pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 33, No. 2, pp. 131~139 (2018)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2018.33.2.131

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

자색옥수수 포엽과 속대 추출물의 리파아제 저해활성 및 3T3-L1 지방전구세포에서의 지방분화 억제효과

이기연 · 홍수영 · 김태희 · 김재은 · 박아름 · 노희선 · 김시창 · 박종열[1] · 안문섭 · 정원진[2] · 김희연*
강원도농업기술원 농식품연구소, [1]강원도농업기술원 옥수수연구소, [2]지유본초

Inhibition of Pancreatic Lipase Activity and Adipocyte Differentiation in 3T3-L1 Cells Treated with Purple Corn Husk and Cob Extracts

Ki Yeon Lee, Soo Young Hong, Tae Hee Kim, Jai Eun Kim, A-Reum Park, Hee Sun Noh, Si Chang Kim, Jong Yeol Park[1], Mun Seob Ahn, Won Jin Jeong[2], and Hee Yeon Kim*
Agriproduct Processing Experiment Station, Gangwon-do Agricultural Research and Experiment Services, Chuncheon, Korea
[1]Hongcheon Maize Experiment, Gangwon-do Agricultural Research and Experiment Services, Hongcheon, Korea
[2]GUmediherb Co., Chuncheon, Korea
(Received November 30, 2017/Revised December 21, 2017/Accepted February 2, 2018)

ABSTRACT - Our review begins with the maize hybrid for grain, called 'Seakso 1,' which was developed in 2008 by the Gangwon Agricultural Research and Extension Services in Korea, and subsequently registered in 2011. In this study, we aimed to investigate the lipid metabolic enzyme activity and inhibitory effect on the adipocyte differentiation, in 3T3-L1 cells of the identified Seakso 1 corn husk and cob extracts (EHCS). We investigated the pancreatic lipase inhibitory effect and anti-adipogenic effect of EHCS.The lipid accumulation and adipocyte differentiation were measured by the procedure of Oil Red O staining, Real-time PCR and the Western blot analysis. The pancreatic lipase inhibitory activity of EHCS was measured at higher levels than those of the positive control (orlistat) at 100, 500, and 1,000 μg/mL. In particular, EHCS was noted as being significantly inhibited and including a measured adipocyte differentiation and lipid accumulation, when treated during the adipocyte differentiation process in 3T3-L1 cells. Based on the Oil Red O staining, EHCS inhibited lipid accumulation at 19.19%, 33.30% at 1000 μg/mL, 2000 μg/mL, respectively. The real-time PCR and Western blot analysis showed that EHCS significantly decreased in the mRNA expression and protein level of obesity-related factors, such as peroxisome-proliferatorsactivated-receptor-γ (PPARγ) and CCAAT enhancer-binding-proteins α (C/EBPα). This study potentially suggests that the Saekso 1 corn husk and cob extracts may improve lipid metabolism and reduce lipid accumulation.

Key words : Purple corn, Anti-obesity, 3T3-L1, PPARγ, C/EBPα

경제 성장과 식습관 변화로 인해 비만, 당뇨병, 고혈압, 고지혈증 및 동맥 경화와 같은 대사 증후군이 크게 증가하고 있는 추세이다[1)]. 대사 증후군 중 비만은 과도한 에너지 섭취, 포화 지방식이로 인한 지방 섭취량의 증가 및 신체 활동 감소와 같은 에너지 불균형으로 인하여 체지방이 축적되는 상태를 말한다[1,2)]. 과도한 지방의 축적으로 인한 지방 세포 수와 크기의 증가는 고지혈증, 고콜레스테롤, 고중성지방 및 지방간 등의 이상 지질 혈증을 일으키는 원인이 된다[3,4)]. 고지방 식이로 인한 비만은 조직과 혈액의 지질 과산화물 함량을 증가시키며 이것은 신체 조직의 산화적 손상과 항산화 방어 시스템의 불균형을 일으키는 것으로 알려져 있다[5,6)].

Lipoprotein lipase (LPL), pancreatic lipase, hepatic lipase 등의 지방분해효소는 혈장지질단백질(chylomicron) 또는 초저밀도지질단백질(very low-density lipoprotein, VLDL)에 있는 중성지방을 지방산과 글리세롤로 분해하고, 분해된 지방산을 세포 내로 유입시키는 기능을 한다. 세포내 유입된 지방산은 근육조직에서 에너지대사를 통하여 소진되고 지방조직에서 소진되지 못한 지방산은 중성지방으로

*Correspondence to: Hee Yeon Kim, Agriproduct Processing Experiment Station, Gangwon-do Agricultural Research and Experiment Services, Chuncheon 24203, Korea
Tel: 82-33-248-6526, Fax: 82-33-248-6555
E-mail: heeya80@korea.kr

전환되어 저장된다[7,8]. 지방세포는 체내 필요한 에너지를 축적하고 중성지방을 분해시켜 이용하는 역할을 하며 내분비 기관으로 지방 및 당 대사와 같은 체내 에너지 대사를 조절하는 것으로 알려져 있다[9]. 3T3-L1 지방전구세포는 SREBP1c, PPARγ 및 C/EBPα 등과 같은 전사인자들에 의하여 지방세포로 분화되어 세포 내 중성지방을 축적한다[10]. 지방세포는 분화과정에서 지방합성과 관련된 에너지대사 경로를 통하여 세포 내 유입되는 포도당을 저장한다. 이러한 대사과정을 거쳐서 생성된 NADPH가 NADPH oxidase에 의하여 $NADP^+$로 전환되면서 세포 내 활성산소(reactive oxygen species, ROS)를 발생시킨다[11]. 체내의 다양한 대사 과정에서 생성되는 활성산소와 체내 항산화 관련 효소들과의 불균형으로 유발된 산화스트레스는 비만, 당뇨 등과 같은 대사질환을 일으킨다. 또한 지방세포에 과도하게 축적된 활성산소로 인하여 3T3-L1 지방전구세포의 분화가 촉진되고 이는 또 다른 활성산소를 생성시켜 비만을 유발하는 주요 원인이 된다[12,13]. 따라서 lipase 등과 같은 지방분해효소 억제를 통하여 중성지방의 축적을 저해시키고, 지방세포 분화에 관여하는 여러 가지 전사인자의 활성을 억제시킴으로써 비만억제 효과를 향상시킬 수 있다[14,15]. 미국식품의약국(United States Food and Drug Administration)의 승인을 받은 비만 치료제인 오를리스타트(orlistat)는 위장장애, 쓸개즙분비장애, 과민증 등과 같은 장기복용에 따른 부작용이 나타나는 것으로 알려져 있다[16]. 따라서 현재 천연물을 이용한 비만 치료제가 개발되고 있으며 최근에는 비만 치료제 대신 다이어트 요법, 운동, 건강 기능 식품 섭취 등과 같은 대체 요법이 권장되고 있다[17,18].

본 연구에 사용된 자색옥수수 색소 1호는 2011년 강원도 농업기술원 옥수수연구소에서 개발한 품종으로 알곡은 노란색이고 속대와 포엽은 자색이다. 자색옥수수의 포엽, 속대 및 잎에서 cyanidin 3-O-glucoside를 포함한 9종의 안토시아닌이 분리되었고[19], 검정찰옥수수에서 cyanidin 3-O-glucoside를 포함한 5종의 안토시아닌이 분리되었다고 보고되었다[20,21]. 최근 본 연구에 앞서 색소 2호 알곡의 일반성분, 유리당, 지방산 조성 및 안토시아닌 함량에 관한 연구와 색소 2호 알곡 및 속대 추출물의 고지방-고콜레스테롤 식이로 비만이 유도된 쥐의 체내 항산화 체계 향상에 관한 연구가 보고된 바 있다[22,23]. 안토시아닌의 주요 기능성으로는 항산화, 항세균성, 항돌연변이, 항암활성, 항당뇨, 항비만 효과 등이 있으며[24,25], 안토시아닌의 항산화 활성 효과면에서 주로 활성산소 제거능, 지질과산화물 생성억제의 효과 등이 보고되었다[26,27].

본 연구는 자색옥수수 색소 1호 포엽과 속대 추출물의 항비만 활성을 검정하고자, 지방분해효소 저해활성을 평가하고 3T3-L1 지방전구세포에서 지방분화억제 효과를 조사하였다. 본 연구의 결과는 향후 자색옥수수 색소 1호의 항비만 활성 기능성 식품 개발에 관한 기초자료로 제공하고자 한다.

Materials and Methods

실험재료

본 연구에 사용된 자색옥수수 색소 1호 품종은 2016년도에 강원도농업기술원 옥수수연구소에서 표준재배법에 준하여 재배되었다. 재배된 색소 1호를 수확하여 수염과 외피를 제거하고 건조하여 포엽과 속대를 분리한 다음 분쇄하여 추출시료로 사용하였다. 색소 1호 포엽과 속대 건조분말시료 500 g에 0.1% citric acid가 함유된 30% 에탄올을 10 L씩 첨가하고 12시간 동안 상온 교반하여 3회 반복 추출하였다. 추출액을 여과하여 감압농축하고 부형제로 30% dextrin을 첨가한 다음 동결건조하여 cyanidin 3-O-glucoside (C-3-G) 함량분석용, pancreatic lipase 저해활성 및 지방전구세포 분화 억제 검정용 시료로 사용하였다.

총 안토시아닌 함량 측정

색소 1호 포엽 및 속대 추출 분말시료 0.1 g에 0.1% citric acid가 함유된 30% 에탄올을 첨가하여 50 mL로 정용하였다. 완전히 용해된 추출물 용액을 0.45 μm membrane filter에 통과시켜 분광광도계(Evolution 201, Thermo, Waltham, MA, USA)를 사용하여 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 cyanidin 3-O-glucoside chloride (Sigma Chemical Co., St, Louis, MO, USA)를 사용하여 정량곡선을 작성하고 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 총 안토시아닌 함량을 정량하였다.

C-3-G 색소 정량 분석

색소 1호 포엽 및 속대 추출 분말시료 0.1 g에 0.1% citric acid가 함유된 30% 에탄올을 첨가하여 50 mL로 정용하였다. 완전히 용해된 추출물 용액을 0.45 μm membrane filter에 통과시켜 HPLC (Nano Space SI-2, Shiseido, Japan) 분석시료로 사용하였다. 컬럼은 Unison CL-C_{18} (150 × 4.6 mm, 3 μm, Imtakt, Kyoto, Japan)을 사용하였고, 0.1% trifluoroacetic acid와 100% acetonitrile을 이동상으로 사용하여 시료 주입량 5 μL, 컬럼 온도 35°C, 유속 1000 μL/min으로 20분 동안 분석하였다(Table 1). 표준물질로 cyanidin 3-O-glucoside (Sigma Chemical Co., St, Louis, MO, USA)를 사용하여 정량곡선을 작성하고 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 C-3-G 함량을 정량하였다.

Pancreatic lipase 저해활성

리파아제 저해 활성은 Kim 등의 방법[28]에 따라 측정하였으며 각 well에 porcine pancreatic lipase 0.3 mg과 10 mM

Table 1. HPLC analytical condition of cyanidin 3-O-glucoside

Classification	Condition		
Instrument	Nano Space SI-2, 3023 (Shiseido, Japan)		
Column	Unison UK-C_{18} (150 × 4.6 mm, 3 μm)		
Column temp	35°C		
Mobile phase	Eluent A: d-water (0.1% trifluoroacetic acid) Eluent B: acetoniltrile		
Injection volume	5 μL		
Detector	UV 525 nm		
Run time	20 min		
Gradient table			
Time (min)	Flow rate (μL)	%A	%B
initial	1000	95	5
5	1000	95	5
10	1000	80	20
20	1000	95	5

MOPS을 첨가하였다. 1 mM EDTA 100 mM Tris-HCl/5 mM $CaCl_2$ (pH 6.8) 700 μL를 첨가 하여 enzyme buffer로 사용하였으며 enzyme buffer에 색소 1호 포엽 및 속대 추출물과 orlistat (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 농도별로 100 μL씩 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시켰다. 반응 후 기질로 10 mM p-Nitrophenyl butyrate (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 20 μL씩 첨가하고 37°C에서 15분 동안 반응시킨 뒤 ELISA reader (FLUOstar Omega, BGM LABTECH, Ortenberg, Germany)를 사용하여 400 nm에서 흡광도를 측정하고 다음의 식을 이용하여 저해활성을 계산하였다.

Lipase 저해활성(%) =

[1 – (시료를 처리한 구의 흡광도 – 효소를 처리하지 않은 구의 흡광도)/시료를 처리하지 않은 구의 흡광도] × 100

3T3-L1 지방전구세포의 배양 및 분화유도

3T3-L1 (CL-173) 세포는 미국 세포주 은행인 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 마우스 지방전구세포인 3T3-L1 세포에 10% fetal bovine serum (FBS)과 penicillin-streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Hyclone®, Logan, UT, USA)를 첨가하여 5% CO_2, 37°C의 조건하에서 배양하였다. 배양된 3T3-L1 세포가 confluent 상태가 되면 trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 수확하고 6 well plate에 5×10^6/well의 농도로 분주한 다음 100% confluency 상태에서 48시간 방치하였다. 추출물이 지방세포분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 10% FBS와 MDI (0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 μM dexamethasone (Calbiochem, Darmstadt, Germany), 1 μg/mL insulin (Sigma, St. Louis, MO, USA))가 첨가된 DMEM배지를 처리하여 분화를 유도하였다. MDI 배지 처리 2일 후에 1 μg/mL insulin (Sigma, St. Louis, MO, USA)만 첨가된 10% FBS-DMEM으로 배지를 교체하여 2일 동안 배양하였고, 2일 마다 10% FBS DMEM 배양액으로 교체하여 4일 동안 분화를 유도하였다. 지방세포 분화를 유도하는 동안 각 배양액에 추출물을 100, 250, 500, 1000, 2000 μg/mL의 농도로 처리하였다.

세포 독성 분석

추출물의 세포독성은 탈수소 효소작용에 의해 노란색의 수용성 기질인 tetrazolium salts (WST-1)을 formazan으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하여 간접적으로 세포생존율을 측정하는 WST-1 cell proliferation assay (Cayman Chemical, MI, USA)를 통하여 측정하였다[29]. 3T3-L1 세포를 96 well plate에 1×10^4/well의 농도로 분주하고 24시간 후 추출물을 농도별로 처리하여 5% CO_2, 37°C incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 WST-1 시약을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 ELISA reader (FLUOstar Omega, BGM LABTECH, Ortenberg, Germany)를 통해 450 nm에서 흡광도를 측정 하였다.

Oil Red O 염색

색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 3T3-L1 지방전구세포의 분화억제 활성을 검정하기 위하여 Oil Red O 염색을 수행하였다. 3T3-L1 지방전구세포의 분화가 완료된 시점에서 배지를 제거하고 phosphate-buffered saline (PBS)로 세척한 다음 10% formaldehyde 용액을 30분간 처리하여 세포를 고정시켰다. 상온에서 고정한 뒤 용액을 제거하고 PBS와 70% ethanol로 각각 2번씩 세척한 다음 Oil Red O 용액을 이용하여 염색을 실시하였다. 지방세포로 분화를 유도하지 않는 지방전구세포를 음성대조군(Negative control, NC), 지방세포로 분화를 유도하고 추출물을 처리하지 않은 지방세포를 양성대조군(Positive control, PC)으로 사용하였다. 각각 염색된 세포를 광학현미경(AG AXIO OBSERVER D1 INVERTED MICROSCOPE, CARL ZEISS, German)을 사용하여 400배 배율로 이미지를 관찰하고, 염색된 lipid droplet는 isopropyl alcohol 용액으로 추출한 다음 510 nm에서 흡광도(xMark™ microplate absorbance spectrophotometer, BIO-RAD, JAPAN)를 측정하여 시료 처리군의 흡광도 값을 시료 무처리군(양성대조군)의 흡광도 값으로 나누어 세포의 지방 함량을 백분율로 나타내었다.

Real-time PCR을 이용한 유전자 발현 측정

Real-time PCR을 이용한 유전자 발현 측정은 지방세포 분화 억제활성 측정방법과 동일한 방법으로 세포를 배양하고 분화된 3T3-L1 세포를 TRIzol reagent (Invitrogen, CA, USA)를 이용하여 RNA를 추출하고 total RNA를 정

Table 2. Primer sequence used in Real-time PCR

Primers	Sequence		Size (bp)
	Forward	Reverse	
GAPDH	CACTCACGGCAAATTCAACGGCAC	GACTCCACGACATACTCAGCAC	149
PPARγ	AGTCGGTGGACAAAGAACAGC	ACTCCAGCACCTTCTGTTGC	101
C/EBPα	TTGACCCAGAGCATGGTGC	GAAGTTGGTGGGCCAGAATG	124

Table 3. Pancreatic lipase inhibitory activity of Saekso 1 husk and cob extracts

Samples (μg/mL)	Pancreatic lipase inhibition (%)					
	100	250	500	1000	2500	IC_{50} [1)]
Orlistat	11.52 ± 2.33[2)a 3)]	-	40.38 ± 1.16[b]	67.81 ± 0.77[c]	100.00 ± 0.08[d]	880
Extracts	36.34 ± 2.54[a]	45.48 ± 3.48[b]	77.37 ± 4.69[a]	90.14 ± 9.02[a]	-	320

[1)] IC_{50} : The half maximal inhibitory concentration.
[2)]Value are mean ± SD (n = 3).
[3)]Values with different superscripts within a column indicate significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

량하였다. 추출된 RNA를 DNase가 포함되어 있는 High capacity cDNA Reverse Transcription Kits (applied bio-systems, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 cDNA로 합성하고 SYBR green과 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), PPARγ, C/EBPα primer를 이용하여 Real-time PCR (StepOne Real-time PCR system, Applied Biosystems, Singapore)을 수행하였다. 대조군 유전자로는 GAPDH를 사용하였다. 또한 Real-time PCR system을 이용하여 형광 신호를 정량하였다. 주요 유전자의 primer 및 sequence는 Table 2와 같다[10)].

Western blot을 통한 단백질 발현측정

지방세포 분화가 완료된 3T3-L1 세포는 PBS로 2번 세척한 후 protease inhibitor가 포함된 RIPA buffer (Sigma, St. Louis, MO, USA)로 30분간 ice에서 용해시킨 뒤 4°C에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 원심분리하여 얻어진 상층액은 10% SDS polyacrylamide gel로 전기영동을 통해 단백질을 분리한 뒤 nitro cellulose membranes (#1620112, BIO-RAD, Germany)으로 transfer하였다. 1차 항체는 anti-PPARγ (#2435, Cell signaling, USA), anti-C/EBPα (#2295, Cell signaling, USA)와 anti-GAPDH (#3683, Cell signaling, USA)를 사용하였고 2차 항체로는 HRP-conjugated anti-rabbit (1:5000)을 사용하였다. 각각의 단백질 발현양은 Chemidoc XRS+ with Image Lab software (BIO-RAD, USA)를 이용하여 분석하였다[31)].

통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복 실시하였고 결과는 평균(mean)과 표준편차(SD)로 나타내었으며, 통계처리는 SPSS (Statistical Package for Social Science, version 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 일원배치 분산분석 (one-way ANOVA)을 실시한 후 Duncan's multiple range test로 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

Results and Discussion

총 안토시아닌 및 C-3-G 색소 분석

주로 안토시아닌 색소의 추출용매로는 메탄올이나 에탄올을 사용하고, 추출효과와 안토시아닌 색소의 안정성을 높이기 위해 HCl이나 유기산을 사용하는데[33)] 식용색소로 활용을 위한 색소 추출의 용매로 HCl과 같은 강산과 메탄올은 적합하지 않다고 판단되었다. 따라서 본 연구에서는 Fuleki과 Francis[32)], Lee 등[33)]의 연구를 참고하여 안토시아닌 색소의 안정성을 높이기 위한 pH 조절제로 0.1% citirc acid를 선택하였고, 향후 식품으로의 활용도를 고려하여 30% 에탄올을 사용하였다.

본 연구에서 C-3-G를 표준물질로 하여 정량한 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 총 안토시아닌 함량은 8.61 ± 0.11%이었고, HPLC를 통하여 분석한 C-3-G의 함량은 1.46 ± 0.01%인 것으로 나타났다. Li 등[19)]의 자색옥수수의 부위별 안토시아닌 함량분석에 관한 연구에서 자색옥수수의 포엽, 속대, 잎에서 C-3-G를 포함한 10종의 안토시아닌 색소가 확인되었으며, 자색옥수수 속대의 1% citric acid를 포함한 60% 에탄올 추출물에서 C-3-G를 포함한 9개의 안토시아닌 색소가 확인되었다[35)]. 국내의 연구에 따르면 자색옥수수 포엽 추출물의 안토시아닌 색소 중 C-3-G의 상대적 함량이 40%이상을 차지하며, 자색옥수수로부터 추출된 색소는 우수한 항산화, 항당뇨 및 항비만 활성을 나타낸다고 보고되었다[34)]. 색소 1호 옥수수는 포엽과 속대에 자색이 발현되는 품종으로 풍부한 안토시아닌 색소를 함유한 기능성 식품소재로의 활용가치가 높을 것이라 판단된다.

Pancreatic lipase 저해 활성

색소 1호 포엽 및 속대 추출물이 lipase저해 활성에 미치는 영향은 추출물의 농도에 따라 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다(Table 4). 추출물의 100, 500, 1,000 μg/mL 농도처리구에서 양성대조군인 orlistat 보다 높은 저해활성을 보였으며, 추출물과 orlistat의 IC_{50} 값은 각각 320, 880 μg/mL로 orlistat과 비교하였을 때 높은 저해활성을 나타내었다. Pancreatic lipase는 triacylglycerol을 2-monoacyl-glycerol과 fatty acid로 분해하는 효소로 이 효소의 활성이 저해되면 triacylglycerol의 분해가 감소되고 지방질의 흡수가 감소되어 비만 예방 및 완화 효과를 기대할 수 있으며 최근 비만치료를 위한 방법으로서 pancreatic lipase inhibitor가 사용되고 있다[36,37].

세포 독성 평가

색소 1호 포엽 및 속대 추출물이 3T3-L1 지방전구세포의 세포독성에 미치는 영향을 확인하기 위해 WST-1 assay를 수행하였다. 3T3-L1 지방전구세포를 96 well plate에 1 × 10^4/well 세포수로 분주하여 배양한 후 추출물을 각각 농도별(0, 100, 250, 500, 1000, 2000 μg/mL)로 24시간 동안 처리하여 세포독성을 평가한 결과, 추출물의 모든 처리농도에서 3T3-L1 지방전구세포의 세포 생존율에 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다(Fig. 1).

3T3-L1 지방전구세포 분화에 미치는 영향

분화된 3T3-L1 지방전구세포를 Oil Red O로 염색하고 광학현미경을 통해 관찰한 결과는 Fig. 2(A)와 같다. 3T3-L1 지방전구세포에서 축적된 lipid droplet은 phospholipid monolayer에 의해 둘러싸인 중성지방으로 이 중성지방과 cholesterol ester만 Oil red O로 염색이 되고 그 외의 유리지방산과 인지질은 염색이 되지 않는다. 따라서 Oil red O 염색을 통해 세포 내 중성지방을 확인하고 축적된 lipid droplet을 관찰할 수 있다[38]. 또한, 3T3-L1 지방전구세포가 지방세포로 분화되는 과정에서 생성되는 lipid droplet는 PPARγ와 같은 중요한 adipogenic transcription factor들에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다[39]. 색소 1호 포엽과 속대 추출물을 처리하지 않고 분화시킨 양성대조군은 lipid droplet의 형성이 활발하게 유발되었으나 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 처리에 의해 농도 의존적으로 lipid droplet의 형성이 억제되는 것으로 나타났다. 염색된 lipid droplet을 isopropyl alcohol 용액으로 용해하고 510 nm에서 흡광도를 측정하여 양성대조군에 대비한 지방 축적 정도를 분석한 결과, 추출물의 처리로 인하여 지방세포 분화 및 지방생성이 억제되는 것을 확인하였고, 추출물을 처리하지 않고 분화시킨 양성대조군에 대비하여 추출물의 1000 μg/mL와 2000 μg/mL 농도에서 각각 19.19 ± 3.70%, 33.30 ± 3.23%로 세포 내 중성지방이 유의하게 감소된 것으로 나타났다(Fig. 2(B)). 본 실험결과를 통하여 추출물이 농도의 존적으로 3T3-L1 지방전구세포에서 지방세포로의 분화 및 지방생성을 억제한다는 것을 확인할 수 있었다.

PPARγ, C/EBPα 유전자 발현에 미치는 영향

색소 1호 포엽 및 속대 추출물에 의한 지방세포형성 억

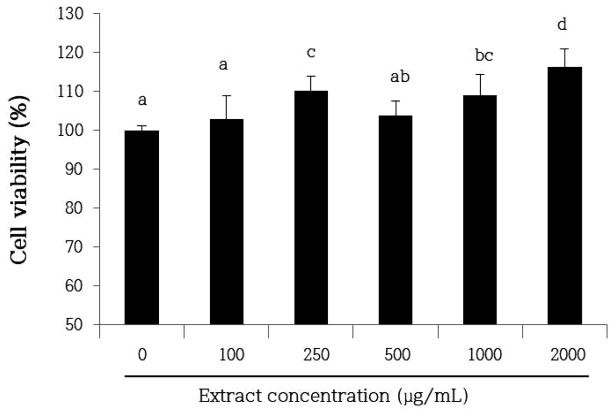

Fig. 1. Effect of Seakso 1 husk and cob extracts on cell viability in 3T3-L1 adipocytes. Each bar represents the mean ± SD (n = 3). Bars with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

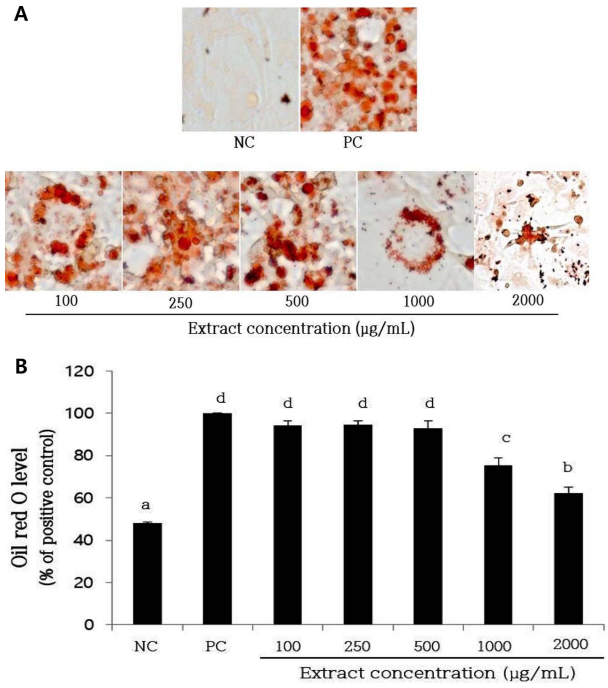

Fig. 2. Inhibitory effect of Seakso 1 husk and cob extracts on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocyte. Intracellular lipids were stained with Oil Red O and the cells were observed by a microscope (400 ×) (A). Oil Red O dye was dissolved in isopropnae and detected at 510 nm (B). Each bar represents the mean ± SD (n = 3). Bars with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

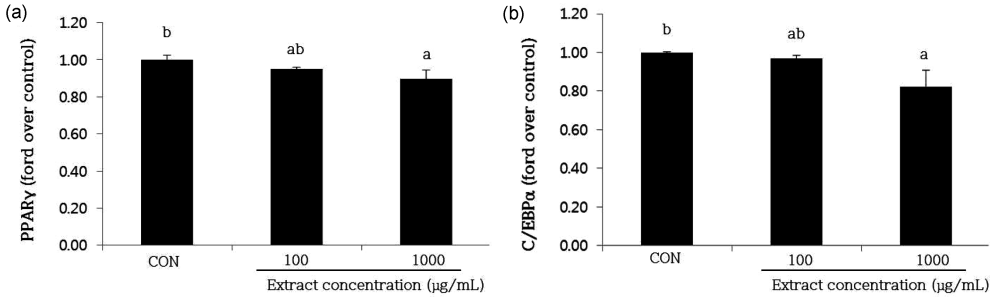

Fig. 3. Effect of Seakso 1 husk and cob extract on PPARγ (a) and C/EBPα (b) mRNA expression level in 3T3-L1 preadipocyte. CON : differentiated adipocyte. Each bar represents the mean ± SD (n = 3). Bars with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

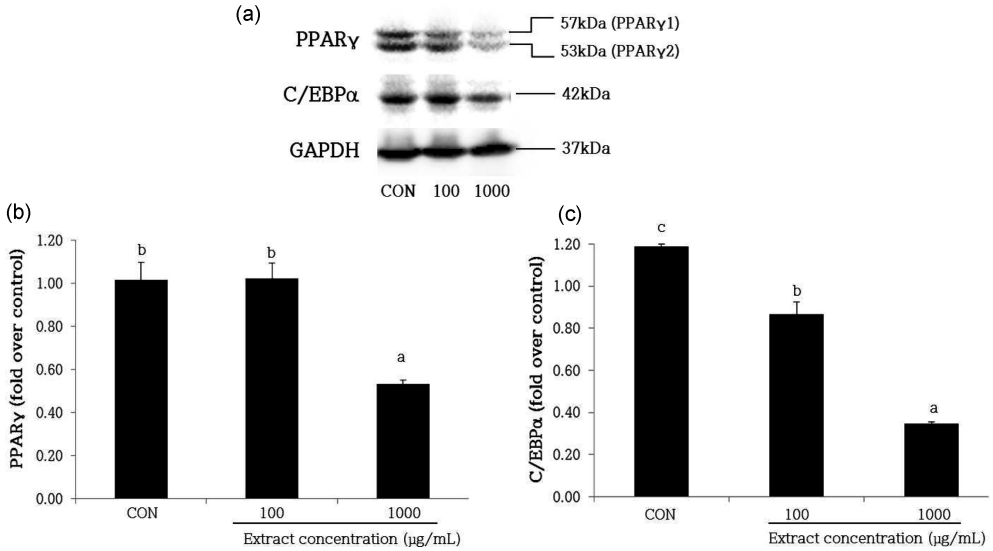

Fig. 4. Effect of Seakso 1 husk and cob extracts on PPARγ and C/EBPα protein expression in 3T3-L1 preadipocyte. CON : differentiated adipocyte. Each bar represents the mean ± SD (n = 3). Bars with different letters are significantly different at $p < 0.05$. The density of protein bands (a) and expression level of PPARγ (b) and C/EBPα (c) were measured by Western blot analysis.

제 효과를 확인하기 위해 지방세포 분화 억제활성 측정방법과 동일한 방법으로 세포를 배양하고 추출물을 농도별로 처리한 후, 분화를 유도하고 추출물을 처리하지 않는 대조군과 추출물을 처리한 실험군의 PPARγ와 C/EBPα의 유전자 발현량을 측정하였다. Adipogenesis는 지방전구세포가 분화되는 과정을 거쳐 지방세포로 성숙되는 과정을 의미한다. 지방전구세포에서 지방세포로 분화되는 과정에는 여러 종류의 adipogenic factor들이 관여하고 지방세포 특이적 유전자들의 발현이 유도된다고 알려져 있다[30]. Adipogenesis가 유도되는 과정에서 PPARγ와 C/EBPα는 중추적인 역할을 하는 전사인자로 지방세포가 분화된 상태를 유지하는 필수 인자인 PPARγ는 adipogenesis를 총괄적으로 조절하는 역할을 하며, C/EBPα는 PPARγ의 활성화 및 지속적인 유지작용을 통하여 지방세포의 말기 분화과정을 촉진하고 성숙한 지방세포 생성을 위한 인슐린 감수성에 중요한 역할을 한다[40]. C/EBPα가 제거된 돌연변이 동물모델의 간과 지방 세포에서 지질을 축적하지 못하는 것으로 보고되었다[41]. 따라서 지방세포가 분화하는 과정에 관여하는 PPARγ와 C/EBPα 등과 같은 전사인자들의 활성 억제는 효과적인 비만억제 및 비만 관련 대사질환의 치료와 예방에 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다. 색소 1호 포엽 및 속대 추출물이 PPARγ, C/EBPα 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Real-time PCR를 실시하여 PPARγ와 C/EBPα 유전자 발현량을 측정한 결과, 추출물을 처리하지 않고 분화시킨 대조군에서는 PPARγ와 C/EBPα의 유전자 발현이 증가하였으며, 추출물 처리에 의해 PPARγ와 C/EBPα의 유전자 발현이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이는 Oil red O 염색을 통하여 확인된 중성지방 생성 감소와 일치하는 경향을 보였다. 따라서 색소 1호 포엽 및 속대 추출물이 3T3-L1 지방전구세포에서 adipogenic factor인 PPARγ와 C/EBPα 유전자 발현을 억제시킴으로써 세포 내 lipid droplet와 중

성지방의 생성을 감소시켜 지방세포로의 분화를 억제시킨 것으로 판단된다.

PPARγ, C/EBPα 단백질 발현에 미치는 영향

색소 1호 포엽 및 속대 추출물이 PPARγ, C/EBPα 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Western blot을 실시하여 PPARγ와 C/EBPα 단백질 발현량을 측정한 결과, 추출물을 처리하지 않고 분화시킨 대조군에서는 PPARγ와 C/EBPα의 단백질 발현이 증가하였으며, 추출물 처리에 의해 PPARγ와 C/EBPα의 단백질 발현이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 지방세포의 분화가 시작되면 인슐린과 같은 호르몬에 의해 분화 초기에 C/EBPβ가 발현되는데 이는 retinoid X receptor와 heterodimer의 형성과 관련된 표적 유전자의 발현을 조절하는 전사인자로 PPARγ와 C/EBPα를 활성화 시켜 다양한 지방 특이적 유전자의 발현을 유도한다. 이러한 전사인자들의 활성화를 통해 지방세포의 분화가 진행되고 중성지방 내 lipid droplet의 수와 크기가 증가하여 지방세포의 분화가 완료된다[42,43]. 현재 지방세포 분화 관련 전사인사를 제어하여 비만을 예방하고 조절하는 연구가 진행되고 있으며[42,43] 본 연구에서 색소 1호 포엽 및 속대 추출물이 3T3-L1 지방전구세포에서 adipogenic factor인 PPARγ와 C/EBPα의 유전자 및 단백질 발현을 억제시킴으로써 항비만 효과를 가진 기능성 식품으로서의 활용가치가 높을 것이라 판단된다.

Acknowledgement

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 “지역특성화산업육성사업(R&D, R0005872)”로 수행된 연구결과입니다.

국문요약

본 연구는 자색옥수수 색소 1호 포엽과 속대 추출물의 항비만 활성을 검정하고자 지방분해효소 저해활성을 평가하고 3T3-L1 지방전구세포에서 지방분화억제 효과를 검정하고자 수행되었다. Pancreatic lipase 저해 활성 결과, 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 100, 500, 1,000 μg/mL 농도처리구에서 양성대조군인 orlistat 보다 높은 저해 활성을 나타내었다. 3T3-L1 지방전구세포를 배양하여 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 세포독성 평가를 수행한 결과, 추출물은 모든 처리농도에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않은 것으로 확인되었다. 분화된 3T3-L1 지방전구세포에서 색소 1호 포엽과 속대 추출물을 처리하지 않고 분화시킨 대조군은 lipid droplet의 형성이 활발하게 유발되었으나 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 처리에 의해 농도의존적으로 lipid droplet의 형성이 억제되는 것으로 나타났다. Real-time PCR과 Western blot을 실시하여 PPARγ와 C/EBPα 유전자 및 단백질 발현량을 측정한 결과, 추출물을 처리하지 않고 분화시킨 대조군에서는 PPARγ와 C/EBPα의 유전자 및 단백질 발현이 증가하였으며, 추출물 처리에 의해 PPARγ와 C/EBPα의 유전자 및 단백질 발현이 유의적으로 감소하였다. 본 연구 결과는 색소 1호 포엽 및 속대 추출물이 pancreatic lipase 활성 및 지방전구세포의 분화를 억제시킴으로써 항비만 활성 기능성 물질로의 활용 가능성이 높음을 시사한다.

References

1. Kopelman P. G.: Obesity as a medical problem. *Nature,* **404**(6778), 635-643 (2000).
2. Kang W. Y., Kim M. Y., Jin J. Y., Yang H. K., Hong H. J., Kim D. G., Han C. H., Lee Y. J.: Anti-obesity effects of onion juice in high fat diet-induced obese rats *Korean J. Vet Res.,* **50**(1), 1-10 (2010).
3. Kissebah A. H., Vydelingum N., Murray R., Evans D. J., Hartz A. J., Kalkhoff R. K., Adams P. W.: Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.,* **54**, 254-260 (1982).
4. Krotkiewski M., Bjorntorp P., Sjostrom L., Smith U.: Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J Clin Invest.,* **72**, 1150-1162 (1983).
5. Ginsberg H. N., Le N. A., Gibson J. C.: Regulation of the production and catabolism of plasma low density lipoproteins in hypertriglyceridemic subjects. Effect of weight loss. *J Clin Invest.,* **75**, 614-623 (1985).
6. Jeon S. M., Bok S. H., Jang M. K., Lee M. K., Nam K. T., Park Y. B., Rhee S. J., Choi M. S.: Antioxidative activity of naringin and lovastatin in high cholesterol-fed rabbits. *Life Sci.,* **69**, 2855-2866 (2001).
7. Wang H., Eckel R. H.: Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*., **297**, 271-288 (2009).
8. Braun J. E., Severson D. L.: Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem. J*., **287**, 337-347 (1992).
9. Heimburger D. C., Lucas C. P., Robbins D. C., Chung J., Heymsfield S. B.: Weight control and risk factor reduction in obese subjects treated for 2 years with orlistat: a randomized controlled trial. *J. Am. Med. Assoc*., **281**, 235-242 (1999).
10. Choi H. Y., Kim G. H.: Inhibitory Effects of *Allium senescens* L. methanol extracts on reactive oxygen species production and lipid accumulation during differentiation in 3T3-L1 cells. *Korea J. Food Sci. Technol*., **46**(4), 498-504 (2014).
11. Lee O. H., Kwon Y. I., Hong H. D., Park C. S., Lee B. Y., Kim Y. C.: Production of reactive oxygen species and changes in antioxidant enzyme activities during differentiation of 3T3-L1 adipocyte. *J. Korean. Soc. Appl. Biol. Chem*., **52**, 70-75 (2009).
12. Halliwell B.: Antioxidants in human health and disease.

Annu. Rev. Nutr., **16**, 33-50 (1996).
13. Yamashita A., Soga Y., Iwamoto Y., Asano T., Li Y., Abiko Y., Nishimura F.: DNA microarray analyses of genes expressed differentially in 3T3-L1 adipocytes co-cultured with murine macrophage cell line RAW264.7 in the presence of the toll-like receptor 4 ligand bacterial endotoxin. *Int. J. Obesity*, **32**, 1725-1729 (2008).
14. Moreno D. A., Ilic N., Poulev A., Brasaemle D. L., Fried S. K., Raskin I.: Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. *Nutrition*, **19**, 876-879 (2003).
15. Ntambi J. M., Kim Y. C.: Adipocyte differentiation and gene expression. *J. Nutr.*, **130**, 3122-3126 (2000).
16. Davidson M. H,. Hauptman J., DiGirolamo M., Foreyt J. P., Halsted C. H., Heber D., Heimburger D. C., Lucas C. P., Robbins D. C., Chung J., Heymsfield S. B.: Weight control and risk factor reduction in obese subjects treated for 2 years with orlistat: a randomized controlled trial. *J. Am. Med. Assoc.*, **281**, 235-242 (1999).
17. Yao F., MacKenzie R. G.: Obesity drug update: The lost decade? *Pharmaceuticals*, **3**, 3494-3521 (2010).
18. Lee M. R., Oh D. S., Wee A. J., Yun B. S., Jang S. A., Sung C. K.; Anti-obesity effects of *Lentinus edodes* on obese mice induced by high fat diet. *J Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **43**(2), 194-199 (2014).
19. Li C. Y., Kim H. W., Won S. R., Min H. K., Park K. J., Park J. Y., Ahn M. S., Rhee H. I.: Corn husk as a potential source of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.,* **56**, 11413-11416 (2008).
20. Kim S. L., Kim E. H., Son Y. K., Song J. C., Hwang J. J., Hur H. S.: Identification of anthocyanin pigments in black waxy corn kernels. *Korean J. Breed*, **31**, 408-415 (1999).
21. Kim S. L., Hwang J. J., Song J., Song J. C., Jung K. H.: Extraction, purification and quantification of anthocyanins in colored rice, black soy bean and black xaxy corn. *Korean J. Breed,* **32**, 146-152 (2000).
22. Lee K. Y., Kim T. H., Lim S. H., Park J. Y., Kim K. H., Ahn M. S., Kim H. Y.: Proximate, free sugar, fatty acids composition and anthocyanins of Saekso 2 corn kernels *J. Food Hyg. Saf.,* **31**(5), 335-341 (2016).
23. Lee K. Y., Kim J. E., Hong S. Y., Kim T. H., Noh H. S., Kim S. C., Park J. Y., Ahn M. S., Kim H. Y.; Effect of Saekso 2 corn kernels and cobs extracts on antioxidant activity in rats fed high fat-cholesterol diet. *J. Food Hyg Saf.,* **31**(6), 399-405 (2016).
24. Kim J. T., Son Y. B., Lee J. S., Baek S. B., Woo K. S., Jung G. H., Kim M. J., Jeong K. H., Kwon. Y. U.: Effects of particle size on antioxidant activity and cytotoxicity in purple corn seed powder. *Korean J. Crop. Sci.*, **57**, 353-358 (2012).
25. Lee J. S., Son B. M., Kim J. T., Ku J. H., Han O. K., Baek S. B., Moon J. K., Hwang J. J., Kwon Y. U.: Change of total anthocyanin contents and antioxidant activities of purple waxy corn inbred lines and hybrids during grain filling. *Korean J. Breed Sci.*, **44**, 290-300 (2012).
26. Duan X. W., Jiang Y. M., Zhang Z. Q., Shi J.: Antioxidant properties of anthocyanin extracted from litchi (*Litchi chinenesis* Sonn.) fruit pericarp tissues in relation to their role in the pericarp browning. *Food Chem.*, **101**, 1365-1371 (2006).
27. Chung M. G., Lim J. D.: Antioxidant, Anticancer and Immune Activation of Anthocyanin Fraction from Rubus coreanus Miquel fruits (Bokbunja). *Korean J. Medicinal Crop Sci.,* **20**, 259-269 (2012).
28. Kim J. H., Kim H. J., Kim C. Y., Jung H. Y., Kim Y. O., Ju J. Y., Shin C. S.: Development of lipase inhibitors from various derivatives of monascus pigment produced by Monascus fermentation. *Food Chem.*, **101**, 357-364 (2009).
29. Lim C. L., Son H. J., Cho I. Y., Kim G. W., Choi S. J., I. S., Han K. Y., Choi J. Y., Noh B. S.: Physiological functionality and cytotoxic effect of Korean traditional noble wine, Samhaeju, and commercial rice wine on various tumor cell lines. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **41**(6), 687-693 (2009).
30. Choi J. H., Park Y. H., Lee I. S., Lee S. P., Yu M. H.: Antioxidant activity and inhibitory effect of *Aster scaber* Thunb. extract on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **45**(3), 356-363 (2013).
31. Lim H. J., Seo J. E., Chang Y. H., Han B. K., Jeong J. K., Park S. B., Choi H. J., Whang J. N.: Anti-obesity effects of Jeju Hallabong Tangor (Citrus kiyomi × ponkan) Peel extracts in 3T3-L1 adipocytes. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.,* **43**(11), 1688-1694 (2014).
32. Fuleki, T., Francis F. J.: Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. *J. Food Sci.,* **33**, 72-77 (1968).
33. Lee J. W., Lee H. H., Rhim J. W., Jo J. S.: Determination of the conditions for anthocyanin extraction from purple-fleshed sweet potato. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.,* **29**, 790-795 (2000).
34. Rhee H. I.: Development of high anthocyanin corn cultivar. Rural Development Administraton Report, Jeonju, Korea, pp. 20-49 (2008).
35. Pascual-Teresa S., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo J. C.: LC-MS analysis of anthocyanins from purple corn cob. *J. Sci. Food Agric.,* **82**, 1003-1006 (2002).
36. Ahn H. C., Jhung R. N., Choe E. O.: *In vitro* Antioxidant Activity and α-Glucosidase and Pancreatic Lipase Inhibitory Activities of Several Korean *Sanchae*. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **47**(2), 164-169 (2015).
37. Kim Y. J., Kim B. H., Lee S. Y., Kim M. S., Park C. S., Rhee M. S., Lee K. H., Kim D. S.: Screening of medicinal plants for development of functional food ingredients with anti-obesity. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **49**, 221-226 (2006).
38. Choi J. H., Park Y. H., Lee I. S., Lee S. P., Yu M. H.: Antioxidant activity and inhibitory effect of *Aster scaber* Thunb. extract on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **45**(3), 356-363 (2013).
39. Cornelius P, MacDougald O. A., Lane M. D., Regulation of adipocyte development. *Annu. Rev. Nutr.,* **14**, 99-129 (1994).
40. Rosen E. D., Spiegelman B. M.: Molecular regulation of adipogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Bi.*, **16**, 145-171 (2000).
41. Wang N. D., Finegold M. J., Bradley A., Ou C. N., Abdelsayed S. V., Wilde M. D., Taylor L. R., Wilson D. R., Dar-

lington G. J.: Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science,* **269**, 1108-1112 (1995).

42. Lee C. W., Park Y. I., Kim S. H., Lim H. K., Chung M. J.: Antioxidant and anti-Adipogenic activities of bread containing corn silk, Job's tears, *Lentinus edodes*, and apple peel in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.,* **45**(5), 651-663 (2016).
43. Morrison R. F., Farmer S. R.: Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differntiation. *J. Nutr.* **130**, 3116S-3121S (2000).