

지방세포의 분화에 미치는 *Acacia catechu* 추출물의 항비만 효과

김동규¹ · 강민정¹ · 서화진² · 권오운² · 신정혜¹

¹(재)남해마늘연구소

²(재)경북천연염색산업연구원

Effect of *Acacia catechu* Extract on 3T3-L1 Preadipocyte Differentiation

Dong-Gyu Kim¹, Min Jung Kang¹, Hwa Jin Suh², Oh Oun Kwon², and Jung Hye Shin¹

¹Namhae Garlic Research Institute

²Gyeongbuk Natural Color Institute

ABSTRACT The purpose of this study was to investigate the effects of catechu water extract on adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 preadipocytes were differentiated with adipogenic reagents by incubation for 9 days in the absence or presence of catechu extract ranging from 1~200 µg/mL. The effect of catechu extracts on cell proliferation of 3T3-L1 preadipocytes was investigated using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. The effect of catechu extracts on 3T3-L1 differentiation was examined by measuring intracellular lipid droplet and triglyceride contents. These results were obtained from preadipocyte proliferation and adipocyte differentiation of 3T3-L1. Catechu extracts inhibited lipid accumulation and remarkably decreased triglyceride contents in 3T3-L1 preadipocytes at a concentration showing no cytotoxicity. The anti-adipogenic effects of catechu appeared to be mediated by significant down-regulation of expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ , CCAAT/enhancer-binding protein α , and sterol regulatory element-binding protein 1c proteins apart from expression of hormone-sensitive lipase. We suggest that catechu extracts significantly inhibit adipogenesis and can be used for regulation of obesity.

Key words: adipogenesis, triglyceride, PPAR γ , C/EBP α , SREBP-1

서론

비만은 현대사회에서 인간의 건강을 위협하는 가장 큰 적으로 인식되고 있다. 비만으로 인한 질병의 발생은 전 세계적으로 증가 추세이며, 세계보건기구(WHO)의 보고서에 따르면 비만은 사망률 및 질병 유발 위험인자의 증가와 정비례 관계가 있다고 알려져 있다(1). 질병 유발 위험인자로는 유전적(선천성 유전질환, 세포사멸유전자), 환경적(식습관, 운동, 사회적 요인, 화학물질 등) 요인들이 포함된다(2). 비만은 신체활동으로 소비할 수 있는 에너지 수준을 넘어서는 과잉의 음식물 섭취에 의한 에너지 밀도와 지방량의 증가 때문에 발생한다(3). 이는 제2형 당뇨병, 고혈압, 암, 관상동맥, 심장질환 등과 같은 대표적 성인 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다(4).

비만의 개선 및 예방과 관련한 *in vitro* 실험에는 형태학적으로 그리고 생화학적으로 뚜렷한 변화를 나타내는 지방전구세포인 3T3-L1 세포가 주로 사용되는데, 3T3-L1 지방전구세포는 분화 유도 시 성장이 정지되고 지방세포로의

분화가 유도되는데 이러한 과정을 adipogenesis라고 한다(5). 지방전구세포의 분화에는 insulin, dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx) 등의 분화유도인자가 필요하며(6-8), 이러한 유도체들의 처리로 세포의 형태가 변하기 시작하고 얼마간의 세포분열이 동반되며 5~7일 이내에 지방세포의 분화가 확인된다(9).

지방세포의 분화에는 다양한 전사인자(transcription factors)들과 조절 매개체(coregulator)가 관여한다(10-12). 특히 전사인자인 peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), CCAAT/enhancer-binding protein α (C/EBP α) 그리고 sterol regulatory element-binding protein 1c(SREBP-1c)는 지방형성의 주 조절자로 잘 알려져 있다(13). C/EBP는 현재까지 6종류가 보고되어 있는데, 특히 C/EBP α , β 그리고 δ 형태는 지방형성과 밀접하게 관련된 것으로 알려져 있다(14). C/EBP β 와 δ 는 분화 초기에 발현되어 지방형성을 조절하는데, C/EBP δ 는 분화 진행과정 중에 발현량이 감소하고 C/EBP β 는 C/EBP α 와 PPAR γ 의 유전자 발현을 유도하여 지방형성을 진행하는 데 관여한다고 알려져 있다(11). C/EBP α 와 PPAR γ 는 상호작용을 통해 발현이 증가하고 지방세포 특이적 유전자인 fatty acid synthase(FAS)를 발현시킨다고 보고되어 있다(15). 따라서 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현은 지방형성 과정을 진행함에 있어

Received 25 April 2016; Accepted 10 June 2016

Corresponding author: Jung Hye Shin, Namhae Garlic Research Institute, Gyeongnam 52430, Korea
E-mail: whanbee@hanmail.net, Phone: +82-55-860-8947

매우 중요한 전사인자임을 알 수 있다.

천연 식물 소재들은 폐쇄 화합물을 포함한 다양한 생리활성 물질들을 지니고 있어 최근 들어 그 활성을 연구하고 규명하여 식품소재로 활용하기 위한 연구들이 다양하게 진행되고 있다. 또한, 이들 식물 소재들은 고유의 색을 지니고 있어 색소 소재로도 활용되며, 이들 색소 성분들은 구조적 특성이나 색에 따라 기능이 다르지만 항산화 작용 및 암의 발생 원인의 하나인 활성산소 발생 억제 기능을 공통으로 가지고 있어 생리활성 소재로 관심이 증대되고 있다(16). 천연색소 시료 중 하나인 아선약(*Acacia catechu*)은 콩과(Leguminosae) 식물에 속하며 아시아와 인도에서 전통 약제로써 간질환, 저혈당, 해열, 소화제, 항산화, 항염증, 흉부통증 등 다양한 증상과 질환에 널리 이용되어 왔다(17-23). 아선약의 주성분으로는 아민류, 탄닌산, 폴리페놀, 알칼로이드 그리고 플라보노이드 등이 있으며(24,25), 그중 탄닌은 수렴 작용을 할 뿐만 아니라 지사제로 사용되고 항균 활성이 뛰어난 것으로 알려져 있다(26). 기존의 연구에 따르면 아선약 추출물은 높은 총페놀 함량을 가진다는 보고가 있다(27). 이처럼 아선약과 그 성분에 대한 다양한 생리학적 활성이 보고되어 있지만 항비만 활성에 대한 분자생물학적 작용기전에 관한 체계적인 연구는 전무한 실정이다.

본 연구에서는 아선약 추출물을 이용하여 3T3-L1 세포에서 지방축적 및 트리글리세라이드(triglyceride)의 축적 억제 활성을 평가하였고, 지방생성 과정과 연관이 있는 주요 전사인자의 발현에 미치는 영향을 분석하였다. 또한, 지방전구세포에서 지방세포로 분화되는 세포의 증식에 미치는 아선약의 효과를 확인함으로써 비만 예방 및 개선을 위한 소재 활용의 기초자료를 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 추출물의 제조

천연색소 소재인 아선약은 원산지가 인도네시아로 (주)대명제약(Seoul, Korea)에서 의약품용으로 수입한 것을 구입하여 시료로 사용하였다. 기존 연구(27)의 아선약 추출물이 높은 항산화능을 보였기 때문에 동일한 천연색소 추출법을 토대로 하여 아선약 건조 시료 1 kg에 catalase(Biotouch® CAT200, AB Enzymes, Rajamäki, Finland) 및 alcalase(Alcalase®, Novozymes, Dittingen, Switzerland)를 1% 농도로 첨가하고 10 L의 물을 넣어 45°C에서 10시간 동안 반응시킨 후 80°C로 조절된 추출기(Cosmos660, Kyungseo, Incheon, Korea)를 이용하여 2시간 동안 추출하였다. 그 후 추출물을 여과하여 농축기(Rotavapor R-220, Buchi, Flawil, Switzerland)로 농축한 다음 분무건조기를 이용해 분말화하여 실험용 시료로 사용하였다.

총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량 측정

총폴리페놀 함량은 Dewanto 등(28)의 방법에 비색법으

로 정량하였다. 추출물 100 mL에 2% Na₂CO₃ 용액 2 mL를 가한 후 3분간 방치하고, 50% Folin-Ciocalteu reagent 100 µL를 가해 30분 반응한 다음 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 gallic acid(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 작성하였다.

총플라보노이드 함량은 Davis 변법(29)을 이용하였다. 시료 용액 1 mL에 diethylene glycol 10 mL 및 1 N NaOH 1 mL를 가하여 잘 혼합한 후 30°C에서 1시간 반응시킨 다음 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 검량곡선은 quercetin(Sigma-Aldrich Co.)을 이용하여 작성하였다.

세포 배양

실험에 사용된 3T3-L1 전지방세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양받아 실험에 사용하였다. 3T3-L1 세포는 10% bovine calf serum(BCS, Gibco, Grand Island, NY, USA), 1% penicillin/streptomycin(Sigma-Aldrich Co.)을 첨가한 Dulbecco modified Eagle medium(DMEM, Gibco) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 세포가 confluent 한 상태에서 0.05% trypsin ethylenediamine-tetraacetic acid(EDTA, Gibco)를 사용하여 세포를 떼어내어 3,000 rpm, 3분에서 원심분리 한 후 현탁하여 사용하였다.

지방세포 분화 유도 및 약물 처리

3T3-L1 세포주를 10% BCS가 첨가된 DMEM 배지에서 배양 후 confluent 한 상태가 되면 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco), 1 µM dexamethasone(Sigma-Aldrich Co.), 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx, Sigma-Aldrich Co.)과 10 µg/mL의 인슐린(Gibco)을 함유한 분화 유도 배지로 교환한 후 3일간 배양하였다. 그 후 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin 및 10 µg/mL의 인슐린이 포함된 DMEM 배지로 2일 간격으로 배지를 교환하였다. 시료 추출물 역시 20 µg/mL의 농도로 2일 간격으로 처리하였다.

세포독성 평가

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma-Aldrich Co.) 방법을 이용하여 아선약 추출물이 3T3-L1 세포의 생존에 미치는 영향을 측정하였다. 96-well plates에 5×10⁴ cells/well 농도로 3T3-L1 세포를 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 지방세포 분화를 유도하여 농도별 시료를 처리한 다음 8일 동안 배양하였다. 이후 기존 배지를 제거한 다음 MTT 용액(5 µg/mL) 10 µL를 포함하는 DMEM 배지 100 µL를 각 well에 넣어 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 2~3시간 반응시켰다. 다시 배지를 제거하고 dimethyl sulfoxide(Sigma-Aldrich Co.)를 100 µL 넣어 10분간 교반한 다음 ELISA reader(Epoch, Biotek, Winooski, VT, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 control에 대한 백분율로 세포 독성을 평가하였다.

Oil red-O 염색 및 지방축적률 측정

3T3-L1 세포에서 지방축적률을 측정하기 위하여 지방 전구세포 분화 시 생성되는 triglyceride를 특징적으로 염색시키는 Oil red-O(Sigma-Aldrich Co.) 염색법을 이용하여 분화 억제 여부를 확인하였다. 3T3-L1 전지방세포는 분화를 유도한 후 1~200 µg/mL의 아선약 추출물을 3, 5, 7일에 처리하였으며 염색은 마지막 날 실시하였다. 먼저 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후 10% formalin을 가해 실온에서 5분간 반응시킨 다음 formalin을 제거하였다. 다시 여기에 formalin을 가해 1시간 반응시켜 세포를 고정하였다. Formalin을 제거한 다음 60% isopropanol로 세척한 후 각각의 well이 완전히 마를 때까지 방치하였다. 그 후 각각의 well에 Oil red-O solution을 첨가하여 20분간 실온에서 염색 후 멸균증류수를 이용하여 잔여 Oil red-O solution을 세척하였다. 100% isopropanol을 첨가하여 실온에서 10분간 반응하여 용출된 Oil red-O를 ELISA reader로 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 지방축적률은 시료추출물 대신 세포생육 배지를 처리하여 같은 방법으로 실험한 control에 대한 백분율로 나타내었다.

Triglyceride 함량 측정

분화 유도된 3T3-L1 지방세포에 축적된 triglyceride는 triglyceride colorimetric assay kit(Cayman, Ann Arbor, MI, USA)을 이용하여 확인하였다. 상기와 동일한 과정에 의해 시료가 처리되고 분화가 유도된 세포를 PBS(pH 7.4)로 3회 세척한 후 lysis buffer(1% Triton X-100 in PBS)를 첨가하여 스크래퍼로 세포를 모아 4°C에서 30초간 sonication 하여 10,000 rpm(Hanil, Seoul, Korea)에서 10분간 원심분리 한 다음 상층액을 분리하였다. 상층액 10 µL에 150 µL의 enzyme buffer solution을 첨가하여 혼합한 후 실온에서 15분간 반응시킨 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 대신 배지를 처리한 대조군의 triglyceride 양 대비 시료 처리군의 triglyceride 양의 백분율로 중성지방 축적률을 나타내었다.

Western blot 분석

3T3-L1 지방세포에 protein extraction solution(PRO-PREPTM, iNtRON Biotechnology Inc., Seongnam, Korea)을 포함한 50 mM Tris-Cl(pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 0.5% nomylphenoxypolyethoxyethanol, 1% triton X-100, 10% deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate(SDS), 1 mM EDTA, 1X protease inhibitor(Sigma-Aldrich Co.)를 첨가하여 용해한 후 4°C에서 30분간 방치하여 13,000 rpm(Hanil)에서 20분간 원심분리 한 다음 상층액을 분리하였다. Bovine serum albumin protein assay kit(Thermo, Waltham, MA, USA)을 이용하여 50 µL의 동일한 단백질 시료를 SDS sample buffer에서 용해시켰다. 단백질을 4~12% SDS PAGE(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 전기영동 한 후 PVDF membrane에 transfer 하였다. 3% skim milk buffer에 blocking 한 다음 C/EBPα, PPARγ 및 SREBP-1의 1차 항체(Cell Signaling Technology, Danvers, MN, USA)를 1:1,000으로 희석하여 4시간 반응시킨 후 tris-buffered saline Tween-20(TBST)으로 3회 세척하였다. 2차 항체인 peroxidase-conjugated anti-rabbit 및 anti-mouse 항체(1:2,000)로 1시간 반응시킨 후 다시 TBST로 3회 세척한 다음 ECL detection reagents(ECL plus kit; ELPIS, Daejeon, Korea)를 이용하여 단백질의 발현 정도를 확인하였다. 상대적인 단백질 발현 정도는 β-actin을 이용하여 계산하였다.

trogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 전기영동 한 후 PVDF membrane에 transfer 하였다. 3% skim milk buffer에 blocking 한 다음 C/EBPα, PPARγ 및 SREBP-1의 1차 항체(Cell Signaling Technology, Danvers, MN, USA)를 1:1,000으로 희석하여 4시간 반응시킨 후 tris-buffered saline Tween-20(TBST)으로 3회 세척하였다. 2차 항체인 peroxidase-conjugated anti-rabbit 및 anti-mouse 항체(1:2,000)로 1시간 반응시킨 후 다시 TBST로 3회 세척한 다음 ECL detection reagents(ECL plus kit; ELPIS, Daejeon, Korea)를 이용하여 단백질의 발현 정도를 확인하였다. 상대적인 단백질 발현 정도는 β-actin을 이용하여 계산하였다.

통계처리

데이터는 평균±표준오차로 표현하였으며, 데이터의 통계처리는 Statistical Package for Social Science(Version 10, SPSS, IBM, Armonk, NY, USA)를 이용하여 분석하였다. Student's *t*-test 방법에 의하여 각각의 실험군과 대조군 간의 유의성 차이를 검증하였다(**P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001).

결과 및 고찰

총폴리페놀과 총플라보노이드 함량 분석

녹차를 포함한 녹황색 채소의 경우 폴리페놀과 플라보노이드 계열의 화합물이 많이 함유되어 있어 만성질환을 예방하거나 산화적 스트레스를 개선하는 데 활용되고 있다(30). 이러한 항산화 및 항염증 활성이 좋은 소재는 식품뿐만 아니라 약용식물로부터 다양하게 섭취해야 할 필요성이 있다(31).

아선약 추출물에 대한 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 폴리페놀의 정량을 위해 gallic acid를 이용하여 검량선을 작성하고 이에 따라 총폴리페놀의 함량을 계산한 결과 아선약 추출물에는 156.19±1.36 mg/g이 함유되어 있었다. 총플라보노이드 함량은 quercetin을 이용하여 검량선을 작성하여 산출하였으며 그 결과 4.11±0.59 mg/g의 함량을 확인할 수 있었다. 이처럼 아선약 추출물은 총폴리페놀의 함량이 매우 높고 총플라보노이드 함량도 높으므로 항산화, 항염증 효능을 통해 비만 발생요인을 중화하는 작용을 할 것으로 생각한다.

Table 1. Total polyphenol (TPC) and total flavonoid contents (TFC) from catechu

Sample	TPC (mg/g) ¹⁾	TFC (mg/g) ²⁾
Catechu	156.19±1.36	4.11±0.59

¹⁾Results represent mean value±standard error mg gallic acid equivalents per 1 g of sample.

²⁾Results represent mean value±standard error mg quercetin equivalents per 1 g of sample.

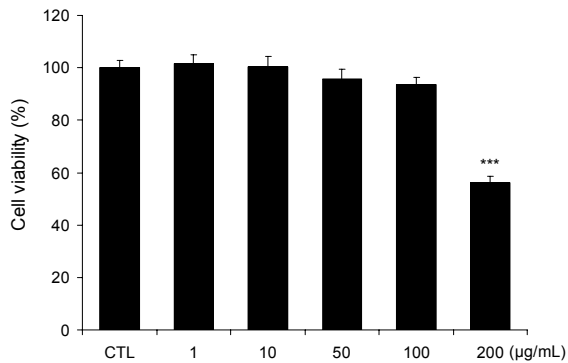


Fig. 1. The effect of catechu extract on cell viability in 3T3-L1 adipocytes. Differentiated 3T3-L1 cells were treated with various concentrations of catechu extracts. Data are expressed as the percent growth rate of cells cultured in the presence of samples compared with untreated control cells. Values are mean±standard error of 8 replicates and asterisks above the bar are significantly different from control ($^{***}P<0.001$).

3T3-L1 지방세포에서 아선약 추출물의 세포독성

MTT는 환원형 화합물 또는 효소에 의해 쉽게 환원되어 발색을 일으키는 시약으로 미토콘드리아 내의 산화환원효소(mitochondrial dehydrogenase)와 반응하여 보라색의 불용성 formazan을 형성한다(32). MTT 분석법은 살아 있는 세포 생존율을 확인하는 방법으로 잘 알려져 있다(33). 세포 분화에 사용되는 인슐린은 체내에서 다양한 기능을 수행하는 호르몬으로 에너지 저장과 이화작용을 매개하기 위하여 식후에는 그 생성량이 증가하고, 공복 시에는 지방세포에서 에너지를 방출시키고 포도당 분해를 유도하기 위해 감소한다(34). 주요 발현 부위는 지방조직, 근육, 간으로 이러한 조직들은 인슐린 수용체를 통해 신호를 받아들여서 탄수화물, 지질, 단백질의 물질대사와 관련하여 조직 특이적으로 영향을 주는 것으로 알려져 있다(34). Hwang 등(35)은 천연색소 시료인 정향, 감, 오배자, 황벽, 치자, 홍화황 및 아토나 추출물의 세포 생존율을 측정 한 결과 100 µg/mL 농도에

서 아토나와 오배자 추출물이 70.43%와 71.92%로 낮았으며 나머지 5가지 시료들은 90%대의 생존율을 나타내는 것으로 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 세포독성 실험을 위한 시료의 농도 범위를 설정하였다.

3T3-L1 전구지방세포에 분화를 유도하는 인슐린과 함께 아선약 추출물을 1~200 µg/mL 농도로 처리한 결과 1, 10, 50 그리고 100 µg/mL 농도를 처리한 군에서는 대조군과 비교하여 세포의 형태학적 변화가 관찰되지 않았으며, 또한 세포 생존율도 유의성 있는 변화를 보이지 않았다. 반면 200 µg/mL 농도로 처리하였을 때는 $55.32 \pm 2.36\%$ 로 세포 생존율이 유의적으로 감소하였다(Fig. 1). 이러한 결과를 토대로 항비만 활성을 평가하기 위한 아선약 추출물의 처리 유효 농도는 1, 10, 50, 100 µg/mL로 결정하였다.

3T3-L1 지방전구세포의 lipid droplet 생성에 미치는 아선약 추출물의 영향

Lipid droplet은 phospholipid monolayer에 의하여 둘러싸여진 중성지방으로 구성된 비활성 소낭으로서 precursor fibroblast에서부터 지방세포로의 분화과정에서 나타나며, PPAR γ 와 같은 중요한 adipogenic transcription factor들에 의해서 조절되는 것으로 알려져 있다(36).

3T3-L1 전구지방세포가 지방세포로의 분화과정에 나타나는 lipid droplet 생성에 아선약 추출물이 어떠한 영향을 미치는지를 확인하기 위해 Oil-red O 염색법을 통해 3T3-L1 지방세포 내 축적된 지방의 양을 측정하였다. Oil-red O 염색시약은 세포 내 지질과 결합하며, 염색된 세포의 붉은 색이 강할수록 세포 내 중성지질 축적이 많이 이루어졌음을 의미한다(37). 위상차 현미경을 통해 염색된 지방세포의 수를 이미지로 확인한 결과 lipid droplet의 형성이 아선약 추출물 처리 농도에 의존적으로 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 2A). 앞선 이미지 결과를 통계 처리한 결과 대조군보다 1, 10, 50 및 100 µg/mL 처리군에서 각기 23%, 45%,

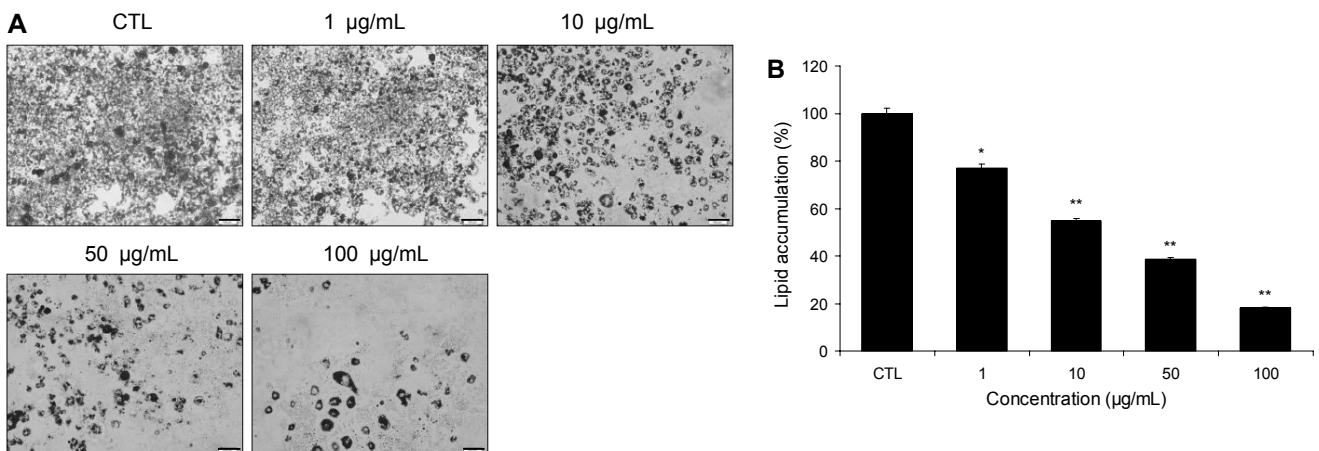


Fig. 2. Inhibitory effects of catechu on the lipid accumulation in 3T3-L1 adipocyte. (A) Lipid droplet formation in mature adipocytes, mature adipocyte on control, and on 1, 10, 50, 100 µg/mL of catechu extracts. (B) Values are mean±standard error of 3 replicates and asterisks above the bars are significantly different from control ($^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$).

61%, 82%의 유의적인 지방축적물의 감소를 나타내었다 (Fig. 2B). 이 결과를 통해 아선약 추출물이 3T3-L1 지방세포에서 지방축적 억제 효과를 가지는 것이 확인되었다.

아선약 추출물의 triglyceride 축적 억제 효과

Lipid droplet은 triglyceride와 cholesterol ester가 소포체의 이중층 사이에 축적될 때 생기며, 지방을 저장하는 기능을 한다(38). 특히 이들 중 triglyceride는 중요 에너지원으로 사용되지만 비만의 주요 원인으로도 작용한다(39, 40). 배양된 세포에 분화유도제와 함께 아선약 추출물을 1~100 µg/mL의 농도로 처리한 다음 분화과정이 끝난 후 분화된 지방세포 내에 존재하는 순수한 triglyceride 축적을 관찰하였다(Fig. 3). 아선약 추출물을 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 유의한 triglyceride 축적의 감소 효과가 나타났다. 특히 100 µg/mL 농도로 처리하였을 때 62.42±1.87%의 높은 triglyceride 축적 억제 효과를 확인할 수 있었다. 따라서 아선약 추출물은 3T3-L1 지방세포의 분화 유도과정에서 지방생성을 억제하여 지방축적을 억제한다는 것을 확인할 수 있었다.

천연물 추출물을 이용한 기존의 연구에 따르면 Kim 등(41)은 분화가 유도된 지방세포에 후박 추출물을 100 µg/mL로 처리하였을 때 triglyceride가 35% 감소하는 것으로 보고하였으며, Cha 등(42)은 수세미오이 추출물을 600 µg/mL로 처리하였을 때 대조군과 비교하여 triglyceride가

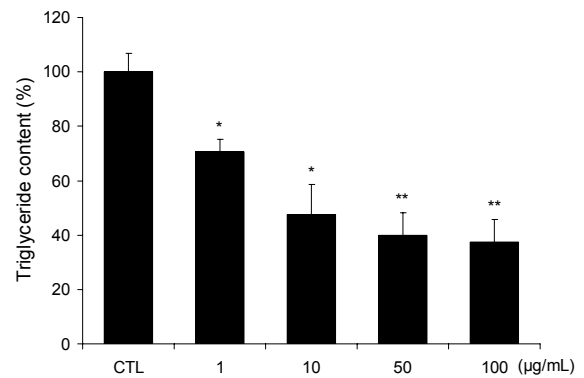


Fig. 3. Effect of catechu on triglyceride contents in 3T3-L1 adipocytes. Values are mean±standard error of 3 replicates and asterisks above the bars are significantly different from control (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

13.5% 감소하는 것으로 확인되었다. 이러한 대부분의 천연 식물 추출물들은 지방세포로 분화되는 동안에 특징적으로 발현되는 transcription factor들(C/EBP family, PPAR γ , SREBP-1c 등)에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다(43).

지방세포 분화 관련 전사인자들의 발현에 미치는 아선약 추출물의 영향

지방전구세포에서 지방세포로 분화되는 adipogenesis 과정은 많은 종류의 adipogenic transcription factor들의

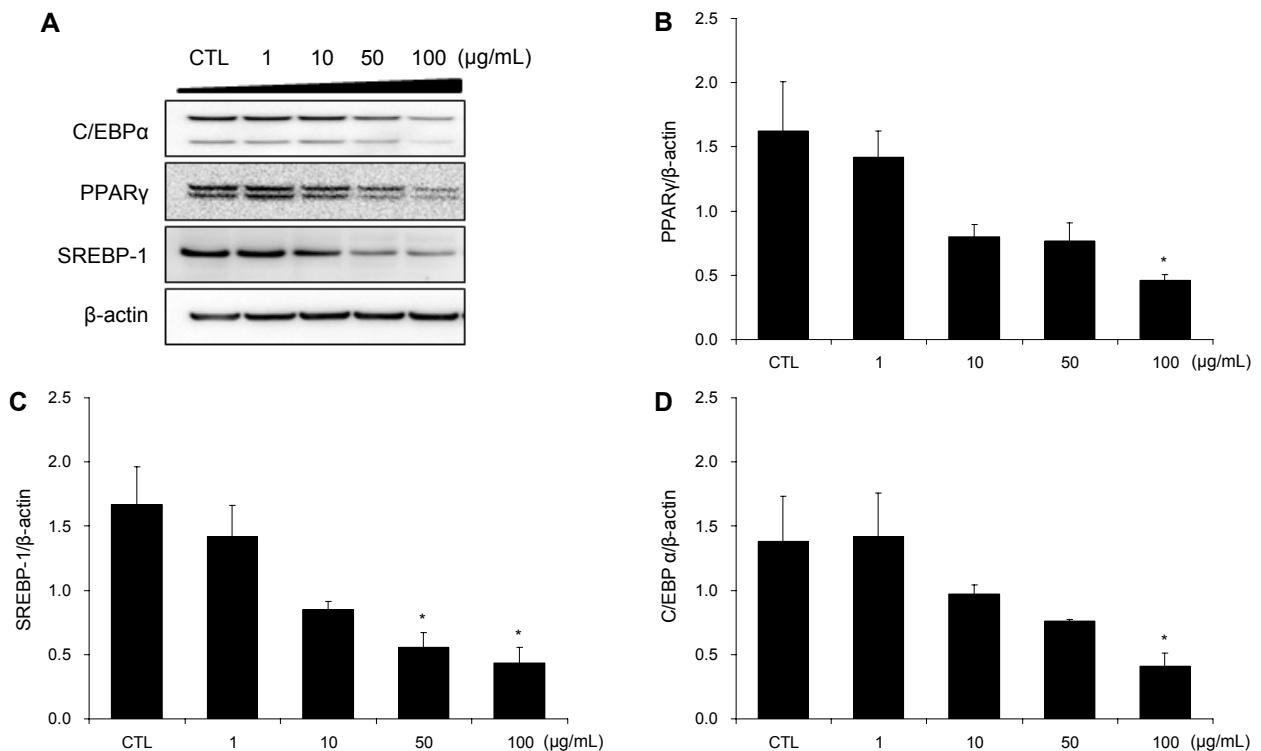


Fig. 4. Effects of catechu on the major adipogenic factor expression in 3T3-L1 adipocyte. PPAR γ , SREBP-1, and C/EBP α expression levels in 3T3-L1 adipocytes were analyzed by western blot. β-Actin was used as a control. Values are mean±standard error of 3 replicates and asterisks above the bars are significantly different from control (* $P<0.05$).

단계적인 조절에 의하여 유발되는 것으로 알려져 있고, 분화 과정에서 중추적인 역할을 하는 인자들로는 PPAR γ 와 SREBF-1 그리고 C/EBP α 가 보고되어 있으며(11,43), 이들 세 가지 전사인자는 지방세포 분화과정 중 각기 다른 시점에서 발현이 유도되며 상호작용을 통하여 여러 지방세포 특이 유전자들의 발현을 조절하고, 지방대사의 활성화와 지방세포 분화를 점진적으로 유도해 나간다(44). C/EBP α 는 지방전구세포에서 발현이 관찰되지 않지만 분화과정의 후반기에 발현이 촉진되어 지방세포 분화 관련 유전자의 발현을 조절하는 역할을 하고, PPAR γ 전사인자의 경우 ligand 특이성, cofactor recruitment 등에 의해 다양한 기능을 수행한다(11). PPAR γ 유전자는 서로 다른 전사 시작점과 alternative splicing을 이용하여 PPAR γ 1과 PPAR γ 2 두 종류의 isoform을 형성하는데, 특히 PPAR γ 2가 지방세포에서 선택적으로 발현하며 지방세포 분화와 지방산 대사조절에서 중요한 기능을 담당한다(11). SREBP-1의 isotype 중 하나인 SREBP-1c는 다양한 조직에서 발현되고 있는 SREBP-2와는 달리 지방세포에 특이적으로 높은 발현을 나타내며(45), 콜레스테롤 대사와 지방산 대사에 관여하는 수많은 유전자의 발현을 조절함으로써 지질 생합성에 직접 관여한다(13).

아선약 추출물이 분화 관련 기작과 직접적인 연관성을 가진 주요 조절인자들의 발현량에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하고자 분화유도제만 처리한 대조군과 분화유도제와 아선약을 병용 처리한 실험군을 각각 분화시킨 후 western blot을 통해 확인하였다(Fig. 4A). 단독으로 분화유도제만 처리한 대조군과 비교하여 PPAR γ 와 SREBP-1의 발현은 모두 농도 의존적으로 유의하게 감소였으며, 또한 C/EBP α 의 발현도 100 μ g/mL 농도에서 유의성 있는 감소 효과를 나타냈다(Fig. 4B~D). 아선약 추출물은 preadipocyte의 분화 초기에는 내생적으로 높은 발현을 보이는 SREBP-1c의 발현을 조절하여 지방형성을 억제시키고, 분화 후기에는 PPAR γ 와 C/EBP α 의 발현을 감소시켜 지방세포로의 분화를 저해함으로써 항비만 활성을 나타낼 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

지방전구세포가 지방세포로 분화하는 과정에서 아선약 추출물의 영향을 확인하고자 분화유도제를 처리하여 3T3-L1 세포에서 아선약의 세포독성, 지방축적 억제 효과, triglyceride 억제 효능, 지방분화 관련 단백질들의 발현을 확인하였다. 아선약 추출물을 최대 200 μ g/mL 농도까지 세포에 처리하여 세포독성을 측정된 결과 아선약 추출물은 100 μ g/mL 이하의 농도에서는 세포에 독성을 유발하지 않는 것으로 확인되었다. Oil red-O 염색을 통해 지방축적물을 확인한 결과 아선약 추출물에 의한 농도 의존적인 지방축적의 감소 효과가 있었다. Triglyceride 생성량 역시 농도 의존적

인 감소가 확인되었다. 아선약에 의한 지방분화의 감소가 어떠한 기작에 의해 조절되는지 확인하고자 관련 지표단백질인 PPAR γ 와 SREBF-1 그리고 C/EBP α 의 발현량 변화를 확인해본 결과 100 μ g/mL 농도에서 유의성 있게 감소하였다. 이상의 결과를 종합해볼 때 아선약 추출물은 지방세포의 분화억제와 분화된 지방세포의 지방축적을 저해함으로써 항비만 효과를 유도할 것으로 기대된다.

감사의 글

본 논문은 산업통상자원부 지역특화기술융합연구지원사업(과제번호: R0002039) 성과의 일부이며, 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Malterud K, Tonstad S. 2009. Preventing obesity: Challenges and pitfalls for health promotion. *Patient Educ Couns* 76: 254-259.
2. Dewulf EM, Cani PD, Neyrinck AM, Possemiers S, Van Holle A, Muccioli GG, Deldicque L, Bindels LB, Pachikian BD, Sohet FM, Mignolet E, Francaux M, Larondelle Y, Delzenne NM. 2011. Inulin-type fructans with prebiotic properties counteract GPR43 overexpression and PPAR γ -related adipogenesis in the white adipose tissue of high-fat diet-fed mice. *J Nutr Biochem* 22: 712-722.
3. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, Furukawa S, Tochino Y, Komuro R, Matsuda M, Shimomura I. 2007. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* 56: 901-911.
4. Bays H, Blonde L, Rosenson R. 2006. Adiposopathy: how do diet, exercise and weight loss drug therapies improve metabolic disease in overweight patients?. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 4: 871-895.
5. Ailhaud G, Grimaldi P, Nègrel R. 1992. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr* 12: 207-233.
6. Haugen F, Zahid N, Dalen KT, Hollung K, Nebb HI, Drevon CA. 2005. Resistin expression in 3T3-L1 adipocytes is reduced by arachidonic acid. *J Lipid Res* 46: 143-153.
7. Tenney R, Stansfield K, Pekala PH. 2005. Interleukin 11 signaling in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Physiol* 202: 160-166.
8. Guo X, Liao K. 2000. Analysis of gene expression profile during 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Gene* 251: 45-53.
9. MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. 1995. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9034-9037.
10. Wang Q, Li YC, Wang J, Kong J, Qi Y, Quigg RJ, Li X. 2008. miR-17-92 cluster accelerates adipocyte differentiation by negatively regulating tumor-suppressor Rb2/p130. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 2889-2894.
11. Farmer SR. 2006. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab* 4: 263-273.
12. Rosen ED, MacDougald OA. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 885-896.

13. Nam H, Kim JK, Jung H, Suh JG. 2014. Anti-obesity effects of the stem bark of Japanese horse chestnut (*Aesculus turbinata*) in 3T3-L1 preadipocytes. *Food Sci Biotechnol* 23: 289-292.
14. Ntambi JM, Kim YC. 2000. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 130: 3122S-3126S.
15. Zhao J, Sun XB, Ye F, Tian WX. 2011. Suppression of fatty acid synthase, differentiation and lipid accumulation in adipocytes by curcumin. *Mol Cell Biochem* 351: 19-28.
16. Jeon HJ, Kwon HJ. 2014. Antioxidant effects and functional evaluation of *Gynura procumbens* extract as a collaboration material for cosmetics and functional food. *Kor J Aesthet Cosmetol* 12: 499-507.
17. Bhandare AM, Kshirsagar AD, Vyawahare NS, Hadambar AA, Thorve VS. 2010. Potential analgesic, anti-inflammatory and antioxidant activities of hydroalcoholic extract of *Areca catechu* L. nut. *Food Chem Toxicol* 48: 3412-3417.
18. Rage N, Dahanukar S, Karandikar SM. 1984. Hepatoprotective effect of cyanidanol against carbon tetrachloride induced liver damage. *Indian Drugs* 22: 556-560.
19. Singh KN, Mittal RK, Barthwal KC. 1976. Hypoglycaemic activity of *Acacia catechu*, *Acacia suma*, and *Albizia odoratissima* seed diets in normal albino rats. *Indian J Med Res* 64: 754-757.
20. Ray DK, Sharatchandra KH, Thokchom IS. 2006. Antipyretic, antidiarrheal, hypoglycemic and hepatoprotective activities of ethyl acetate extract of *Acacia catechu* Willd. in albino rats. *Indian J Pharm* 38: 408-413.
21. Jayasekhar P, Mohanan PV, Rathinam K. 1997. Hepatoprotective activity of ethyl acetate extract of *Acacia catechu*. *Indian J Pharm* 29: 426-428.
22. Wang YH, Wang WY, Chang CC, Liou KT, Sung YJ, Liao JF, Chen CF, Chang S, Hou YC, Chou YC, Shen YC. 2006. Taxifolin ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through its anti-oxidative effect and modulation of NF-kappa B activation. *J Biomed Sci* 13: 127-141.
23. Wallis TE. 2005. *Text book of pharmacognosy*. 5th ed. CBS Publishers and Distributors, New Delhi, India. p 461-463.
24. Wang CK, Lee WH, Peng CH. 1997. Contents of phenolics and alkaloids in *Areca catechu* Linn. during maturation. *J Agric Food Chem* 45: 1185-1188.
25. Ramadan NM, Buchanan TM. 2006. New and future migraine therapy. *Pharmacol Ther* 112: 199-212.
26. Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 12: 564-582.
27. Hwang CR, Tak HM, Kang MJ, Suh HJ, Kwon OO, Shin JH. 2014. Antioxidant and antiobesity activity of natural color resources. *J Life Sci* 24: 633-641.
28. Dewanto V, Wu X, Liu RH. 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50: 4959-4964.
29. Lee JM, Son ES, Oh SS, Han DS. 2001. Contents of total flavonoid and biological activities of edible plants. *Korean J Dietary Culture* 16: 504-514.
30. Kumar S, Kumar D, Manjusha, Saroha K, Singh N, Vashishta B. 2008. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. methanolic fruit extract. *Acta Pharm* 58: 215-220.
31. Panickar KS, Anderson RA. 2011. Effect of polyphenols on oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neuronal death and brain edema in cerebral ischemia. *Int J Mol Sci* 12: 8181-8207.
32. Twentymen PR, Luscombe M. 1987. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br J Cancer* 56: 279-285.
33. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
34. Dif N, Euthine V, Gonnet E, Laville M, Vidal H, Lefai E. 2006. Insulin activates human sterol-regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) promoter through SRE motifs. *Biochem J* 400: 179-188.
35. Hwang CR, Kang MJ, Shim HJ, Suh HJ, Kwon OO, Shin JH. 2015. Antioxidant and antiobesity activity of various color resources extracted from natural plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 165-172.
36. Manickam E, Sinclair AJ, Cameron-Smith D. 2010. Suppressive actions of eicosapentaenoic acid on lipid droplet formation in 3T3-L1 adipocytes. *Lipids Health Dis* 9: 57.
37. Kim NS, Shon MS, Kim GN, Hwang YI. 2014. Anti-obese and antioxidant activities of *Spica prunellae* extract in 3T3-L1 and HepG2 cells. *Food Eng Prog* 18: 413-418.
38. Ahmadian M, Wang Y, Sul HS. 2010. Lipolysis in adipocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 555-559.
39. Labreuche J, Touboul PJ, Amarenco P. 2009. Plasma triglyceride levels and risk of stroke and carotid atherosclerosis: a systematic review of the epidemiological studies. *Atherosclerosis* 203: 331-345.
40. Lafontan M, Langin D. 2009. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res* 48: 275-297.
41. Kim HJ, Lee YM, Kim YH, Won SI, Choi SA, Choi SW. 2009. Inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes with *Magnolia officinalis* extracts. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 35: 117-123.
42. Cha SY, Jang JY, Lee YH, Lee G, Lee HJ, Hwang KT, Kim Y, Jun W, Lee J. 2010. Lipolytic effect of methanol extracts from *Luffa cylindrica* in mature 3T3-L1 adipocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 813-819.
43. Cornelius P, MacDougald OA, Lane MD. 1994. Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr* 14: 99-129.
44. Lim Y, Shin JY, Kim H, Baek GH, Yu KW, Jeong HS, Lee J. 2014. Anti-adipogenic effect of fermented coffee with *Monascus ruber* mycelium by solid-state culture of green coffee beans. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 624-629.
45. Lay SL, Lefrere I, Trautwein C, Dugail I, Krief S. 2002. Insulin and sterol-regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) regulation of gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 277: 35625-35634.