고, 항산화 활성을 나타내는 다량의 flavonoid가 함유

*Corresponding author: Myeon Choe, Department of Bio-Health Technology, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon 200-701, Korea

Tel: 82-33-250-8645

Fax: 82-33-342-7368

E-mail: mchoe@kangwon.ac.kr

Received September 24, 2014; revised December 15, 2014;

accepted December 23, 2014

되어 있을 뿐만 아니라 심혈관계질환 예방, 항산화효과 및 항암 효과가 보고되어 있다(15). 최근 국내의 연구에서 당뇨병성 비만 쥐 및 식이를 통한 비만유도 쥐에서 항비만효과가 확인되었다(15,16). 울무(*Coix lachryma-jobi*)는 생산량의 대부분이 울무쌀 및 울무차로 이용되고 자양강장효과 및 이노작용이 있는 것으로 알려져 있다. Kim 등(17)의 연구에서는 탄수화물 흡수억제를 통한 비만개선 효과가 보고되었다. 차전자(*Plantago asiatica* L.)는 우리나라, 중국, 일본에 자생하는 다년생 초본으로 고지혈증개선 효과가 보고되어 있으며, 지질대사 관련 효소들의 활성촉진을 통한 항비만효과의 가능성이 제시되었다(18). 표고버섯(*Lentinus edodes*)은 활엽수에 기생하는 느타리과에 속하는 것으로 항암, 혈당강하, 콜레스테롤저하 등의 생리활성이 있는 것이 잘 알려져 있다. 최근의 연구결과에서는 고지방식이를 통해 비만을 유도한 쥐에서 체중증가 억제, 지방축적억제 및 지질과산화물 생성억제 등의 효과가 관찰되었다(19). 해당근(*Rosa rugosa*)은 민간에서 당뇨 치료제로 널리 사용되었고, Jung 등(20)은 진통소염물질이 함유되어 있음을 보고하였다. 또한 Park 등(21)의 연구에서 체중증가 억제 및 고지혈증개선 효과를 보고함과 함께 유효성분으로 euscaphic acid와 tormentic acid를 제시하였다. 회향종자(*Foeniculum fructus*)는 산미나리과에 속하는 다년생 초본의 성숙한 과실을 건조한 것으로 항염증제, 진통제, 구충제 등으로 전통한의학에서 사용하였으며, 최근의 연구에서 식이를 통해 비만을 유도한 쥐에서 지방세포의 크기를 감소시키고 지방대사에 관련되는 효소를 활성화시켜 항비만효과를 유도할 수 있음이 관찰되었다(22).

본 연구에서는 항비만효능이 알려진 계피, 능이, 동충하초, 산사, 산수유, 양파, 울무, 차전자, 탕자, 표고버섯, 해당근, 회향종자를 이용하여 LPL 억제효능을 평가하고 효과적인 LPL억제제를 선별하여 항비만 기능성 식품개발의 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

물추출 시료 제조

본 실험에 사용된 약용식물은 Table 1과 같다. 11종의 소재들은 춘천시 소재 건재상에서 국내산 재료로 구입하여 수세한 후 10배 증류수를 가하여 60°C에서 24시간 교반하여 추출하였다. 추출한 소재는 3,000×g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 여과한 후 실온에서 방냉한 뒤, 감압농축기(Eyela SB-1000, Tokyo, Japan)로 농축하고 동결건조기(FD 8508, Ilshin, Ulsan, Korea)를 이용하여 건조한 후 필요한 농도로 증류수에 희석하여 실험에 사용하였다.

3T3-L1 세포배양 및 소재 처리

3T3-L1 세포의 분화유도는 Oh 등(23)의 방법을 응용하여 수행하였다. 3T3-L1세포는 10% calf serum을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에 100 U/mL penicillin과 100 µg/mL streptomycin을 첨가하여 5% CO₂, 37°C에서 배양, 유지하였다. 3T3-L1 지방전구세포의 지방세포로의 분화를 위해 6 well plate에 5×10⁵ cell/well의 세포를 분주하여 세포가 완전히 밀집되게 배양하고, 2일을 더 배양한 후 MDI (0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 1 µM dexamethasone, 10 µg/mL insulin) solution, 및 10% fetal bovine serum (FBS)을 포함하는 DMEM 배지에서 2일 동안 배양함으로써 분화를 개시하였다. 그 다음 10 µg/mL insulin 및 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지로 교환하여 3일 동안 분화를 진행시켰다. 소재는 분화가 완료된 5일째부터 24시간동안 처리하였다.

Lipoprotein lipase (LPL)의 enzyme-linked immunospecific assay (ELISA) 분석

3T3-L1 지방세포의 lipoprotein lipase (LPL) 단백질 함량은 Feng 등(24)의 연구를 참고하여 mouse LPL ELISA kit (Cusabio, Wuhan, China)를 이용하였으며 각 추출소재 0.25 mg/mL을 24시간 처리한 지방세포의 배양배지와 단백질 추출액에서 측정하였다. 배양배지는 3T3-L1 지방세포를 분화완료한 후 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에서 소재를 24시간 처리한 후 배지만 회수하여 4°C, 12,000×g에서 10분간 원심분리하여 상등액만 사용하였으며, 3T3-L1 지방세포 단백질 추출물은 소재를 24시간 처리한 후 cooling된 PBS로 3회 세척하고 세포를 회수한 후 4°C, 1,000×g에서 5분간 원심분리하고 PBS를 제거한 후 RIPA buffer (50 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.1% SDS (m/v), 0.5% deoxycholic acid (m/v), 1% Triton X-100 (v/v), 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktail)를 가하여 4°C, 30분간 반응시킨 후 2분 동안 vortexing하고 4°C, 15,000×g에서 15분 동안 원심분리하여 상등액을 새 튜브로 옮겨 준비하였다. LPL ELISA assay 방법은 commercial kit에서 제공하는 ELISA protocol을 따랐다. 즉, mouse LPL antibody가 pre-coating처리된 96 well plate에 배지 sample 100 µL 또는 추출단백질 sample 50 µg/100 µL을 넣어 2시간동안 정지하였다. 2시간 후 sample을 제거한 후 100 µL의 biotinylated LPL IgG를 넣고 1시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 washing buffer (200 µL)로 3회 세척하였다. 각 well에 100 µL의 HRP-avidin을 1시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 다시 washing buffer

Table 1. List of medicinal plants used in the experiment

Scientific names	Samples name	Korean names	Used part
<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	GP	Gyepi	bark
<i>Sarcodon aspratus</i>	NE	Neungi	whole
<i>Cordyceps militaris</i>	DCH	Dong chunghacho	whole
<i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge	SS	Sansa	fruit
<i>Corni fructus</i>	SSY	Sansuyoo	fruit
<i>Allium cepa</i>	YP	Yangpa	root
<i>Coix lacryma-jobi</i>	YM	Yulmu	seed
<i>Plantago asiatica</i> L.	CJJ	Chajeonja	seed
<i>Lentinus edodes</i>	PG	Pyogo	whole
<i>Rosa rugosa</i>	HDG	Haedanggeun	root
<i>Foeniculum fructus</i>	HH	Hoehyang	seed

(200 μ L)로 5회 세척하였다. 90 μ L TMB를 넣고 30분 동안 빛이 들어가지 않는 상태에서 추가 반응시킨 후 well 당 50 μ L의 stop solution을 첨가함으로써 종료시킨다. 반응 종료 후 microplate reader (EL808; BioTek, Winooski, VT, USA)로 450 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. LPL 함량은 대조군과 비교하여 상대적인 값으로 나타내었다.

Lipoprotein lipase (LPL)의 활성 측정

Lipase 활성은 mouse LPL antibody가 pre-coating된 96 well plate와 lipase activity assay kit (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 측정하였다. 실험에 사용된 단백질 추출액은, 5일 동안 3T3-L1 지방세포 분화를 유도하고 DMEM배지에서 추가 2일간 배양한 세포를 PBS로 2회 세척 후 activity assay kit 제품에서 제공하는 ice-cold lipase assay buffer를 4 volume 가하여 4°C에서 homogenizing한 후 4°C, 13,000 \times g에서 10분 동안 원심분리하고 상층액을 분리하여 준비하였다. 준비된 단백질 sample을 LPL antibody가 pre-coating된 96 well plate에 100 μ L씩 분주한 후 3시간동안 정치하였다. 3시간 후 sample을 제거하고 각 소재 100 μ L (0.25 mg/mL)를 30분간 상온에서 반응시킨 후 washing buffer (200 μ L)로 3회 세척하였다. 세척 후 well 당 50 μ L의 lipase assay buffer를 첨가하여 반응에 필요한 volume을 맞춘 후 lipase activity assay kit제조사에서 제공하는 방법에 따라 실험을 수행하였다. Lipase activity는 milliunit/mL 단위로 계산한 후 활성 비교를 위해 대조군을 기준으로 백분율(%)로 계산하였다.

총 polyphenol 및 flavonoid 함량 측정

총 polyphenol 및 flavonoid의 함량은 Lee 등(25)이 사용한 동일한 조건에서 수행하였다.

항산화 활성 측정

소재의 항산화활성은 Lee 등(25)이 사용한 동일한 조건과 방법으로 수행하였다.

mRNA 발현 확인(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

분화 완료한 3T3-L1 지방세포에 6시간, 12시간 동안 0.05, 0.1,

0.25 mg/mL 농도의 소재를 처리한 후 배양배지를 제거하고 QIAzol lysis buffer (Qiagen, MD, USA)를 이용하여 제조사에서 제공하는 방법에 따라 total RNA를 분리하였다. Nuclease free water에 녹인 후 RNA 5 μ L에 0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC) water를 995 μ L를 첨가하여 260 nm에서 흡광도를 측정하여 total RNA양을 정량하였다. First strand cDNA를 합성하기 위하여 AmfiRiert Platinum cDNA synthesis Master Mix (GenDEPOT, Barker, TX, USA)를 이용하였으며 제공된 방법에 따라 추출한 RNA (2 μ g)와 RNase free water로 9 μ L을 맞추고 70°C에서 5분간 반응시킨 후 2 \times cDNA synthesis buffer 10 μ L, cDNA synthesis Enzyme Mix 1 μ L를 섞어 11 μ L씩 각 PCR tube에 더한 후 25°C에서 5분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)은 Go Tag Green Master (Promega, Madison, WI, USA) 10 μ L, forward primer (10 pmole)와 reverse primer (10 pmole)를 각각 1 μ L, nuclease free water 7 μ L, 합성한 first-stand cDNA 1 μ L를 첨가하여 잘 섞은 후 실행하였으며 각각의 primer는 Table 2와 같다. PCR 산물은 0.002% ethidium bromide가 첨가한 1% agarose gel에 100 V에서 20분간 전기영동 후 UV 광으로 유전자 발현 정도를 알아 보았다. 그 밴드의 강도는 imageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) 소프트웨어를 이용하여 분석 정량하였다.

3T3-L1 지방세포 분획단백질 확보

3T3-L1 지방세포의 분획단백질은 소재처리가 완료된 세포를 cooling된 PBS로 3회 세척하고 trypsinize한 후 튜브로 세포를 옮기고 PBS로 추가 1회 세척한 후 원심분리(500 \times g, 5 min)를 통해 세포를 모은 후 cell fractionation kit (Cell signaling technology, Tokyo, Japan)의 사용방법에 따라 세포 분획을 진행하였다. 즉, 세포가 담긴 tube에 250 μ L의 cytoplasm isolation buffer를 넣고 5초 동안 vortexing한 후 ice에 5분 동안 정치하였다. 원심분리 (500 \times g, 5 min)를 통해 cytoplasmic fraction (상등액)을 분리하고 pellet은 membrane isolation buffer 250 μ L를 넣고 15초 동안 vortexing 한 후 ice에 다시 5분 동안 정치하였다. 원심분리 (8,000 \times g, 5 min)를 통해 membrane fraction (상등액)을 분리한 후 pellet은 다시 nucleus isolation buffer 125 μ L를 넣고 sonication하여 nuclear fraction을 확보하였다.

Table 2. PCR primer sets and expected sizes of PCR products used in the experiment

Gene		Primer (5'-3')	Size (bp)
LPL	forward	ATC CAT GGA TGG ACG GTA AC	483
	reverse	CTG GAT CCC AAT ACT TCG AC	
vSNARE	forward	AAT TCC ACC CCA AAG TCG AG	224
	reverse	ACC CAG CCT CTA GTC TCC GA	
Rab3A	forward	CTA CCG CAA CGA CAA GAG GA	221
	reverse	CAC ACT TGT TTC CCA CCA GC	
Sortilin	forward	ACA AAG ACG GCT GCA TTT TG	282
	reverse	GGC ATT TGT CTC CTG GGA TT	
SorLA	forward	CAG CAG TCC ACC AGC TCC TA	194
	reverse	ACT GCT CAT CCT TGC TGA CG	
C/EBP β	forward	CTG AGC GAC GAG TAC AAG AT	445
	reverse	TTG ATC CGG ATT GCA TCA AG	
GAPDH	forward	GGA GCC AAA AGG GTC ATC AT	203
	reverse	GTG ATG GCA TGG ACT GTG GT	

LPL: Lipoprotein lipase, vSNARE: vesicle-soluble NSF attachment protein receptor, Rab3A: Ras-related protein Rab-3A, SorLA: Sortilin-related receptor, C/EBP β : CCAAT/Enhancer binding protein β , GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

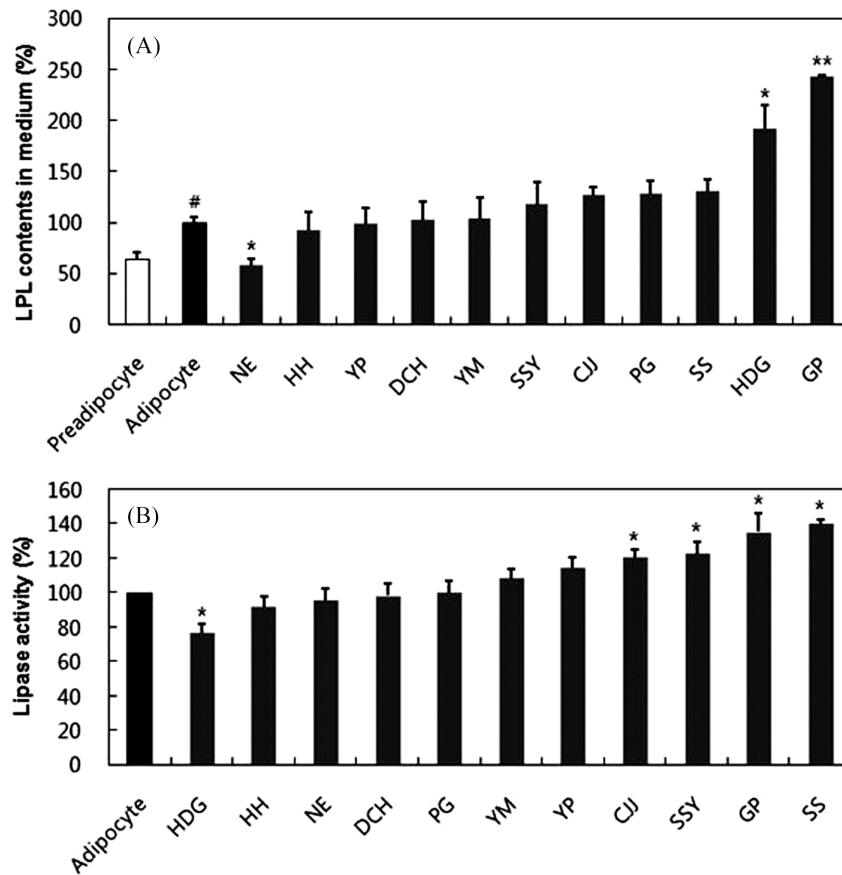


Fig. 1. Comparison of lipoprotein lipase (LPL) content and activity by anti-obesity herb treatment. (A) Comparison of lipoprotein lipase (LPL) contents in culture medium. (B) Comparison of lipoprotein lipase (LPL) activity in cell extracts. Each bar represents the mean±standard deviation (SD) from three independent experiments. # $p<0.05$ compared to preadipocytes. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ compared to adipocytes. NE: *Sarcodon aspratus*, HH: *Foeniculum fructus*, YP: *Allium cepa*, DCH: *Cordyceps militaris*, YM: *Coix lacrymajobi*, SSY: *Corni fructus*, CJI: *Plantago asiatica* L., PG: *Lentinus edodes*, SS: *Crataegus pinnatifida* Bunge, HDG: *Rosa rugosa*, GP: *Cinnamomum cassia* Blume.

Western blot analysis

동일한 양의 단백질과 β-mercapto-ethanol을 포함한 sample buffer를 3:1로 혼합한 후 100°C에서 3분간 가열하였다. 준비된 단백질 샘플은 SDS-PAGE 후 polyvinylidene fluoride membrane (0.45 μm, PVDF transfer membrane, Thermo, Rockford, IL, USA)으로 단백질을 전이하였다. Membrane은 0.1% Tween 20과 5% skim milk를 함유한 Tris-buffered saline (TBS)에 2시간 동안 blocking 하였다. 그 후 C/EBPβ (500:1) 1차 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)가 첨가된 buffer에서 1시간 동안 반응하고 TBS-T (TBS containing 0.1% tween-20)로 5분 단위로 3차례에 걸쳐 세척하였다. 그런 다음 membrane은 2차 anti-rabbit IgG conjugates horseradish peroxidase antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)가 첨가된 buffer (2,000:1)를 넣고 상온에서 1시간 동안 반응한 후 다시 5분 단위로 3차례에 걸쳐 세척하였다. 발색은 enhanced chemiluminescence method를 이용하여 x-ray 필름에 감광시켰다. 그 밴드의 강도는 imageJ (National institutes of health, Bethesda, MD, USA) 소프트웨어를 이용하여 분석 정량하였다.

통계분석

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 SPSS (Statistical Package for Social Sciences) program을 이용하여 mean±SD로 표시하

였고, one-way ANOVA test 후 Duncan's multiple range test에 의해 $p<0.05$ 수준에서 각 실험군 간의 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

항비만소재 처리에 의한 lipoprotein lipase (LPL)의 함량 및 활성 변화 측정

LPL은 lipoprotein triglyceride를 free fatty acid와 monoglyceride로 분해하는 첫 번째 효소로서 지방의 분해와 조직내 지방의 축적에 주요 기능을 하는 것으로 알려져 있다(26). 그러므로 LPL의 억제를 통해 항비만 효과를 나타내는 천연소재를 탐색하고자 11종의 항비만 소재를 연구논문을 바탕으로 선별하고 그 중 LPL의 분비 및 활성 조절에 영향을 미치는 소재의 선별을 위해 스크린을 수행하였다. 3T3-L1세포를 분화하여 adipocyte를 생성한 후 11종의 소재를 각각 처리하였을 때 배양매지에 분비되는 LPL의 함량을 ELISA방법을 이용하여 측정하였다. 그 결과 Fig. 1A에 정리된 바와 같이 0.25 mg/mL 능이추출물(NE)을 24시간 처리한 군(58.34%)에서 소재를 처리하지 않은 adipocyte 군(100%)과 비교하였을 때 유의한 수준으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 반면 해당근(HDG, 192%)과 계피(GP, 243.61%)의 경우 adipocyte군에 비해 높은 증가량을 나타내었다. 배지에 분비된 LPL의 함량은 활성을 측정하기에는 미량이어서 3T3-L1 adipocyte 추출

Table 3. The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of *Sarcodon aspratus* (NE) water extract

Anti-oxidant experiments	IC ₅₀ (mg/mL)	
	Ascorbic acid	NE
DPPH radical scavenging activity	0.03	2.86
ABTS radical scavenging activity	0.09	4.09
Reducing power	0.07	3.73
SOD-like activity	0.13	11.39

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, ABTS: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline- 6-sulphonic acid

단백질을 이용하여 활성을 측정하였다. 동일 양의 LPL 단백질이 결합된 plate에 각각의 소재를 30분간 처리한 후 활성의 변화를 측정한 결과, Fig. 1B에 정리된 바와 같이 해당근(HDG, 77.71%)은 adipocyte군(100%)와 비교하여 유의한 수준의 활성 억제 효과를 나타내었으며 차전자(CJJ, 120.73%), 산수유(SSY, 123%), 계피(GP, 135.30%), 산사(SS, 140.41%)는 활성증가효과를 나타내었다. 실험결과를 바탕으로 LPL의 함량 또는 활성을 증가시키거나 영향을 미치지 않는 소재는 탈락시키고, LPL저해 소재로 분비억제 기능이 우수하지만 효소활성에는 영향을 미치지 못한 NE를 선택하였다. 해당근(HDG)은 효소활성 억제기능은 우수하였으나 분비량을 증가시키는 것이 관찰되어 소재로 선택하지 않았다.

능이추출물(NE)의 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 및 항산화 활성 측정

폴리페놀 화합물은 phenolic hydroxy group을 지닌 방향족 화합물이며 다양한 구조와 분자량을 나타내는 2차 대사산물로 식물계에 널리 분포하고 있다(27). 폴리페놀 화합물은 항산화, 항균, 항암 등 여러 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있으며, 일반적으로 총 폴리페놀 함량이 증가할수록 항산화 등의 생리활성이 증가하는 경향이 있다(27-29). 플라보노이드는 식물에 널리 분포하는 노란색 계통의 색소로 페놀 화합물에 속하며 항균, 항암, 항바이러스 및 항염증 등 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있다(27,30,31).

Galic acid와 quercetin을 폴리페놀과 플라보노이드의 표준물질로 각각 사용하여 NE의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드의 함량을 측정한 결과 16.61, 6.58 mg/g의 함량이 각각 확인되었다. 이 결과는 Lee 등(32)이 보고한 폴리페놀함량(16.23 mg/g)과 비슷한 결과임을 확인할 수 있었고, Qi 등(33)이 보고한 표고버섯(10.00 mg/g), 아가리쿠스버섯(13.30 mg/g)의 폴리페놀함량과 비슷한 수준이지만 동충하초(41.10 mg/g), 영지버섯(49.40 mg/g), 차가버섯(209 mg/g), 상황버섯(317 mg/g)의 함량에는 미치지 못했다. 또한 플라보노이드는 동충하초(9.10 mg/g)의 함량과 가까운 수준이었고 표고버섯(0.01 mg/g), 아가리쿠스버섯(0.01 mg/g) 보다는 월등하게 높으며 영지버섯(15.50 mg/g), 차가버섯(19 mg/g), 상황버섯(35.70 mg/g)보다는 낮은 수치였다. Yoshikawa 등(34)과 Pak-Dek 등(35)의 연구에서 폴리페놀 및 플라보노이드가 LPL의 활성을 억제할 수 있음이 보고되었으나 본 실험의 NE는 위의 실험 결과에서도 관찰된 바와 같이 활성보다는 LPL 단백질 분비억제에 효능을 가진 성분이 함유된 것으로 판단된다.

항산화활성을 확인하기 위해 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium (ABTS) 라디칼 소거능, 환원력, superoxide dismutase (SOD) 유사활성을 측정하였다. 그 결과는 Table 3에 정리된

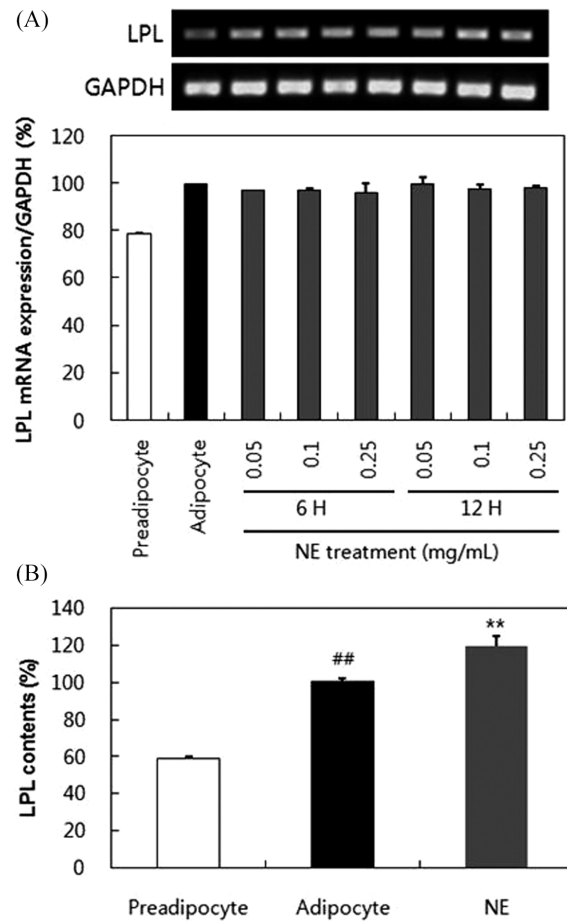


Fig. 2. Lipoprotein lipase (LPL) expression in 3T3-L1 adipocytes. (A) LPL mRNA expression by treatment of *Sarcodon aspratus* water extract (NE) (0.05, 0.1, 0.25 mg/mL) for 6 and 12 h. (B) Change in LPL content by NE (0.25 mg/mL) treatment for 12 h. Each bar represents the mean±standard deviation (SD) from three independent experiments. ##*p*<0.01 compared to preadipocytes. ***p*<0.01 compared to adipocytes.

바와 같이 2.86, 4.09, 3.73, 11.39 mg/mL의 IC₅₀값을 구할 수 있었으며 이는 control로 사용된 ascorbic acid의 약 1/50-1/100에 해당하는 값으로 비교적 낮은 항산화 활성을 확인할 수 있었다. 항산화 활성은 비만에 의해 유도된 활성산소종과 산화스트레스를 감소시키는 것으로 잘 보고되어 있지만(4) 본 실험의 NE는 항산화활성이 낮아 비만에 의한 활성산소종 및 산화스트레스 감소에는 효과가 적을 것으로 판단된다.

Lipoprotein lipase (LPL) mRNA 발현 및 세포내 LPL단백질 함량에 미치는 능이추출물 (NE)의 영향

Fig. 1의 결과를 통해 LPL의 분비량이 NE에 의해 감소되는 것을 확인한 바 있어 그 원인이 mRNA 발현 조절에 있는지 확인하기 위해 세포내 LPL mRNA 발현을 RT-PCR을 통해 확인하였다. 그 결과 Fig. 2A에서 보는 바와 같이 소재의 농도별, 시간별 처리에 따른 발현의 차이는 관찰되지 않았다. 이를 통해 처리된 NE는 LPL의 유전자 발현에는 영향을 미치지 못하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 세포내 LPL 단백질의 함량을 ELISA assay를 통해 확인한 결과 preadipocyte군에 함유된 LPL 단백질 (59.62%)이 adipocyte군(100%)에서 유의하게 증가한 것을 확인할

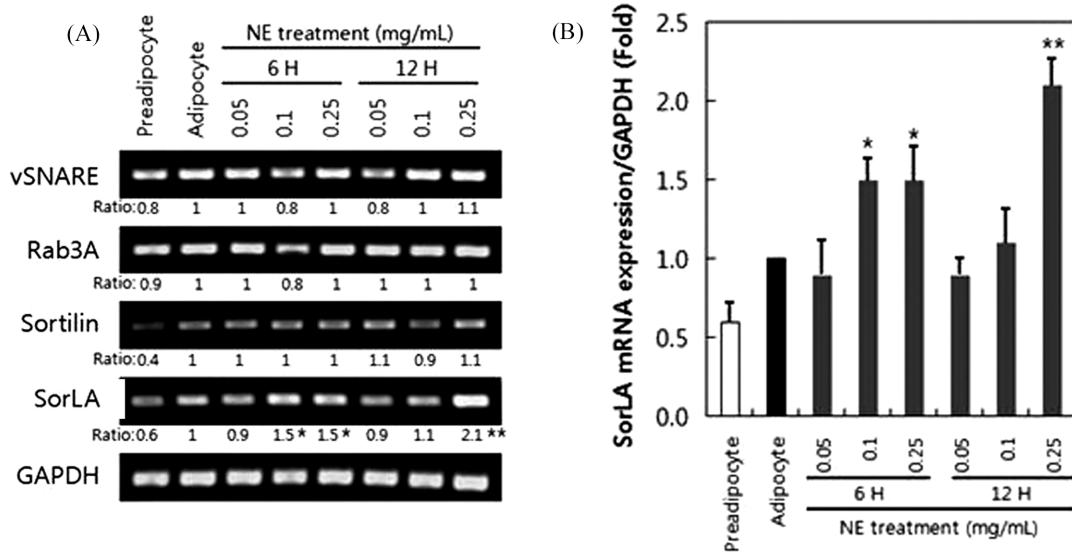


Fig. 3. Effect of *Sarcodon aspratus* water extract (NE) (0.05, 0.1, 0.25 mg/mL) treatment for 6 and 12 h on the mRNA expression levels of protein transport-related biomarkers in 3T3-L1 adipocytes. The quantitative densities of the bands were analyzed using Image J software. Each bar represents the mean±standard deviation (SD) from three independent experiments. **p*<0.05, ***p*<0.01 compared to adipocytes.

수 있었으며 또한 0.25 mg/mL의 NE를 처리한 3T3-L1 adipocyte (119.33%)에서 소재를 처리하지 않은 adipocyte군보다 유의하게 LPL단백질이 증가한 것이 관찰되었다. 이는 Fig. 1에서 보여준 LPL의 분비량 감소와 다른 결과이며, 세포내 생성된 LPL이 분비되지 못하고 세포내에 축적된 것임을 유추할 수 있다. 따라서 세포내 LPL 단백질의 축적원인을 찾고자 다음 실험을 수행하였다.

능이추출물(NE)이 단백질 운반 인자에 미치는 영향

vSNARE는 수송소포를 선별적으로 표적 막에 융합시키는 과정에 관여하는 단백질로서, soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment proteins (SNAPs) receptor protein superfamily에 속하는 SNARE 단백질들 중 하나이다. SNARE는 vSNARE (vesicle SNARE)와 tSNARE (target SNARE)로 나눌 수 있으며 vSNARE는 수송소포에, tSNARE는 표적막에 존재하며 이들은 서로 docking하여 fusion하는 역할을 함으로서 세포의 분비과정에 관여한다(36). Rab3A는 small GTP-binding protein superfamily로서 Rab family에 속하며, Ca²⁺ 의존성 exocytosis를 조절하는 역할을 한다고 보고되었다(37). Sortilin은 N-terminal Vsp10p (vacuolar protein sorting defective) domain을 가지며 type-1 transmembrane receptor family에 속하는 endocytic receptor로서 골지체, 세포막에 주로 존재하며 LPL과 결합 후 분해에 관여하는 것으로 알려져 있다(38,39). SorLA (sortilin-related receptor)도 sortilin과 같은 family에 속하는 receptor로서 endocytic activity와 세포내 vesicle들의 이동에 관여하는 것이 알려져 있다(38,40). 또한 SorLA의 발현이 LPL의 세포내 분포를 변화시키고, lysosome으로 운반하여 분해함으로써 LPL의 활성을 조절한다고 보고되어 있다(40). 이러한 연구결과들을 바탕으로 vSNARE, Rab3A, Sortilin 및 SorLA의 발현변화에 NE가 미치는 영향을 RT-PCR을 통해 확인하였다. 그 결과 Fig. 3A에 정리된 바와 같이 vSNARE, Rab3A, Sortilin는 NE의 농도별, 시간별 처리에 따라 변화가 관찰되지 않은 반면 SorLA는 NE의 처리농도 및 시간에 따라 발현이 변화하

는 것을 관찰할 수 있었다. 즉, 소재를 처리하지 않은 adipocyte 군(1 fold)과 비교하였을 때 6시간 처리군에서 0.1 mg/mL (1.5 fold)과 0.25 mg/mL (1.5 fold) 농도의 NE 처리가 유의한 SorLA mRNA의 발현을 유도하였으며, 12시간 처리군에서 0.25 mg/mL (2.1 fold) 농도의 NE 처리가 더욱 높은 SorLA mRNA 발현을 유도하는 것이 관찰되었다. 이를 통해 NE의 처리가 SorLA의 발현을 유도하여 endocytic activity 증가를 통한 LPL의 분비감소와 세포내 LPL의 분해에 관여함을 유추할 수 있었다. 그러나 구체적인 SorLA 단백질과 LPL의 결합과 이동에 NE가 미치는 영향에 대한 연구가 추가적으로 진행되어야 할 것으로 판단된다.

능이추출물(NE)이 SorLA promoter에 미치는 영향

SorLA의 발현에 NE가 미치는 영향을 확인하기 위해 SorLA의 promoter 정보를 검토하였다. 그 결과 Hirayama 등(41)의 연구에서 transcription factor인 activator protein 1 (AP-1), CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBP)β, Hepatocyte nuclear factor (HNF)-5가 SorLA promoter에 작용할 수 있음을 확인할 수 있었다. 그 중 간세포에서 작용하는 HNF-5를 제외한 PEA-1, C/EBPβ의 mRNA발현을 RT-PCR을 통해 확인하였다(data not shown). 그 결과 Fig. 4A에 정리한 바와 같이 C/EBPβ만이 NE 처리에 의해 발현이 변화되는 것을 확인할 수 있었다. 이를 바탕으로 C/EBPβ 단백질 발현을 확인한 결과 Fig. 4B에 정리된 바와 같이 NE 처리 전에 cytosol에 더 많은 양이 존재하던 C/EBPβ 단백질이 NE 0.25 mg/mL을 6시간 처리한 후 nuclear에 더 많이 분포하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 NE의 처리가 SorLA promoter에 작용이 가능한 C/EBPβ 단백질을 nuclear로 유도하여 SorLA의 mRNA 발현을 유도함으로써 증가된 SorLA가 LPL과 결합하여 endocytic activity증가 또는 lysosome으로 운반하여 LPL을 분해함으로써 LPL의 분비 및 활성감소를 유도하는 것으로 유추할 수 있었다. 그러나 구체적인 promoter 조절기전에 대한 실험이 추가되어야 할 것으로 판단된다.

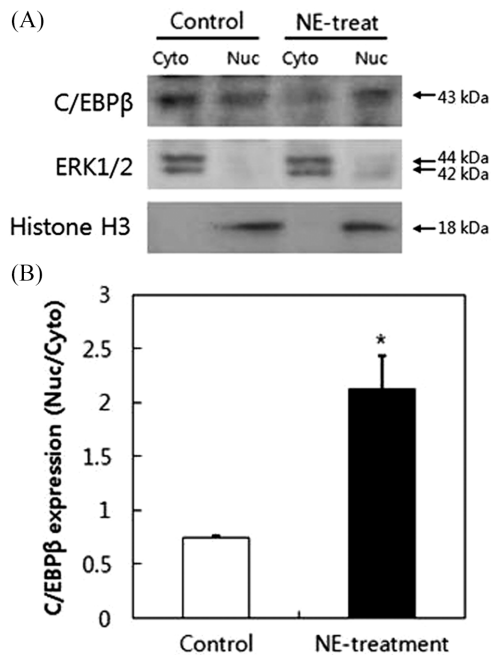


Fig. 4. Effect of *Sarcodon aspratus* water extract (NE) treatment on C/EBP β expression in 3T3-L1 adipocytes. (A) C/EBP β mRNA expression induced by treatment with NE (0.05, 0.1, and 0.25 mg/mL) for 6 h. (B) C/EBP β protein expression in the cytosol and nuclear fraction of 3T3-L1 adipocytes by treatment with NE water extract (0.25 mg/mL) for 6 h. The quantitative densities of the bands were analyzed using Image J software. Each bar represents the mean \pm standard deviation (SD) from three independent experiments. * p <0.05 compared to the control. ERK1/2: cytosol fraction biomarker, histone H3: nuclear fraction biomarker.

요 약

본 연구에는 항비만소재로 연구되어진 11종의 소재를 대상으로 lipoprotein lipase (LPL)의 억제효능을 확인하고자 배양배지내 LPL의 함량과 LPL 효소활성을 측정하였다. 그 결과 3T3-L1 adipocyte에서 LPL의 분비를 억제하는 소재로 능이추출물(NE)을 선택할 수 있었다. 선택된 NE의 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 측정된 결과 16.61 \pm 0.44 mg/g과 6.58 \pm 0.01 mg/g이 각각 확인되었다. NE의 LPL 분비억제기작을 확인하기위해 먼저 세포내 LPL 단백질의 함량과 mRNA 발현을 확인하였다. 그 결과 함량이 감소했던 배양배지와는 다르게 NE를 처리한 3T3-L1 adipocyte의 세포내 LPL은 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있었으며 mRNA의 발현에는 영향이 없음을 관찰할 수 있었다. 이를 바탕으로 생성된 LPL 단백질의 exocytosis에 문제가 발생했을 것으로 유추하고 다양한 단백질 이동 관련 유전자의 발현을 확인하였다. 그 결과 LPL의 이동과 분해에 관여하여 세포내 LPL의 활성을 조절하는 것으로 알려진 SorLA의 발현이 증가하는 것을 확인하고 이를 조절하는 transcription factor의 발현과 nuclear로의 이동에 NE가 미치는 영향을 검토하였다. 그 결과 NE를 처리함으로써 SorLA promoter에 작용하는 C/EBP β 의 단백질 발현이 nuclear에서 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구를 통해 NE가 SorLA 유전자의 transcription factor인 C/EBP β 의 단백질 발현을 nuclear에서 증가시킴으로써 결과적으로 LPL의 분비억제가 가능함을 확인할 수 있었으며 이는 NE의 항비만 효과기전을 설명하는 기초자료를 제공하는 것이라 사료된다.

감사의 글

본 결과물은 농림축산식품부 고부가가치 식품개발사업(312001-03-01-HD040), 강원웰빙특산물산업화지역혁신센터(B0009702) 및 강원대학교 생명공학연구소(320130015)의 일부 지원으로 수행한 연구 결과로 이에 감사드립니다.

References

- Wang H, Eckel RH. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am. J. Physiol.-Endoc. M.* 297: E271-E288 (2009)
- Braun JE, Severson DL. Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem. J.* 287: 337-347 (1992)
- Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 404: 635-643 (2000)
- Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sánchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-González JA. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 3117-3132 (2011)
- Moreno DA, Ilic N, Poulev A, Brasaemle DL, Fried SK, Raskin I. Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. *Nutrition* 19: 876-879 (2003)
- Baek JM, Lee JS, Kim KK, Kim TW, Kim DJ, Kim CA, Tsutomu K, Ochir S, Lee KY, Park CH, Lee YJ, Choe M. Inhibitory effects of *Capsicum annuum* L. water extracts on lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 cells. *Nutr. Res. Pract.* 7: 96-102 (2013)
- Park SJ, Lee IS, Lee SP, Yu MH. Inhibition of adipocyte differentiation and adipogenesis by supercritical fluid extracts and marc from *Cinnamomum verum*. *J. Life Sci.* 23: 510-517 (2013)
- Kim YJ, Kim BH, Lee SY, Kim MS, Park CS, Rhee MS, Lee KH, Kim DS. Screening of medicinal plants for development of functional food ingredients with anti-obesity. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 49: 221-226 (2006)
- Han XQ, Chai XY, Jia YM, Han CX, Tu PF. Structure elucidation and immunological activity of a novel polysaccharide from the fruit bodies of an edible mushroom, *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito. *Int. J. Biol. Macromol.* 47: 420-424 (2010)
- Lee KS, Kim JB. Effects of the *Sarcodon aspratus* on the high level of blood lipid and obesity induced by high fat-diet in rat. *J. Life Sci.* 19: 1265-1270 (2009)
- Koo BS, Lee MS. Effects of *Cordyceps militaris* extract powder on plasma lipids and glucose in rats. *J. Korean Soc. Food Cult.* 19: 217-222 (2004)
- Ban SS, Yoon HD, Shin OC, Shin YJ, Park CS, Park JH, Seo BI. The effects of *Artemisia capillaris*, *Ponciri fructus* and *Carya fructus* in obese rats induced by high fat diet. *Korean J. Herbology* 21: 55-67 (2006)
- Lim JM, Li GZ, Chai OH, Song CH. Inhibitory effect of *Corni fructus* on compound 48/80-induced mast cell activation and vascular permeability. *Korean J. Phys. Anthropol.* 17: 19-30 (2004)
- Shin JH, Cha GY, Kim HJ, Hwang JH, Han KH, Seo HJ, Shin TS, Oh SJ, Kim JD. Examination of anti-obesity effect of regional special natural products of *Anthriscus radix*, *Psoralea semen*, *Siegesbeckia herba* and *Corni fructus*. *KSBB J.* 24: 549-555 (2009)
- Kang WY, Kim MY, Jin JY, Yang HK, Hong HJ, Kim DG, Han CH, Lee YJ. Anti-obesity effects of onion juice in high fat diet-induced obese rats. *Korean J. Vet. Res.* 50: 1-10 (2010)
- Yoshinari O, Shiojima Y, Igarashi K. Anti-obesity effects of onion extract in Zucker diabetic fatty rats. *Nutrients* 4: 1518-1526 (2012)
- Kim SG, An GH, Yoon SW, Lee YC, Ha SD. A study on dietary supplement to reduce obesity by the mechanism of decreasing lipid and carbohydrate absorption. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 519-526 (2003)
- Lee HJ, Chung MJ, Kim DJ, Choe M. Effects of *Oenanthe javanica*, *Coicis lachryma-jobi* L. var., and *Plantaginis asiatica* L.

- water extracts on activities of key enzymes on lipid metabolism. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 38: 1516-1521 (2009)
19. Lee MR, Oh DS, Wee AJ, Yun BS, Jang SA, Sung CK. Anti-obesity effects of *Lentinus edodes* on obese mice induced by high fat diet. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 43: 194-199 (2014)
 20. Jung HJ, Nam JH, Choi JW, Lee KT, Park HJ. 19a-Hydroxyursane-type triterpenoids: Antinociceptive anti-inflammatory principles of the roots of *Rosa rugosa*. Biol. Pharm. Bull. 28: 101-104 (2005)
 21. Park HJ, Nam JH, Jung HJ, Lee MS, Lee KT, Jung MH, Choi JW. Inhibitory effect of euscaphic acid and tormentic acid from the roots of *Rosa rugosa* on high fat diet-induced obesity in the rat. Kor. J. Pharmacogn. 36: 324-331 (2005)
 22. Seo DJ, Kim JM, Kim TH, Baek JM, Kim TW, Kim HS, Choe M. Anti-obesity effects of *Foeniculum fructus* water extract. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 39: 1604-1610 (2010)
 23. Oh SD, Kim M, Min BI, Choi GS, Kim SK, Bae H, Kang C, Kim DG, Park BJ, Kim CK. Effect of *Achyranthes bidentata* blume on 3T3-L1 adipogenesis and rats fed with a high-fat diet. Evid.-Based Compl. Alt. 2014: Article ID 158018 (2014)
 24. Feng Z, Hai-ning Y, Xiao-man C, Zun-chen W, Sheng-rong S, Das UN. Effect of yellow capsicum extract on proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. Nutrition 30: 319-325 (2014)
 25. Lee SM, Kang YH, Kim DJ, Kim KK, Lim JG, Kim TW, Choe M. Comparison of antioxidant and α -glucosidase inhibition activities among water extracts and sugar immersion extracts of green pepper, purslane and shiitake. J. East Asian Soc. Dietary Life 24: 101-108 (2014)
 26. Goldberg IJ, Merkel M. Lipoprotein lipase: Physiology, biochemistry, and molecular biology. Front. Biosci. 6: D388-405 (2001)
 27. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutr. Rev. 56: 317-333 (1998)
 28. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. Am. J. Clin. Nutr. 79: 727-747 (2004)
 29. Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. Korean J. Food Sci. Technol. 36: 333-338 (2004)
 30. Kim EJ, Choi JY, Yu MR, Kim MY, Lee SH, Lee BH. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. Korean J. Food Sci. Technol. 44: 337-342 (2012)
 31. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. Sci. World J. 2013: Article ID 162750 (2013)
 32. Lee HJ, Do JR, Jung SK, Kim HK. Physiological properties of *Sarcodon aspratus* extracts by ethanol concentration. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 43: 656-660 (2014)
 33. Qi Y, Zhao X, Lim YI, Park KY. Antioxidant and anticancer effects of edible and medicinal mushrooms. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 42: 655-662 (2013)
 34. Yoshikawa M, Shimoda H, Nishida N, Takada M, Matsuda H. *Salacia reticulata* and its polyphenolic constituents with lipase inhibitory and lipolytic activities have mild antiobesity effects in rats. J. Nutr. 132: 1819-1824 (2002)
 35. Pak-Dek MS, Abdul-Hamid A, Osman A, Soh CS. Inhibitory effect of *Morinda citrifolia* L. on lipoprotein lipase activity. J. Food Sci. 73: C595-C598 (2008)
 36. Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. Nature 362: 318-324 (1993)
 37. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. Physiol. Rev. 81: 153-208 (2001)
 38. Hermey G. The Vps10p-domain receptor family. Cell Mol. Life Sci. 66: 2677-2689 (2009)
 39. Nielsen MS, Jacobsen C, Olivecrona G, Gliemann J, Petersen CM. Sortilin/neurotensin receptor-3 binds and mediates degradation of lipoprotein lipase. J. Biol. Chem. 274: 8832-8836 (1999)
 40. Klinger SC, Glerup S, Raarup MK, Mari MC, Nyegaard M, Koster G, Prabakaran T, Nilsson SK, Kjaergaard MM, Bakke O, Nykjær A, Olivecrona G, Petersen CM, Nielsen MS. SorLA regulates the activity of lipoprotein lipase by intracellular trafficking. J. Cell Sci. 124: 1095-1105 (2011)
 41. Hirayama S, Bujo H, Yamazaki H, Kanaki T, Takahashi K, Kobayashi J, Schneider WJ, Saito Y. Differential expression of LR11 during proliferation and differentiation of cultured neuroblastoma cells. Biochem. Biophys. Res. Co. 275: 365-373 (2000)