

## 인삼 다당체의 항비만 활성 평가 및 기능성 소재 개발

손명수<sup>#</sup>, 김교남<sup>\*</sup>

경남대학교 식품영양생명학과

### Anti-obese Function of Polysaccharides derived from Korean Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) and Development of Functional Food Material in Preventing Obesity

Myung-Soo Shon<sup>#</sup>, Gyo-Nam Kim<sup>\*</sup>

Department of Food, Nutrition and Biotechnology, Kyungnam University

#### ABSTRACT

**Objectives** : Adipogenesis was defined as a differentiation process of preadipocytes into the adipocytes. Thus, to control of this process can be one of the most important strategies to prevent obesity. Korean ginseng(*Panax ginseng* C.A. Meyer) is one of the most widely used medicinal herbs. Although multiple biological activities of Korean ginseng, particularly ginsenosides, have been known, the anti-adipogenic role and function of polysaccharides from Korean ginseng are still unclear. In this study, we examined anti-adipogenic activity of polysaccharides and its molecular basis mechanisms are further investigated.

**Methods** : The cytotoxicity of KGP in 3T3-L1 was evaluated by MTT assay. Anti-adipogenic effect of KGP was examined by Oil Red O (ORO) staining and microscopy observation in 3T3-L1 mature adipocytes. The mRNA expression levels of adipogenic transcriptional factors were analyzed by reverse transcription-polymer chain reaction (RT-PCR). To elucidate the adipogenic molecular mechanism of KGP, SB431542 (TGF- $\beta$  specific inhibitor) was used.

**Results** : We found that polysaccharides showed no effect on the viability of 3T3-L1 preadipocytes. Dose dependent inhibitory effect of polysaccharides on 3T3-L1 adipogenesis was observed as judged by ORO staining and microscopic image analysis. To obtain further mechanistic insight into anti-adipogenic function of polysaccharides, we then tested the effect of polysaccharides treatment on the adipogenic marker genes. The mRNA expressions level of C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , C/EBP $\beta$ , and fatty acid synthase (FAS) were dose-dependently inhibited by KGP treatment in 3T3-L1 mature adipocytes.

**Conclusions** : In conclusion, these findings suggest that the KGP could be used in treatment of obesity and over-weight related diseases.

**Key words** : Korean ginseng, adipogenesis, obesity, polysaccharides, 3T3-L1.

## I. 서 론

비만은 단순히 체중이 증가하는 것을 지칭하는 것이 아니라 체지방이 과잉축적된 상태를 의미한다. 최근 경제적으로 급격한 발전과 더불어 과거 생명을 위협하였던 급성 감염성 질환은

감소하고 있으나 비만을 비롯한 대사성 질환의 유병률은 점점 증가하는 추세이다. 비만은 특히 고혈압, 당뇨, 관상동맥질환, 그리고 암 등의 발생 위험성을 증가시키는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 비만은 비정상적인 지방세포 크기 (hypertrophy)와 숫자의 증가 (hyperplasia)가 지방축적의 직접적인 원인으로

\*Corresponding author : Gyo-Nam Kim, Department of Food, Nutrition and Biotechnology, Kyungnam University.  
· Tel : +82-55-249-6330 · E-mail : gnkim@kyungnam.ac.kr

#First author : Myung-Soo Shon, Department of Food, Nutrition and Biotechnology, Kyungnam University.  
· Tel : +82-55-295-1611 · E-mail : shonms89@naver.com

· Received : 14 June 2016 · Revised : 3 July 2016 · Accepted : 18 July 2016

알려져 있으며, 특히 지방세포의 숫자가 증가하는 hyperplasia는 전지방세포가 지방세포로 분화되는 과정, 즉 adipogenesis와 밀접한 관련이 있다<sup>2)</sup>. Adipogenesis는 일생동안 지속적으로 반복되며<sup>3)</sup>, 이 과정은 호르몬, 영양소, adipokine, 그리고 다양한 염증성 cytokine 등에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다.

Adipogenesis 과정은 peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) 그리고 CCAAT/enhancer binding protein family (C/EBPs) 등의 전사인자들에 의해 직간접적으로 조절된다고 알려져 있으며 PPARs는 steroid/thyroid 호르몬 수용체 superfamily로 PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , 그리고 PPAR $\delta$  등이 확인되었다<sup>4)</sup>. 일반적으로 C/EBP $\beta$ 는 adipogenesis 과정 초기에 발현되어 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 발현을 유도하고 다양한 세포신호전달과정에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다<sup>2)</sup>. Preadipocyte factor-1 (Pref-1)<sup>5)</sup>, Wnt signaling<sup>6)</sup>, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), 그리고 transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 신호전달과정의 활성화는 adipogenesis를 억제하는 것으로 보고되었다<sup>7,8)</sup>. 따라서 전지방세포가 지방세포로 분화되는 adipogenesis 과정의 조절은 비만예방 및 관리에 있어 중요한 타겟이라 할 수 있다.

고려인삼 (Korean ginseng, *Panax ginseng* C.A. meyer)은 두릅나무과에 속하는 여러해살이풀로 아시아 지역을 중심으로 전 세계적으로 가장 많이 재배되는 약용식물이다. 인삼의 항산화<sup>9)</sup>, 항당뇨<sup>10)</sup> 및 항암<sup>11)</sup> 등 다양한 생리학적 효능이 보고되었으며, 주요 생리활성 성분으로 ginsenosides, polysaccharides, 질소 화합물, 아미노산, phytosterol, 그리고 필수 지방산 등이 알려져 있다. 하지만 대부분의 연구가 인삼의 ginsenosides 및 면역증진 활성에 국한되어 있어 인삼의 활용방안 및 새로운 기능성 탐색을 위한 연구가 다양하게 요구된다.

따라서 본 연구는 6년근 인삼에서 추출한 다당체 (KGP, polysaccharides prepared from Korean ginseng)를 활용하여 인간유래 3T3-L1 세포에서 adipogenesis 억제를 통한 항비만 활성을 평가하고, KGP의 항비만 활성에 대한 분자생물학적 작용기전을 제시하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) KGP 시료의 준비

본 실험에 사용된 인삼 다당체 (Polysaccharide prepared from Korean Ginseng)는 한국인삼공사 (Daejeon, Korea)에서 제공받아 사용하였다. 6년근 인삼을 열수 추출하고 인삼 추출액과 인삼박을 분리하였다. 인삼 추출액은 72시간 동안 증류수에 투석하여 15,000rpm으로 원심분리하였다. 수용성 분획은 4배수의 80%(v/v) 에탄올에 4℃의 조건에서 12시간 침지시켰다. 인삼 조다당체는 증류수에 녹여 diethylaminoethyl cellulose sepharose CL-6B column으로 정제하였다. 본 실험에 사용된 KGP는 순도 99% 이상을 사용하였으며 수득률은 5%(w/w)였다.

### 2) 시약

Oil Red O (ORO), insulin, dexamethasone, isobutylmethylxanthine (IBMX), SB431542 그리고 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), and Hank's balanced salt solution (HBSS)은 Gibco BRL (Carlsbad, CA, USA), ethanol과 isopropanol은 (주)삼전에서, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), fetal calf serum (FCS), penicillin-streptomycin cocktail은 Gibco BRL, (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. TRIzol<sup>®</sup>과 SuperScriptII kit은 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 3T3-L1 세포의 배양 및 지방세포분화

본 실험에 사용된 마우스 유래 3T3-L1 세포는 American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA)에서 분양받아 사용하였다. 3T3-L1 전지방세포는 10% FCS와 100 unit/ml의 penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM 배지를 이용하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 환경에서 배양되었다. 3T3-L1 전지방세포를 지방세포로 분화시키기 위하여, 전지방세포가 confluent 상태가 된 2일 후 분화유도 배지로 교체하였으며, 분화유도 배지 (Differentiation medium; DM)로 교체한 날을 Day 0라 표기하였다. 분화유도 배지는 10% FBS와 100 unit/ml의 penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM 배지에 500  $\mu$ M의 isobutylmethylxanthine (IBMX), 1  $\mu$ M의 dexamethasone (DEX), 그리고 167 nM의 insulin을 포함하도록 준비하여 사용하였다. 분화유도 배지는 Day 0에서 Day 2까지 48시간 동안 사용하였다. Day 2에서 Day 6까지는 DMEM에 167 nM의 insulin만 포함된 분화유도 후 배지 (Post differentiation medium; Post-DM)를 사용하였으며, 지방세포분화는 Day 7에 종료하였다(Fig. 1).

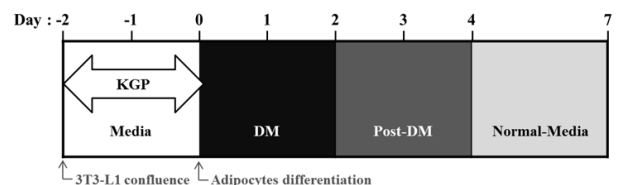


Fig. 1. Scheme of 3T3-L1 differentiation and KGP treatment DM: differentiation medium consist of FBS-DMEM, 0.5 mM IBMX, 5.2  $\mu$ M DEX, and 167 nM insulin; Post-DM: post-differentiation medium consist of FBS-DMEM and 167 nM insulin

### 2) KGP의 세포독성

3T3-L1 전지방세포에 대한 KGP의 세포독성은 MTT assay를 이용하여 분석하였다. 3T3-L1 전지방세포에 1, 10, 50, 100, 200, 400, 그리고 800  $\mu$ g/ml의 KGP를 24 h 처리한 후 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)에 5 mg/ml의 농도로 용해시킨 MTT 용액을 1 h 처리하였다. 처

리 후 DMEM 배지를 제거하고 37°C에 미리 데워진 1 ml의 PBS로 3T3-L1 전지방세포를 1회 씻어 주었다. 400  $\mu$  l의 dimethylsulfoxide (DMSO)를 이용하여 3T3-L1 전지방세포내의 MTT formazan을 녹인 후, DMSO에 용해된 MTT formazan을 96-well plate에 200  $\mu$  l/well 씩 옮겨 microplate reader (VersaMax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. KGP를 처리하지 않은 3T3-L1 세포를 대조군으로 하여 cell viability (% of control)를 계산하였다.

### 3) ORO 염색법에 의한 항비만 활성평가

KGP의 항비만 활성을 평가하기 위해서, 지방세포로 분화시킨 3T3-L1 세포의 지방축적량을 ORO 염색법을 통해 정성 및 정량분석 하였다. 3T3-L1 전지방세포는 1, 10, 50, 그리고 100  $\mu$  g/ml의 KGP에 Day -2에서 Day 0까지 48시간 동안 처리하였다. 지방세포분화는 위에 설명한 방법에 의하여 실시하였다. 분화된 3T3-L1 지방세포(Day 7)는 3%(v/v)의 formaldehyde로 1시간 동안 실온에서 고정시켰다. 고정된 세포는 3 mg/ml의 ORO를 이용해 1시간 동안 실온에서 염색시켰으며, 염색 후에는 증류수를 이용해 3회 씻어 주었다. ORO 정량분석은 염색된 12 well plate에 200  $\mu$  l의 isopropanol을 가하여 세포내 ORO를 녹인 후 96-well plate 50  $\mu$  l/well 씩 옮겨 ELISA reader (VersaMax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)을 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. KGP를 처리하지 않은 분화된 지방세포를 대조군으로 하여 lipid accumulation (% of control)을 계산하였다.

### 4) Microscopy observation

분화된 3T3-L1 지방세포의 지방구(lipid droplet)의 수와 크기는 현미경 관찰을 통해 정성 분석 하였다. 위의 처리방법과 동일하게 3T3-L1 전지방세포는 10, 그리고 50  $\mu$  M의 KGP에 Day -2에서 Day 0까지 48시간 동안 처리하였다. 지방분화는 위의 방법과 동일하게 실시하였다. 분화된 Day 7의 3T3-L1 지방세포를 3%(v/v)의 formaldehyde를 이용해 실온에서 1시간 동안 고정시킨 후, 건조방지를 위해 PBS를 채운 후 현미경으로 관찰하였다.

### 5) RT-PCR을 통한 유전자의 발현수준 분석

3T3-L1 전지방세포는 1, 10, 50, 그리고 100  $\mu$  g/ml의 KGP에 Day -2에서 Day 0까지 48시간 동안 처리되었다. 지방세포분화는 위에 설명한 방법에 의하여 실시하였으며 Day 7에 200  $\mu$  l의 TRIzol<sup>®</sup>을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출된 total RNA에 100  $\mu$  l의 chloroform을 넣고 15분 동안 상온에 정치한 뒤 14,000rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 얻은 상층액에 isopropanol 80  $\mu$  l를 넣고 15분 동안 상온에 한번 더 정치한 다음 14,000rpm에서 15분간 원심분리하여 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA는 정량한 뒤 SuperScriptII kit (Invitrogen)을 이용하여 42°C에서 1시간 동안 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 30 cycle 수준으로 thermal cycler (Bio-Rad)를 이용하여 PCR을 수행한 후 1%(w/v) 아가로스 젤에 전기영동 하여 mRNA 유전자 발현

수준을 분석하였다. 본 실험에 사용된 C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , PPAR $\gamma$ , FAS, 그리고  $\beta$ -actin의 primer sequences는 Table 1과 같다.

### 6) Inhibitor assay

3T3-L1 전지방세포는 100  $\mu$  g/ml의 KGP에 Day -2에서 Day 0까지 48시간 동안 처리되었다. 본 실험에서는 TGF- $\beta$  선택적 저해제(inhibitor)인 5  $\mu$  M의 SB431542를 KGP와 같이 처리하였다. 그리고 Day 7에 위의 방법과 동일하게 ORO 염색법 및 microscopy observation을 실시하여 SB431542가 KGP에 의해 억제된 adipogenesis 분화에 영향을 미치는 지에 대한 분석을 실시하였다.

### 7) 통계분석

모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표현하였으며, 데이터의 통계처리는 Statistical Package for Social Science (SPSS, Chicago, USA)을 이용하여 분석하였다. 신뢰수준 p<.05에서 평균값들에 대한 유의성을 검증하였다. 각 항목은 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 시행하였으며, Student t-test 방법에 의하여 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다(\*<.05, \*\*<.01, 그리고 \*\*\*<.001).

Table 1. Primer Sequences for Polymerase Chain Reaction Analysis

Name	Forward (5' $\rightarrow$ 3')	Reverse (5' $\rightarrow$ 3')
C/EBP $\alpha$	CCAGAGGATGGTTTCGGGTC	TCCCCAACACCTAAGTCCCT
C/EBP $\beta$	AGCGGCTGCAGAAGAAGGT	GGCAGCTGCTTGAACAAGTTC
PPAR $\gamma$	CCCAATGGTTGCTGATTACAAAT	CTACTTTGATCGCACTTTGGTATTCT
FAS	GTGCACACAGTGCTCAAAGG	GGTATAGACACGGGCACAG
$\beta$ -Actin	AGGGAAATCGTGCGTGACAT	AGCTCAGTAACAGTCCGCCT

## III. 결 과

### 1. 3T3-L1 세포에서 KGP의 세포독성

3T3-L1 세포에서 KGP의 세포독성을 확인하고자 MTT assay를 실시하였다. 1, 10, 50, 100, 200, 400, 그리고 800  $\mu$  g/ml의 KGP를 3T3-L1 전지방세포에 24시간 동안 처리한 결과, KGP를 처리하지 않은 대조군 대비 98.82%, 99.19%, 101.52%, 97.60%, 91.78%, 81.19%, 그리고 85.72%의 세포 생존률을 나타냈다. 1-800  $\mu$  g/ml의 KGP를 처리하였을 때 세포독성에 유의적인 영향을 미치지 않았으나, 400, 그리고 800  $\mu$  g/ml의 KGP를 처리하였을 때 유의적이진 않지만 3T3-L1 세포의 생존률이 감소하는 경향을 나타냈다(Fig. 2). 따라서 이후 실험에서는 독성이 나타나지 않는 100  $\mu$  g/ml 이내의 농도를 선택하여 사용하였다.

### 2. 3T3-L1 세포에서 KGP의 adipogenesis 억제 활성

KGP의 항비만 활성을 평가하기 위하여 3T3-L1 지방세포

분화모델을 이용하였으며, 분화유도과정이 끝난 후 ORO 염색법을 실시하였다. 3T3-L1 세포는 비만연구에 가장 널리 사용되는 세포모델 중의 하나이다. ORO 염색시약은 중성지질, 콜레스테롤 등과 결합하며, 염색된 세포의 붉은색이 강할수록 세포내 중성지질 축적이 많이 이루어졌음을 보여준다. 본 실험에서 KGP는 3T3-L1 전지방세포에 Day -2에서 Day 0까지 48시간 동안 처리되었으며, Day 7까지 지방세포로 분화시켰다. Day 7에 ORO 염색법을 실시한 결과 KGP를 처리하지 않고 분화유도만 시킨 대조군은 다량의 중성지질이 축적된 것을 알 수 있었으며 KGP는 농도 의존적으로 3T3-L1 세포의 지방분화를 억제하였다 (Fig. 3A). 세포내 ORO 염색시약을 isopropanol로 용해하여 정량분석 한 결과, 대조군과 비교하여 1, 10, 50, 그리고 100  $\mu$ g/ml의 KGP는 각각 89.76%, 71.70%, 43.36%, 그리고 4.47% 지방세포분화를 농도 의존적이며 유의적으로 억제하였다 (Fig. 3B).

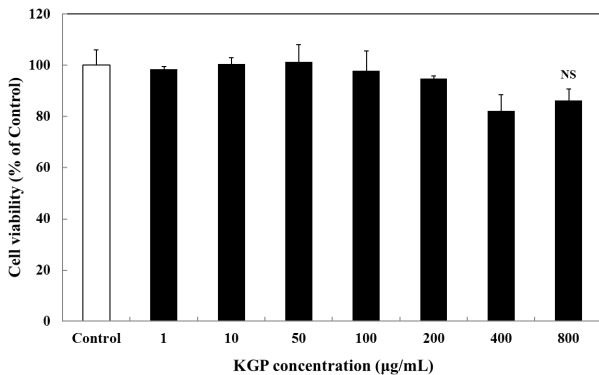


Fig. 2. The 3T3-L1 cells were subjected to MTT assay for determining cell viability after 24 h treatment with KGP. Percentage viability of 3T3-L1 cells exposed to 1, 10, 50, 100, 200, 400, and 800  $\mu$ g/ml of KGP. Statistical analysis was performed at  $p < 0.05$  by t-test, NS: Not significant

### 3. RT-PCR을 통한 유전자의 발현수준 분석

위의 결과로부터 KGP가 세포독성을 나타내지 않는 범위에서 3T3-L1 세포의 adipogenesis를 효과적으로 조절할 수 있다는 것을 확인하였다. 따라서 우리는 KGP가 adipogenesis를 조절하는 전사인자 및 유전자에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 하였다. Day -2에서 Day 0까지 1, 10, 50, 그리고 100  $\mu$ g/ml의 KGP를 48시간 처리한 후 Day 7까지 지방세포 분화를 유도했을 때, adipogenesis 조절에 관여하는 주요한 전사인자인 C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , 그리고 PPAR $\gamma$ 의 mRNA 발현이 현저하게 감소한 것을 관찰하였다. 그리고 adipogenesis 후기에 발현되는 것으로 잘 알려진 fatty acid synthase (FAS)의 발현 또한 KGP 처리에 의해 감소되었다 (Fig. 4). C/EBPs와 PPAR $\gamma$ 는 일반적으로 C/EBP $\beta$ 는 adipogenesis 과정 초기에 발현되어 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 발현을 유도함으로써 adipogenesis 과정을 촉진하는 것으로 알려져 있어, KGP는 adipogenic 전사인자의 하향 조절을 통해 adipogenesis를 억제하는 것으로 생각된다.

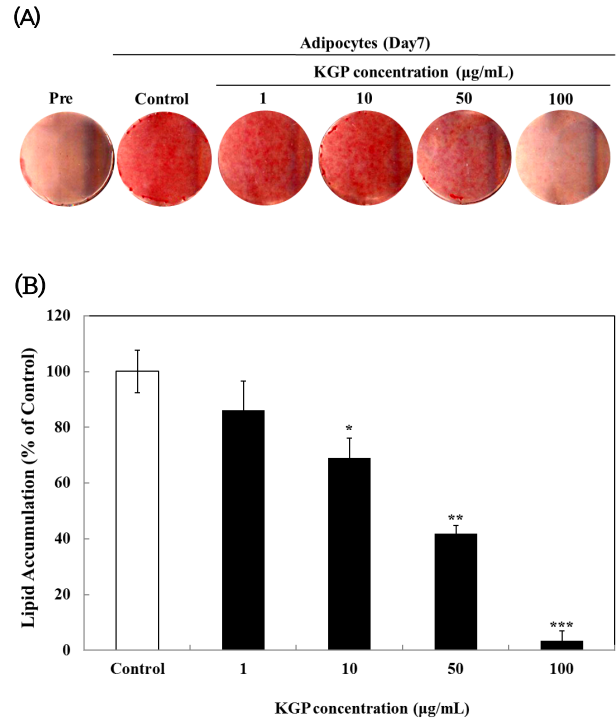


Fig. 3. Inhibitory effect of KGP on the 3T3-L1 adipogenesis. 3T3-L1 preadipocytes were subjected to adipocytes differentiation for 7 days in the presence of various concentrations of KGP (1–100  $\mu$ g/ml). (A) After 7 days of 3T3-L1 differentiation in the presence of KGP, mature adipocytes were stained with ORO. (B) 3T3-L1 cells were then subjected to quantitative analysis of ORO stained intracellular lipid droplets. Statistical analysis was performed at  $p < 0.05$  by t-test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ ). Pre: preadipocytes; Control: Mature adipocytes at Day7.

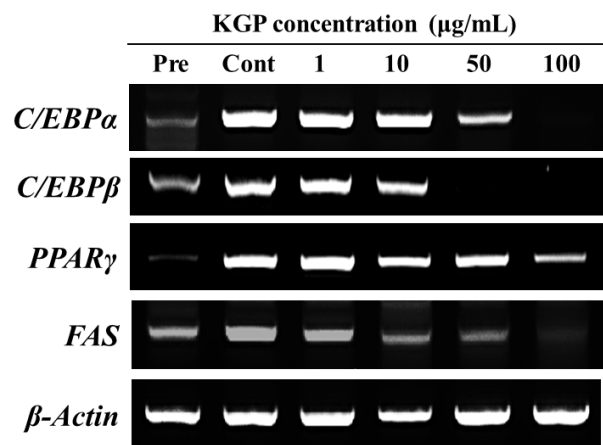


Fig. 4. The KGP treatment suppress the mRNA expression levels of adipogenic genes. RT-PCR analysis for adipocyte markers (C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , PPAR $\gamma$ , and FAS).  $\beta$ -Actin was used as a control.

### 4. Inhibitor assay를 통한 KGP의 항비만 기전 분석

KGP에 의해 억제된 adipogenesis의 기전을 분석하기 위하여 inhibitor assay를 실시하였다. 3T3-L1 세포는 100  $\mu$ g/ml의 KGP와 5  $\mu$ M의 SB431542에 Day -2에서 Day 0

까지 48시간 동안 처리되었으며, Day 7에 ORO 염색법 및 microscopy observation을 통해 관찰하였다. Figure 4의 결과와 유사하게 100  $\mu$ g/ml의 KGP를 처리하였을 때 3T3-L1 세포의 adipogenesis는 유의적으로 억제되었으며 (7.97%), TGF- $\beta$  저해제인 SB431542를 5  $\mu$  M의 농도로 처리하였을 때 대조군과 비교하여 유의적인 차이는 나타나지 않았다 (Fig. 5A,5B). 흥미롭게도 KGP 처리에 의해 억제된 3T3-L1 adipogenesis는 SB431542 처리에 의해 대조군 수준의 지방세포 분화율을 나타냈다 (81.72%). 따라서, 본 결과는 KGP에 의한 adipogenesis 억제는 TGF- $\beta$  신호전달체계를 통해 이뤄진다는 것을 알 수 있다.

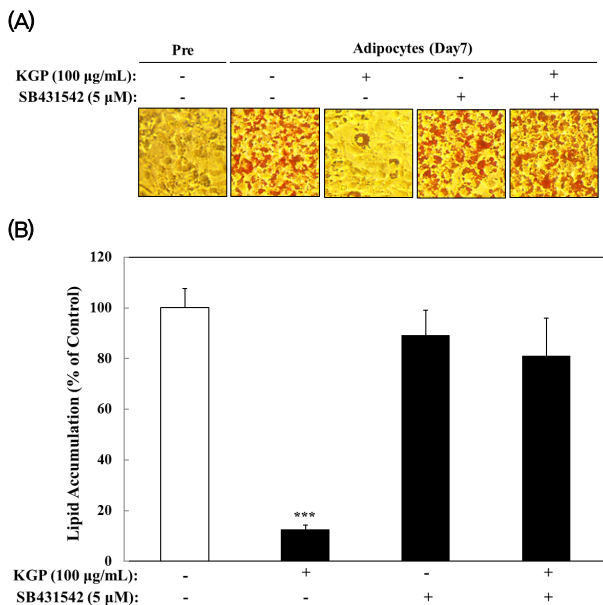


Fig. 5. TGF- $\beta$  signaling pathway is required in anti-adipogenic function of KGP. (A) 3T3-L1 cells were exposed to 100 KGP  $\mu$ g/mL in the presence or absence of TGF- $\beta$  inhibitor, SB431542. The mature adipocytes were stained with ORO at Day7. (B) 3T3-L1 cells were then subjected to quantitative analysis of ORO stained intracellular lipid droplets. Statistical analysis was performed at  $p < 0.05$  by t-test (\*\*\*(0.001)). Pre: preadipocytes; Control: Mature adipocytes at Day7.

## IV. 고찰

현대사회에서 비만 및 과체중 인구는 과거에 비해 크게 증가하였다. 특히 비만은 이러한 만성 질환과 밀접한 연관성이 있을 뿐 아니라 대인관계에 있어 자신감 상실 및 정신건강에 부정적인 영향을 미쳐 삶의 질을 낮춘다<sup>12)</sup>. 특히 소아 및 청소년기는 특히 지방세포 크기 및 수가 함께 증가하고 관련기관들이 형성되는 시기로서 전지방세포가 지방세포로 분화되는 adipogenesis 과정의 조절은 비만예방 및 관리에 있어 중요한 타겟이라 할 수 있다. 따라서 최근에는 다양한 천연물 및 약용 소재를 활용하여 비만 예방 및 치료를 위한 소재를 개발하고자 노력이 다양하게 시도되고 있다. 이에 본 연구에서는 인삼에서 추출한 다당체 (KGP)를 활용하여 항비만 소재로서의 가능성에 대해 탐색하였으며, 인삼의 주요 생리활성 성분으로 알려진 ginsenosides, 질소 화합물, phytosterol 및 아

미노산 외에 KGP의 항비만 기능성을 규명함으로써 인삼의 활용도를 다각화하는 방안을 모색하였다.

본 연구에서 KGP를 3T3-L1에 24시간 동안 처리한 결과 유의적인 세포독성은 관찰되지 않았다. 그러나 이전의 연구들에서 인삼은 SK-HEP-1, HT-29, HepG2 그리고 RAW264.7 등 다양한 세포주에서 cyclin D1 및 E의 억제를 통한 cell cycle arrest 기전<sup>13,14)</sup>, caspase 활성화, cytochrome C의 활성화, poly ADP ribose polymerase (PARP) cleavage, p53 및 mouse double minute 2 homolog (MDM2)의 하향 조절을 통한 apoptosis 유도<sup>15)</sup>, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$  B), cytochrome c oxidase subunit 2 (COX-2), activator protein 1 (AP-1) 및 nitric oxide synthase (NOS) 하향조절을 통한 항염증 활성 등을 통해 암세포의 사멸을 유도한다고 알려져 있다<sup>16)</sup>. 따라서 인삼에 존재하는 생리활성 성분들이 암 세포주에서 특이적으로 세포사멸을 유도하지만 정상세포에서는 유의적인 세포독성이 관찰되지 않았다. 이에 관련해 인삼은 세포주에 따라 특이적인 세포독성을 나타내는 것으로 생각되며, 세포 모델에 따른 세부적인 연구가 요구된다.

3T3-L1 세포에 KGP를 농도별로 처리한 결과, KGP는 농도 의존적이며 유의적으로 3T3-L1의 adipogenesis를 억제하였다. 또한 KGP를 처리하였을 때 C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , PPAR $\gamma$  및 FAS의 유전자 발현 수준이 현저하게 감소하는 것을 관찰하였다. 선행연구에 의하면 adipogenesis에서 초기 과정은 C/EBP $\beta$ 와 C/EBP $\sigma$ 의 발현이 증가되며 이들에 의해 이후에 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 의 발현 또한 증가됨으로서 진행되는 것으로 보고되었다<sup>17)</sup>. 또한 Park 등은 상업 ethyl acetate 추출물이 3T3-L1 지방세포에서 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 발현을 억제시킴으로서 세포내에서의 지방 축적을 감소시킨 것으로 보고하였다<sup>18)</sup>. Kim 등은 울금의 생리활성 성분으로 잘 알려진 curcumin이 adipogenesis 초기단계에서 mitotic clonal expansion (MCE) 조절을 통해 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 의 mRNA 발현수준을 대조군 대비 90%까지 감소시켰다고 보고하였다<sup>19)</sup>. 따라서 추후 KGP 처리가 MCE 조절을 통해 항비만 활성을 나타내는지에 대한 추가적인 확인이 요구된다. PPAR $\gamma$ 는 지방세포 분화과정에서 뿐만 아니라 이미 분화가 이루어진 지방세포의 인슐린 저항성(insulin resistance)과 염증반응(inflammation)에도 관여하는 것으로 잘 알려져 있어 비만예방 및 치료에 있어 PPAR $\gamma$ 의 조절은 중요하다<sup>20)</sup>. 그러므로 본 연구에서 사용된 KGP 또한 adipogenesis 과정에 기여하는 주요 전사인자인 C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  그리고 PPAR $\gamma$ 의 발현을 억제함으로써 세포내의 지방축적을 억제하는 것은 물론 인슐린 저항성 및 염증반응 완화와의 가능성도 탐색이 요구된다. 또한 KGP 처리를 통해 지방구의 크기 및 수가 KGP 처리군에서 현저하게 감소된 것은 KGP는 성인 및 소아비만에 적용할 수 있는 항비만 소재라 생각된다.

최근 몇 가지 신호전달체계들이 adipogenesis에 관여하는 전사인자들을 조절한다는 연구들이 보고되었다. 대표적으로 preadipocytes factor-1 (Pref-1), forkhead-containing transcription factors (FoxA1 그리고 FoxA2), Smad3, Wnt10b, 그리고 GATA family of transcription factors (GATA2 그리고 GATA3), transforming growth factor- $\beta$

(TGF- $\beta$ ), 그리고 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 신호전달체계 활성화는 adipogenesis를 억제하는 것으로 알려져 있다<sup>21)</sup>. 위의 신호전달체계들은 분화 초기에 발현되는 C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  그리고 PPAR $\gamma$  등을 포함하여 후기 adipogenic 유전자인 FAS 및 adipocytes protein 2 (aP2)의 발현에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 KGP 처리에 의한 3T3-L1 세포의 adipogenesis 억제와 대표적 adipogenic 전사인자인 C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  그리고 PPAR $\gamma$ 의 하향조절이 TGF- $\beta$  신호전달 활성화와 연관되어 있음을 제시한다. 또한, 이전 연구에서 우리는 3가지 형태 (TGF- $\beta$  1, TGF- $\beta$  2, 그리고 TGF- $\beta$  3)의 TGF- $\beta$  중 셀레네이트 처리에 의해 분화초기에 TGF- $\beta$  1이 특이적으로 증가하는 것을 관찰하였으며, 이는 C/EBP $\beta$ , PPAR $\gamma$ , 그리고 FAS의 발현을 감소시켰다<sup>8)</sup>. 따라서 3T3-L1 세포 분화초기의 TGF- $\beta$  신호전달 활성화는 adipogenesis 과정과 밀접한 관련이 있는 것으로 추측된다. TGF- $\beta$ 는 세포에서 다양한 기능을 수행하는 신호전달 cytokine으로 잘 알려져 있으며, TGF- $\beta$  신호전달 활성화는 세포의 성장, 분화, 염증반응, 그리고 조직의 섬유구조 형성 등에 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>22)</sup>. 또한 TGF- $\beta$ 는 TGF- $\beta$  수용체에 결합되면 serine/threonine kinase 활성이 증가되고 이어서 수용체의 인산화가 유도되며<sup>23)</sup>, 이후 Smad2, Smad3를 활성화시키고 Smad4 복합체를 형성하여 하위 유전자들을 발현시키는데 KGP가 TGF- $\beta$ 의 신호전달체계 중 어느 단계에 밀접하게 관련되어 있는지에 대한 추가 연구가 요구된다.

본 연구는 예로부터 널리 사용되어온 고려인삼에서 다당체 (KGP)를 추출 및 정제하여 이의 항비만 활성을 3T3-L1 세포에서 평가하고, 더 나아가 KGP의 항비만 활성이 TGF- $\beta$  신호전달체계와 밀접하게 관련되어 있음을 제시하였다. 하지만 추후 KGP의 항비만 활성이 동물모델을 비롯한 임상실험에서의 기능성이 추가적으로 평가되어야 할 것으로 생각되며, TGF- $\beta$ 의 다양한 단계 중 어느 단계에 KGP가 특이적으로 작용하는지 밝혀야 할 것으로 생각된다. 본 연구는 KGP가 항비만 및 과체중 환자를 대상으로 한 처방 및 기능성 식품의 소재로 활용될 수 있을 것이라 생각한다.

## V. 결 론

고려인삼에서 추출 및 정제한 인삼 다당체 (KGP)의 항비만 실험을 진행한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 3T3-L1 세포에서 KGP를 24시간 처리하였을 때 800  $\mu$  g/ml의 농도까지 세포독성이 관찰되지 않았다.
2. 세포독성이 나타나지 않은 농도범위의 KGP를 3T3-L1 세포에 48시간 처리하고 지방세포 분화를 실시한 결과, KGP는 농도 의존적이며 유의적으로 3T3-L1 adipogenesis를 억제하였다. 또한 KGP는 지방세포내 축적되는 지방구의 수 및 크기도 유의적으로 감소시켰다.
3. KGP를 처리한 지방세포에서 유전자의 발현을 분석한

결과, KGP는 지방분화를 개시하고 유도하는 대표적 전사인자인 C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  그리고 PPAR $\gamma$ 의 발현을 감소시켰다. 이에 KGP는 adipogenic 전사인자의 하향 조절을 통해 adipogenesis를 억제함을 알 수 있었다.

4. KGP 처리에 의해 억제된 3T3-L1 adipogenesis와 전사인자의 발현이 어떠한 신호전달체계를 통해 이뤄지는지 알아보기 위하여 TGF- $\beta$  특이적 저해제 SB431542를 KGP와 동시에 처리한 결과, KGP에 의해 억제된 adipogenesis는 SB431542 처리에 의해 활발한 지방세포 분화를 보였으며 이는 KGP의 항비만 활성이 TGF- $\beta$  신호전달체계를 통해 이뤄짐을 의미한다.

이상의 연구 결과는 KGP의 항비만 소재로서의 가능성을 제시하였으며, 추후 임상실험 및 세부적인 기전연구가 뒷받침된다면 KGP를 활용한 처방, 건강기능식품, 보조 의약품, 그리고 미용기능식품 소재로 충분히 활용될 수 있을 것이라 생각한다.

## 감사의 글

이 연구결과물은 2012학년도 경남대학교 교내연구(신진교수연구비지원)에 의한 것임.

## 참고문헌

1. Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Spiegelman D, Ascherio AL, Stampfer MJ. Birth weight and adult hypertension, diabetes mellitus, and obesity in US men. *Circulation*. 1996 ; 94 : 3246-50.
2. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*. 1998 ; 78 : 783-809.
3. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Naslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Ryden M, Frisen J, Arner P. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008 ; 453 : 783-7.
4. James AW. Review of signaling pathways governing MSC osteogenic and adipogenic differentiation. *Scientifica*. 2013 ; 17 : Article ID 684736.
5. Smas CM, Sul HS. Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell*. 1993 ; 73 : 725-34.
6. Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, MacDougald OA. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*. 2000 ; 289 : 950-3.
7. Choy L, Skillington J, Derynck R. Roles of autocrine TGF-beta receptor and Smad signaling in adipocyte



- differentiation, *J Cell Biol.* 2000 ; 149 : 667-82.
8. Kim CY, Kim GN, Wiacek JL, Chen CY, Kim KH. Selenate inhibits adipogenesis through induction of transforming growth factor- $\beta$  1 (TGF- $\beta$  1) signaling. *Biochem Bioph Res Co.* 2012 ; 426 : 551-7.
  9. Oh CH, Kim GN, Lee SH, Lee JS, Jang HD. Effects of heat processing time on total phenolic content and antioxidant capacity of ginseng Jung Kwa. *J Ginseng Res.* 2010 ; 34 : 198-204.
  10. Lim JK, Kang HJ, Kang SN, Lee BY. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent fractions of fine ginseng root. *Food Sci Biotechnol.* 2009 ; 18 : 513-8.
  11. Tchilian EZ, Zhelezarov IE, Hadjiivanova CI. Effect of ginsenoside Rg1 on insulin binding in mice liver and brain membranes. *Phytother Res.* 1991 ; 5 : 46-8.
  12. Bray GA. Pathophysiology of obesity. *Am J Clin Nutr.* 1992 ; 55(suppl) : 488-94.
  13. Li XL, Wang CZ, Mehendale SR, Sun S, Wang Q, Yuan CS. Panaxadiol, a purified ginseng component, enhances the anti-cancer effects of 5-fluorouracil in human colorectal cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009 ; 64 : 1097-104.
  14. Lee KY, Park JA, Chung E, Lee YH, Kim SI, Lee SK. Ginsenoside-Rh2 blocks the cell cycle of SK-HEP-1 cells at the G1/S boundary by selectively inducing the protein expression of p27kip1. *Cancer Lett.* 1996 ; 110 : 193-200.
  15. Jin YH, Yim H, Park JH, Lee SK. Cdk2 activity is associated with depolarization of mitochondrial membrane potential during apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 ; 305 : 974-80.
  16. Oh GS, Pae HO, Choi BM, Seo EA, Kim DH, Shin MK. 20(S)-Protopanaxatriol, one of ginsenoside metabolites, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expressions through inactivation of nuclear factor- $\kappa$ B in RAW 264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Cancer Lett.* 2004 ; 205 : 23-9.
  17. Ntambi JM, Kim YC. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr.* 2000 ; 130(12) : 3122S-26S.
  18. Park HS, Shim SM, Kim GH. Inhibitory effects of ethyl acetate-soluble fraction from morus alba on lipid accumulation in 3T3-L1 cells. *Nat Prod Commun.* 2013 ; 8(11) : 1579-82.
  19. Kim CY, Le TT, Chen C, Cheng JX, Kim KH. Curcumin inhibits adipocyte differentiation through modulation of mitotic clonal expansion. *J Nutr Biochem.* 2011 ; 22(10) : 910-20.
  20. Bhatia V, Viswanathan P. Insulin resistance and PPAR insulin sensitizers. *Curr Opin Investig Drugs.* 2006 ; 7(10) : 891-7.
  21. Harp JB. New insights into inhibitors of adipogenesis. *A Curr Opin Lipidol.* 2004 ; 15 : 303-7.
  22. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003 ; 113 : 685-700.
  23. Wharton K, Derynck R. TGF $\beta$  family signaling: novel insights in development and disease. *Development.* 2009 ; 136 : 3691-7.