한국식생활문화학회지 33(4): 337-344, 2018
J. Korean Soc. Food Cult. 33(4): 337-344, 2018
본 논문의 저작권은 한국식생활문화학회에 있음.
Copyright © The Korean Society of Food Culture

ISSN 1225-7060(Print)
ISSN 2288-7148(Online)
https://doi.org/10.7318/KJFC/2018.33.4.337

발아현미가 LPS로 유도된 지방세포의 염증반응에 미치는 영향

박 미 영*
순천향대학교 교육대학원 영양교육전공

Effect of Germinated Brown Rice on LPS-Induced Inflammation in Adipocytes

Mi-Young Park*
Department of Food & Nutrition Education, Graduate School of Education, Soonchunhyang University

Abstract

Germinated brown rice (GBR, *Orysa sartiva* L.) has been reported to have anti-obesity and anti-inflammatory effects. However, the mechanisms underlying these effects in adipocytes are not fully understood. Therefore, this study was conducted to explore the anti-inflammatory mechanisms of GBR on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes were pretreated with GBR extracts (0-20 mg/mL) 1 h before LPS stimulation. The mRNA expression of adipokines and Toll-like receptor 4 (TLR4) were measured by RT-PCR. The protein expressions of TLR4-related molecules were detected by western blotting and nuclear factor-κB (NF-κB) activation was measured. Our results showed that GBR extract dose-dependently inhibited mRNA expression of LPS-induced tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6), and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). GBR extract was found to inhibit LPS-induced mRNA expression of TLR4 and protein expression of both myeloid differentiation factor 88 (MyD88) and TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6). Furthermore, GBR extract significantly inhibited extracellular receptor-activated kinase (ERK) phosphorylation and NF-κB activation. These results suggest that GBR extract has the anti-inflammatory effects on LPS-induced inflammation via inhibition of TLR4 signaling, includingthe ERK and NF-κB signaling pathways, in adipocytes.

Key Words: *Orysa sartiva* L., Inflammation, Germinated brown rice, Toll-like receptor 4

I. 서 론

지방세포는 기아상태일 때 에너지를 공급함으로써 체내 에너지 항상성 유지에 있어서 매우 중요한 역할을 수행한다. 그러나 과잉영양과 운동부족으로 인해 과량의 지방조직이 체내 축적되면 다양한 대사성 질환이 발병될 수 있다. 수많은 연구결과에 의하면 비만일 경우 체내 지방조직에서 tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6) 등의 염증성 사이토카인의 분비가 증가되어 낮은 수준의 만성 염증반응이 지속적으로 일어나게되고 이는 인슐린 저항성과 고인슐린혈증을 야기하며 이는 결국 대사성질환의 발병과 연관된다고 한다(Paniagua 2016; Appari et al. 2018; Rada et al. 2018). Toll-like receptors (TLRs)는 대표적인 패턴 인식 수용체(pattern recognition receptors)로서 지방세포의 염증반응에 있어서 중요한 역할을 수행한다. 특히 TLR4는 지방조직에서 일어나는 염증반응과 인슐린 저항성과 관련이 매우 깊다(Ding et al. 2012). TLR4는 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 자극되며, 지방세포가 LPS의 자극을 받으면 지방분해, 인슐린 저항성, 케모카인인 monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)의 분비를 증가시켜 지방조직으로 대식세포를 끌어들여 염증반응을 촉진시킨다(Kopp et al. 2009). 선행연구에서 TLR4 결핍 마우스에게 고지방식이를 먹인 결과 염증반응과 인슐린저항성이 야기되지 않는 것을 확인한 바 있다(Shi et al. 2006; Poggi et al. 2007; Tsukumo et al. 2007).

다수의 연구에 의하면 전곡류 섭취가 증가할수록 만성질환의 예방효과가증가하고 이는 전곡류에 함유된 식이섬유를 비롯한 필수 영양소 및 다양한 생리활성물질에 기인한다고 보고되고 있다(Mellen et al. 2007; Okarter & Liu 2010). 현미(*Orysa sartiva* L.)는 우리나라 식생활에서 중요한 곡류 식이섬유의 급원으로 백미에 비해 두 배의 식이섬유를 함유하고 있고 양질의 식물성 단백질 및 그 외 다양한 미량 영양소를 함유하고 있다(Song *et al*. 1988). 현미는 발아과정을 통해 gamma amino-butyric acid (GABA), γ-oryzanol,

*Corresponding author: Mi-Young Park, Department of Food & Nutrition Education, Graduate School of Education, Soonchunhyang University, Asan, Chungnam 336-745, Korea Tel: +82-41-530-4752 Fax: +82-41-530-1490 E-mail: pmy1222@gmail.com

tocols, policosanols, stigmasterol 등의 다양한 생리활성 물질이 증가하게 되고(Cho & Lim 2016), 이 때문에 항고지혈증(Shen et al. 2016), 뇌보호능(Chompoopong et al. 2016), 간보호능(Wunjuntuk et al. 2016), 혈당개선능(Bui et al. 2014), 항비만능(Lim et al. 2016) 등의 여러가지 생리적 기능이 있는 것으로 보고되고 있다. 그 중 항비만능과 관련된 연구로는 발아 현미(geminated brown rice, GBR)의 다양한 용매 추출물들이 3T3-L1의 지방세포로의 분화 과정을 억제한다는 연구(Lim et al. 2014), 고지방식이로 비만이 유도된 쥐의 체중증가를 억제하였다는 연구(Lim et al. 2016), 고지방식이로 비만이 유도된 생쥐의 지방형성 유전자(lipogenic gene)의 발현을 억제하였다는 연구(Ho et al. 2012) 등이 보고된 바 있다. 현재 이의 생리적 기능에 대해 활발히 연구가 진행되고 있지만, 대부분 비만 현상 완화 중심의 연구이고 이의 항염증능에 관한 분자생물학적 기전을 규명한 연구는 부족한 실정이다. 이에 본 연구에서는 지방세포에서 일어나는 염증반응을 GBR 에탄올 추출물이 예방하는지 여부를 검증하고자 하였다. 이를 위해 지방세포에 GBR 에탄올 추출물을 처리한 후 LPS로 염증반응을 유도하였으며, 선처리한 GBR 에탄올 추출물이 염증반응을 억제하는지 여부와 TLR4와 관련된 분자학적 지표를 측정하였다.

II. 연구 방법

1. 실험재료 및 시약

본 실험에 사용한 현미는 둔포농협에서 구입하여 사용하였으며, 3T3-L1 마우스 지방전구세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받았다. 세포배양에 사용한 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), fetal bovine calf serum (BCS), phosphate buffered saline (PBS), penicillin-streptomycin은 Gibco (BRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, Trizol 시약은 Invitrogen (CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Real time PCR에 사용한 SYBR Green^{TM} kit (Quantitect^{TM} SYBR Green PCR)는 Qiagen (CA, USA)에서 구입하였다. 이외의 모든 시약은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)의 제품을 구입하여 사용하였다.

2. 발아 현미 추출물

현미는 2015년 아산시 둔포농협에서 구입하였으며, Wu 등(2013)의 방법으로 현미를 발아시켰다. 일정량의 현미를 증류수로 두 번 세척한 후 투명한 플라스틱 용기에 현미의 2배의 증류수를 가한 후 50°C incubator에서 72시간 발아시켰다. 발아된 현미는 50°C에서 2시간 건조시킨 후 분쇄하였다. 분쇄한 GBR에 10배의 80% 에탄올을 넣고 3회 반복 추출하였으며, 2.42%의 추출수율을 나타냈다. 추출물을 rotary evaporator (EYELA N-1000, Rikakikai Co., LTD., Tokyo, Japan)를 사용하여 농축하였으며, 이를 동결건조시켜 분말상태의 시료를 제조하여 실험에 사용하였다.

3. 3T3-L1 세포배양 및 분화유도

3T3-L1 세포는 10% BCS와 100 unit/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 이틀에 한 번씩 신선한 배지를 보충하면서 세포성장이 최대에 도달하였을 때 분화배지(differential medium, DM)로 교체하여 지방세포로의 분화를 유도하였다. 분화배지는 DMEM에 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 2 μM dexamethasone (DEX), 1.7 μM insulin을 첨가하여 만들었다. 일주일 후 분화가 완료된 3T3-L1 세포에 5, 10, 20 mg/mL 농도의 GBR 추출물을 1시간 처리한 후 LPS (100 ng/mL)를 30분간 처리하였다. GBR 추출물은 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 실험에 사용하였다.

4. 세포독성

본 연구에서 사용한 GBR 추출물의 세포독성을 MTT 방법으로 평가하였다. 3T3-L1 세포를 1×10^5 cells/well의 농도로 6-well plate에 분주하여 지방세포로 분화시켰다. 분화된 3T3-L1 세포에 GBR 추출물을 1시간 처리한 후 LPS(100 ng/mL)를 30분간 처리하였다. 대조군은 0.1% DMSO를 처리한 군으로 하였다. 실험 종료 후 배지를 제거하고 5 mg/mL의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 용액을 분주하고 4시간 동안 반응시킨 후 배지를 제거하였다. 각 well에 DMSO를 분주하여 생성된 formazan 결정을 용해시킨 후, ELISA reader(Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. Real time PCR 분석

다양한 농도의 GBR 추출물과 LPS로 처리된 3T3-L1 세포를 PBS (pH 7.4)로 두 번 세척한 후, Trizol 시약(Invitrogen, CA, USA)을 이용하여 세포의 total RNA를 추출하였다. Real-time quantitative PCR은 SYBR Green^{TM} kit (Quantitect^{TM} SYBR Green PCR, Qiagen)를 이용하여 수행하였으며, 유전자의 상대적인 발현정도는 CT 방법을 이용하여 계산하였다(Livak and Schmittgen, 2001). 본 연구에서 사용한 primer 종류 및 서열정보는 <Table 1>에 제시하였다.

6. Western 분석

3T3-L1 세포를 PBS (pH 7.4)로 두 번 세척한 후, RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Na-deoxycholate, and 0.1% SDS)에 넣고 4°C에서 10분간 용해시켰다. 용해시킨 세포를 14,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 단백질을 정

<Table 1> Gene-specific primers used for real-time polymerase chain reaction

Gene	Direction	Sequence
TNF-α[1)]	Forward	5'-AACATCCAACCTTCCCAAACG-3
	Reverse	5'-CTCTTAACCCCCGAATCCCAG-3'
IL-6[2)]	Forward	5'-TCACCTCTTCAGAACGAATTGACA-3'
	Reverse	5'-CCTGCRGTTCACAGTTGCC-3'
MCP-1[3)]	Forward	5'-ATTGGGATCTTGCTGGT-3'
	Reverse	5'-CCTGCTGTTCACAGTTGCC-3'
β-Actin	Forward	5'-GAGCGCAAGTACTCTGTGTG-3'
	Reverse	5'-CGGACTCATCGTACTCCTG-3'

[1)]Tumor necrosis factor-
[2)]Interleukin-6
[3)]Monocyte chemoattractant protein-1

량하였다. 단백질 발현은 Myeloid differentiation factor 88 (MyD88, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA), TNF receptor-associated factor6 (TRAF6, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA), extracellular-regulated kinase (ERK, Cell Signaling, Beverly, MA, USA), pERK (Cell Signaling, Beverly, MA, USA), β-actin (Cell Signaling, Beverly, MA, USA) 항체들을 이용하여 확인하였다. 단백질 50 μg을 취하여 Laemmli sample buffer로 처치, 100ºC에서 5분간 가열하여 변성시킨 후, 10% acrylamide denaturing SDS polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동하고 nitrocellulose membrane에 전이시켰다. Membrane을 상온에서 1시간 동안 TTBS (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.1% tween20, 5% nonfat milk) 용액에 넣고 blocking 시킨 후, 각 단백질에 대한 1차 항체를 4ºC에서 하룻밤 동안 반응시켰다. Membrane 세척 후, horseradish peroxydase (HRP)가 결합된 anti-mouse IgG를 1:2,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시켰으며, 결과는 image reader (LAS3000, Fujifilm, Tokyo, Japan)로 분석하였다.

7. NF-κB 활성 측정

3T3-L1 세포의 핵분획을 Nuclear Extract kit (Active Motif, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 추출한 후 PathScan Total NF-κB p65 assay kit (Cell Signaling Technology, MA, USA)를 이용하여 nuclear factor-κB (NF-κB) 활성을 측정하였다.

8. 통계처리

실험결과는 평균값±표준편차(mean±standard deviation)로 표시하였다. SAS 9.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA)를 이용한 one-way analysis of variance (ANOVA)로 실험군 간의 통계적 분석을 시행하였으며 Duncan's multiple range tests 사후검정을 실시하여 95% 수준에서 유의성을 검증하였다.

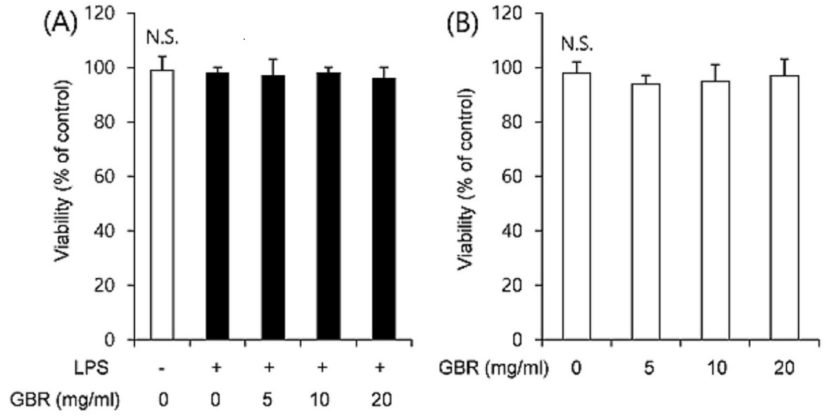
III. 결과 및 고찰

1. 3T3-L1 세포에 미치는 GBR 추출물의 세포독성

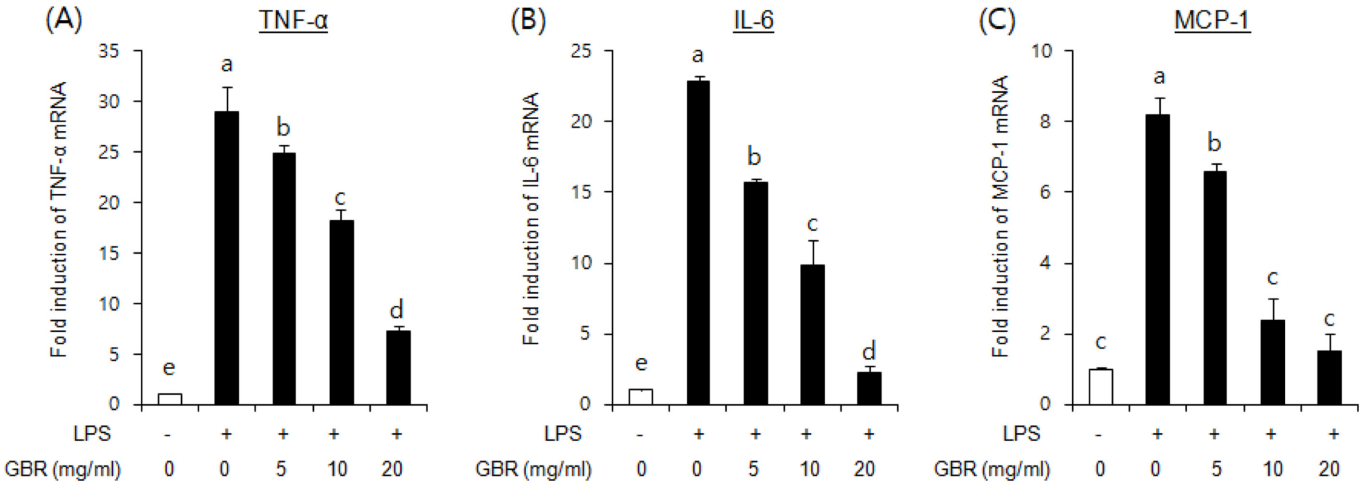
GBR 추출물이 지방세포로 분화된 3T3-L1 세포의 생존율에 영향을 미치는지 여부를 MTT 방법을 이용하여 측정하였다. 그 결과, GBR 추출물을 5~20 mg/mL 농도로 처리하였을 때 LPS를 처리한 세포와 처리하지 않은 세포의 생존율에 영향을 미치지 않았으며<Figure 1A, B>, 이에 그 이후의 실험을 진행하였다.

2. 염증성 사이토카인 유전자 발현에 미치는 영향

GBR 추출물을 선처리한 후 LPS로 염증반응을 유도시킨 3T3-L1 세포에서 염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-6, MCP-1의 유전자 발현을 측정하였다. 그 결과 모든 사이토카인의



<Figure 1> Effects of GBR on viability of differentiated 3T3-L1 cells. Differentiated 3T3-L1 cells were pretreated with various concentrations of GBR for 1 h and then stimulated with or without LPS (100 ng/mL) for 30 min. After incubation, cell viability was assessed using the MTT method. Values are expressed as mean±SD (n=4).

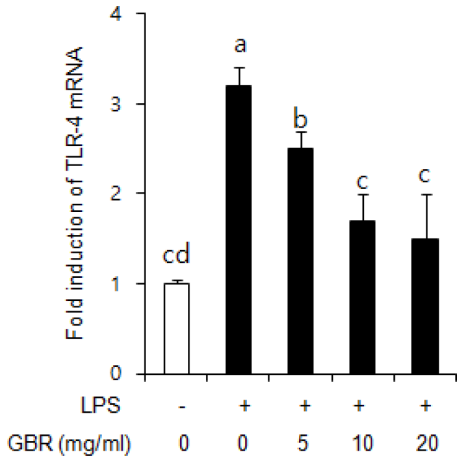


<Figure 2> Effects of GBR on LPS-induced TNF-α, IL-6, and MCP-1 mRNA levels in 3T3-L1 cells. Differentiated 3T3-L1 cells were pretreated with various concentrations of GBR for 1 h and then stimulated with or without LPS (100 ng/mL) for 30 min. After incubation, LPS-induced TNF-α, IL-6, and MCP-1 mRNA levels were determined. Values are expressed as mean±SD (n=4). [a,b,c,d,e]Means with the different letters at each sample are significantly different from each other ($p<0.05$) using Duncan's multiple-range test.

유전자가 농도의존적으로 억제되는 것을 확인하였다<Figure 2A-C> ($p<0.05$). 지방세포는 대식세포와 동일하게 세포막의 TLR 수용체를 통해 LPS를 인지할 수 있으며(Lin et al. 2000), 이러한 특징으로 인해 비만인 경우 체내 그람 음성 세균의 LPS를 잘 감지하여 염증 반응이 더욱 지속될 수 있다(Cani et al. 2008). 따라서 지방세포의 이러한 특징은 비만에 있어서 특히 중요하다. 본 연구결과 LPS만 처리한 군의 경우 TNF-α, IL-6 및 MCP-1의 mRNA발현이 무처리군에 비해 각각 2,894, 2,283 및 820% 증가하였으며, 이는 LPS 처리에 의해 지방세포에서의 염증반응이 확실히 유도되었음을 의미한다. GBR 추출물 처리군의 경우 LPS로 유도되는 염증반응이 농도의존적으로 억제되었는데, 특히 20 mg/mL 농도에서는 IL-6와 MCP-1의 mRNA 발현이 LPS 무처리군과 비슷한 수준으로 억제됨을 확인하였다. 본 연구결과는 GBR의 생리활성 물질인 γ-amino butyric acid (GABA)와 γ-oryzanol을 난소절제 쥐에게 섭취시킨 결과 혈청 IL-6 수준이 감소하였다는 결과와 살짝 익힌 GBR가 H_2O_2와 interleukin-1β (IL-1β)로 자극된 Caco-2세포의 MCP-1의 분비를 억제했다는 선행연구결과와 유사하다(Muhammad et al. 2013; Tuntipopipat et al. 2015). 따라서 GBR 추출물이 지방세포에 대한 LPS의 자극 경로를 효과적으로 차단함으로써 염증 반응을 억제하고 있는 것으로 확인되었다.

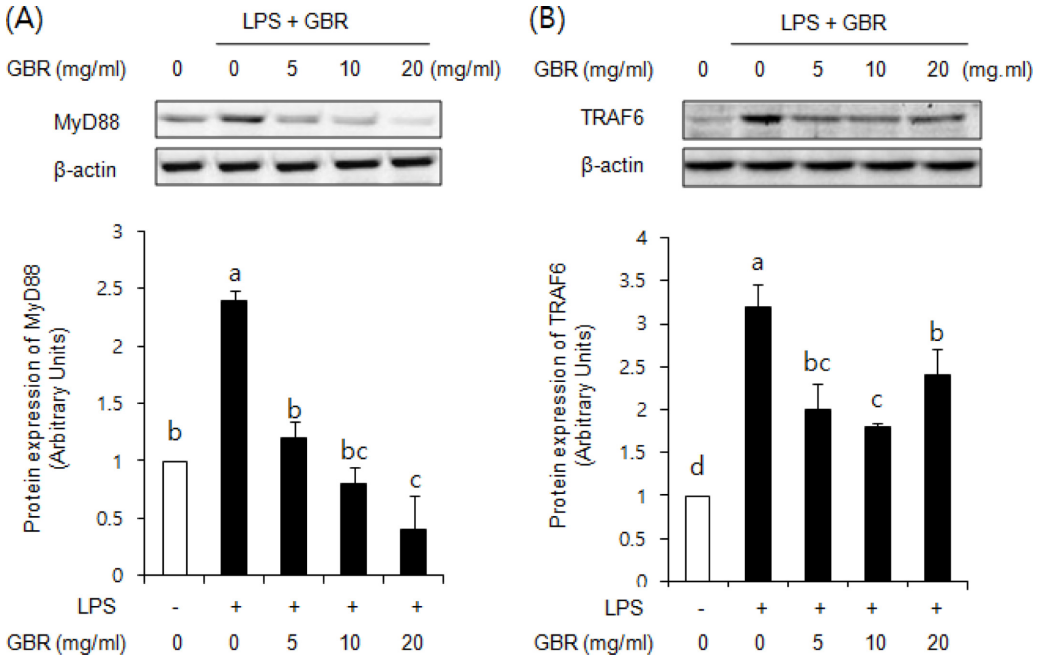
3. TLR4 유전자 발현에 미치는 영향

GBR 추출물의 처리가 TLR4 유전자 발현조절과 관련이 있는지를 조사하기 위해 TLR4의 mRNA 발현을 측정하였다. 측정 결과, LPS 단독 처리군의 경우 미처리군보다 TLR4의 mRNA 발현이 320% 증가하였으며, GBR 처리군의 경우 이의 발현을 억제하고 있음을 확인하였다<Figure 3> ($p<0.05$).



<Figure 3> Effects of GBR on LPS-induced TLR-4 mRNA level in 3T3-L1 cells. Differentiated 3T3-L1 cells were pretreated with various concentrations of GBR for 1 h and then stimulated with or without LPS (100 ng/mL) for 30 min. After incubation, LPS-induced TLR-4 mRNA level was determined. Values are expressed as mean±SD (n=4). [a,b,c,d]Means with the different letters at each sample are significantly different from each other ($p<0.05$) using Duncan's multiple-range test.

LPS는 TLR4에 결합하는 대표적인 ligand 중 하나로 TLR의 leucine-rich repeats (LRR) domain과 결합하여 신호를 전달하고 이러한 LPS 자극에 의해 염증성 사이토카인의 분비가 증가하면 인슐린 저항성을 비롯한 전신성 염증 반응을 야기한다(Akira 2003; Prajapati et al. 2014). 본 연구결과 LPS 처리에 의해 TLR4가 효과적으로 과발현되었으며, GBR추출물 처리에 의해 TLR4 mRNA 발현량이 억제되는 현상은 GBR 추출물 처리가 염증성 사이토카인 mRNA 발현에 대한



<Figure 4> Effects of GBR on LPS-induced expression of MyD88 and TRAF6 in 3T3-L1 cells. Differentiated 3T3-L1 cells were pretreated with various concentrations of GBR for 1 h and then stimulated with or without LPS (100 ng/mL) for 30 min. After incubation, cell lysates were analyzed for MyD88 and TRAF6 immunoblotting. Values are expressed as mean±SD (n=4). [a,b,c,d]Means with the different letters at each sample are significantly different from each other ($p<0.05$) using Duncan's multiple-range test.

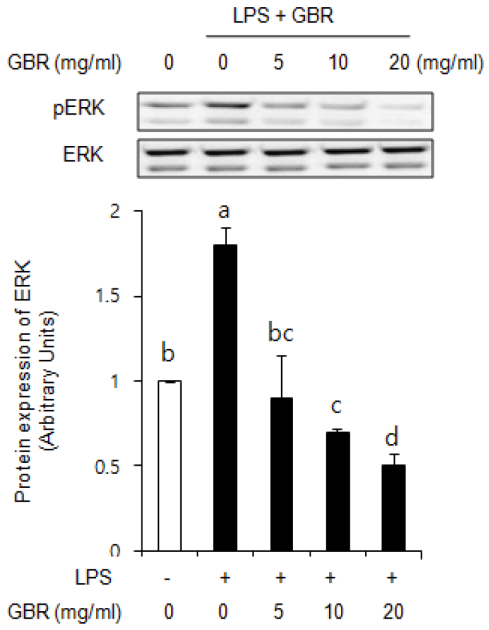
억제효과를 보이는 것과 일치하였다. GBR 추출물의 TLR4 발현에 미치는 영향에 관한 연구는 거의 이루어지고 있지 않지만, GBR의 생리활성 물질 중 하나인 GABA가 함유된 적색고구마 요거트를 본태성 고혈압 쥐에게 먹인 결과 TLR4 신호전달 체계가 억제되었다는 연구결과가 발표된 바 있다(Lin et al. 2013).

4. MyD88 및 TRAF6 단백질 발현에 미치는 영향

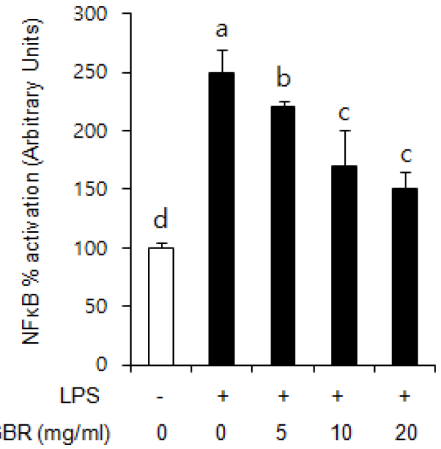
LPS와 결합한 TLR4는 Toll/IL-1 receptor (TIR) domain의 MyD88과 TRAF6와 같은 신호전달체를 통해 LPS에 의해 야기된 신호를 세포 내로 전달한다(Akira et al. 2006). GBR 추출물이 이들 신호를 제어함으로써 지방세포의 염증반응 활성화를 억제하는지 살펴보기 위하여 MyD88과 TRAF6의 단백질 발현정도를 western blot으로 분석하였다. 그 결과 LPS로 자극받은 3T3-L1 세포에서 MyD88과 TRAF6가 모두 과발현되어 이들이 활성화되었음을 확인하였다<Figure 4> ($p<0.05$). 반면, GBR 추출물을 처리한 군의 경우 이들의 과발현을 농도의존적으로 억제하였으며, 특히 MyD88 단백질 발현량이 TRAF6 보다 효과적으로 제어됨을 알 수 있었다<Figure 4> ($p<0.05$). 이러한 결과는 GBR 추출물이 TLR4의 MyD88 의존적인 신호전달 체계를 직접 억제함을 의미한다.

5. ERK의 인산화에 미치는 영향

다음으로 GBR 추출물에 의한 MyD88과 TRAF6의 단백



<Figure 5> Effects of GBR on LPS-induced expression of phospho-ERK in 3T3-L1 cells. Differentiated 3T3-L1 cells were pretreated with various concentrations of GBR for 1 h and then stimulated with or without LPS (100 ng/mL) for 30 min. After incubation, cell lysates were analyzed for phospho-ERK and ERK immunoblotting. Values are expressed as mean±SD (n=4). [a,b,c,d]Means with the different letters at each sample are significantly different from each other ($p<0.05$) using Duncan's multiple-range test.



<Figure 6> Effects of GBR on LPS-induced activation of NF-κB in 3T3-L1 cells. Differentiated 3T3-L1 cells were pre-treated with various concentrations of GBR for 1 h and then stimulated with or without LPS (100 ng/mL) for 30 min. After incubation, nuclear extracts were analyzed for NF-κB activation. Values are expressed as mean±SD (n=4). [a,b,c,d]Means with the different letters at each sample are significantly different from each other ($p<0.05$) using Duncan's multiple-range test.

질 발현억제가 mitogen-activated protein kinases (MAPK)에도 영향을 미치는지 여부를 알아보고자 하였다. MAPK는 세포 외부의 신호를 세포 내 핵으로 전달하는 중요한 역할을 하는 것으로 가장 잘 알려진 신호전달체로서 ERK, c-Jun N-terminal kinase (JNK) 및 p38이 가장 잘 알려져 있다(Johnson & Lapadat 2002). 그 중 ERK는 LPS를 처리한 3T3-L1 세포에서 JNK와 p38 보다 더 활성화되어 염증성 사이토카인의 발생에 있어서 주도적인 역할을 하는 것으로 보고되었다(Kopp et al. 2010). 이에 본 연구에서는 GBR 추출물이 MyD88과 TRAF6 발현 억제 양상과 비슷하게 ERK의 인산화도 억제하는지 여부를 측정하였다. 그 결과, 3T3-L1 세포에서 LPS에 의해 ERK가 인산화되었음을 알 수 있었고 반면, GBR 추출물 처리군에서는 ERK의 인산화 수준이 LPS 처리군에 비해 농도의존적으로 감소함을 보였다 <Figure 5> ($p<0.05$). GBR가 MAPK를 조절한다는 연구는 발표된 바 없으나, GBR 추출물의 생리활성인자 중 하나인 GABA가 MAPK 신호전달을 감소시킴으로써 염증반응을 저감화한다는 연구가 발표된 바가 있다(Bhat et al. 2010).

6. NF-κB 활성화에 미치는 영향

NF-κB는 염증 매개물질의 유전자 발현에 중요한 역할을 하는 전사인자이다. GBR 추출물이 NF-κB의 활성화를 제어하는지 여부를 알아보고자 이의 활성도를 측정하였다. 연구결과, LPS 자극에 의해 NF-κB가 250% 증가하였으며, GBR 추출물은 농도의존적으로 이의 증가를 제어하였다 <Figure 6> ($p<0.05$). 본 연구결과는 현미 외피 추출물이 LPS로 유도한 대식세포의 NF-κB 활성화를 억제했다는(Ha et al. 2016) 선행연구 결과와 유사하다. 이러한 결과는 GBR 추출물이 NF-κB 전사인자의 활성화를 제어함으로써 염증성 사이토카인 유전자 발현을 저해했음을 의미한다.

IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 지방세포에서 일어나는 염증반응을 발아현미의 에탄올 추출물이 억제하는지 여부를 검증하고자 하였다. 이를 위해 분화된 3T3-L1의 지방세포에 GBR 추출물을 5-20 mg/mL의 농도로 1시간 선처리한 후 LPS (100 ng/mL)를 처리하여 지방세포의 염증반응을 유도하였다. GBR 추출물이 LPS 처리로 유도된 염증성 사이토카인의 유전자 발현을 억제하는지 여부와 TLR4 신호전달체계와 관련된 분자학적 지표를 측정분석하였다.

1. 본 시험에 사용한 GBR 추출물의 세포독성 여부를 알아보기 위해 세포의 생존율을 MTT 방법으로 측정한 결과 LPS를 처리한 세포와 처리하지 않은 세포의 생존율에 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

2. 지방세포에서 분비되는 대표적인 염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-6, 및 MCP-1의 유전자 발현 변화를 측정한 결과, 모든 처리 농도에서 LPS 처리로 증가된 염증성 사이토카인의 유전자 발현을 유의적으로 억제하였으며, 그 효과는 농도의존적인 경향을 보였다($p<0.05$). 특히, 고농도(20 mg/mL) 처리 시 IL-6와 MCP-1의 mRNA 발현량이 LPS 무처리군과 비슷한 수준으로 억제됨을 확인하였다.

3. GBR 추출물의 사이토카인 유전자 발현 억제능이 TLR4 유전자 발현 조절과 관련이 있는지를 확인하기 위해 TLR4 유전자발현을 측정하였다. LPS 자극으로 증가된 TLR4의 mRNA 발현이 GBR 추출물 처리에 의해 농도의존적으로 감소하였다($p<0.05$).

4. GBR 추출물이 TLR 하위 신호전달체인 MyD88과 TRAF6 단백질 발현을 직접 제어하는지 여부를 확인하고자 이들의 단백질 발현을 측정하였다. 그 결과 모든 처리 농도에서 두 단백질 발현이 모두 효과적으로 감소되었다($p<0.05$). 특히 MyD88 단백질 발현의 경우 농도 의존적으로 감소되었으며, TRAF6 보다 더 효과적으로 단백질 발현이 억제됨을 확인하였다.

5. GBR 추출물이 MAPK 및 NF-κB 전사인자의 활성화를 억제하는지 여부를 확인하고자 ERK 단백질의 인산화와 NF-κB의 활성화를 측정하였다. 그 결과, LPS로 유도된 ERK 단백질의 인산화 및 NF-κB의 활성화를 GBR 에탄올 추출물이 농도의존적으로 억제함을 확인하였다($p<0.05$).

이상의 연구 결과를 종합하면 GBR 추출물을 선처리함으로써 지방세포에서 LPS로 유도된 염증성 사이토카인 유전자 발현이 효과적으로 억제되었으며, 이는 TLR4/NF-κB 신호전달 경로 차단에 기인하는 것으로 사료된다. 향후 GBR 추출

물 내의 다양한 생리활성 물질들에 대한 각각의 염증조절 작용기전 연구가 이루어져야 하며, 이는 GBR의 항염증능 연구의 기초자료로 사용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 순천향대학교 학술연구비 지원으로 수행되었습니다.

Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

References

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. Cell, 124(4):783-801

Akira S. 2003. Mammalian Toll-like receptors. Curr. Opin. Immunol., 15(1):5-11

Appari M, Channon KM, McNeill E. 2018. Metabolic regulation of adipose tissue macrophage function in obesity and diabetes. Antioxid Redox Signal., 29(3):297-312

Bhat R, Axtell R, Mitra A, Miranda M, Lock C, Tsien RW, Steinman L. 2010. Inhibitory role for GABA in autoimmune inflammation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107(6):2580-2585

Bui TN, Le TH, Nguyen do H, Tran QB, Nguyen TL, Le DT, Nguyen do VA, Vu AL, Aoto H, Okuhara Y, Ito Y, Yamamoto S, Kise M. 2014. Pre-germinated brown rice reduced both blood glucose concentration and body weight in Vietnamese women with impaired glucose tolerance. J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo), 60(3):183-187

Cani PD, Delzenne NM, Amar J, Burcelin R. 2008. Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding. Pathol. Biol. (Paris), 56(5):305-309

Cho DH, Lim ST. 2016. Germinated brown rice and its bio-functional compounds. Food Chem., 196:259-271

Chompoopong S, Jarungjitaree S, Punbanlaem T, Rungruang T, Chongthammakun S, Kettawan A, Taechowisan T. 2016. Neuroprotective Effects of Germinated Brown Rice in Rotenone-Induced Parkinson's-Like Disease Rats. Neuromolecular Med., 18(3):334-346

Ding Y, Subramanian S, Montes VN, Goodspeed L, Wang S, Han C, Teresa AS 3rd, Kim J, O'Brien KD, Chait A. 2012. Toll-like receptor 4 deficiency decreases atherosclerosis but does not protect against inflammation in obese low-density lipoprotein receptor-deficient mice. Arterioscler Thromb. Vasc. Biol., 32(7):1596-1604

Ha SK, Sung J, Choi I, Kim Y. 2016. Oryza sativa (Rice) Hull Extract Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response in RAW264.7 Macrophages by suppressing extracellular signal-regulated kinase, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor-κB activation. Pharmacogn. Mag., 12(48):295-301

Ho JN, Son ME, Lim WC, Lim ST, Cho HY. 2012. Anti-obesity effects of germinated brown rice extract through down-regulation of lipogenic genes in high fat diet-induced obese mice. Biosci. Biotechnol. Biochem., 76(6):1068-1074

Johnson GL, Lapadat R. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. Science. 298(5600):1911-1912

Kopp A, Buechler C, Bala M, Neumeier M, Schölmerich J, Schäffler A. 2010. Toll-like receptor ligands cause proinflammatory and prodiabetic activation of adipocytes via phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase but not interferon regulatory factor-3. Endocrinology, 151(3):1097-1108

Kopp A, Buechler C, Neumeier M, Weigert J, Aslanidis C, Schölmerich J, Schäffler A. 2009. Innate immunity and adipocyte function: ligand-specific activation of multiple Toll-like receptors modulates cytokine, adipokine, and chemokine secretion in adipocytes. Obesity (Silver Spring), 17(4):648-656

Lim SM, Goh YM, Kuan WB, Loh SP. 2014. Effect of germinated brown rice extracts on pancreatic lipase, adipogenesis and lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. Lipids Health Dis, 13:169

Lim SM, Goh YM, Mohtarrudin N, Loh SP. 2016. Germinated brown rice ameliorates obesity in high-fat diet induced obese rats. BMC Complement. Altern. Med., 16:140

Lin PP, Hsieh YM, Kuo WW, Lin YM, Yeh YL, Lin CC, Tsai FJ, Tsai CH, Tsai CC, Huang CY. 2013. Suppression of TLR-4-related inflammatory pathway and anti-fibrosis effects of probiotic-fermented purple sweet potato yogurt in hearts of spontaneously hypertensive rats. Chin. J. Physiol., 56(3):174-183

Lin Y, Lee H, Berg AH, Lisanti MP, Shapiro L, Scherer PE. 2000. The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. J. Biol. Chem. 275(32):24255-24263

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, 25(4):402-408

Mellen PB, Walsh TF, Herrington DM. 2008. Whole grain intake and cardiovascular disease: a meta-analysis. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis., 18(4):283-290

Muhammad SI, Maznah I, Mahmud R, Zuki AB, Imam MU.

2013. Upregulation of genes related to bone formation by γ-amino butyric acid and γ-oryzanol in germinated brown rice is via the activation of GABAB-receptors and reduction of serum IL-6 in rats. Clin. Interv. Aging, 8:1259-1271

Okarter N, Liu RH. 2010. Health benefits of whole grain phytochemicals. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 50(3):193-208

Paniagua JA. 2016. Nutrition, insulin resistance and dysfunctional adipose tissue determine the different components of metabolic syndrome. World J. Diabetes, 7(19):483-514

Poggi M, Bastelica D, Gual P, Iglesias MA, Gremeaux T, Knauf C, Peiretti F, Verdier M, Juhan-Vague I, Tanti JF, Burcelin R, Alessi MC. (2007). C3H/HeJmice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. Diabetologia, 50(6):1267-1276

Prajapati B, Jena PK, Rajput P, Purandhar K, Seshadri S. 2014. Understanding and modulating the Toll like Receptors (TLRs) and NOD like Receptors (NLRs) cross talk in type 2 diabetes. Curr. Diabetes Rev, 10(3):190-200

Rada I, Deldicque L, Francaux M, Zbinden-Foncea H. 2018. Toll like receptor expression induced by exercise in obesity and metabolic syndrome: A systematic review. Exerc Immunol Rev., 24:60-71

Shen KP, Hao CL, Yen HW, Chen CY, Chen JH, Chen FC, Lin HL. 2016. Pre-germinated brown rice prevented high fat diet induced hyperlipidemia through ameliorating lipid synthesis and metabolism in C57BL/6J mice. J. Clin. Biochem. Nutr., 59(1):39-44

Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. 2006. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. J. Clin. Invest., 116(11):3015-3025

Song BH, Kim DY, Kim SK, Kim YD, Choi SK. 1988. Distribution of protein, fat, and ash within the degermed brown rice kenel. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem., 31(2):1-6

Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, Araújo EP, Vassallo J, Curi R, Velloso LA, Saad MJ. 2007. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. Diabetes, 56(8):1986-1998

Tuntipopipat S, Muangnoi C, Thiyajai P, Srichamnong W, Charoenkiatkul S, Praengam K. 2015. A bioaccessible fraction of parboiled germinated brown rice exhibits a higher anti-inflammatory activity than that of brown rice. Food Funct., 6(5):1480-1488

Wu F, Chen H, Yang N, Wang J, Duan X, Jin Z, Xu X. 2013. Effect on germination time on physicochemical properties of brown rice flour and starch from different rice cultivars. J. Cereal Sci., 58(2):263-271

Wunjuntuk K, Kettawan A, Charoenkiatkul S, Rungruang T. 2016. Parboiled germinated brown rice protects against CCl4-induced oxidative stress and liver injury in rats. J. Med. Food, 19(1):15-23

Received July 13, 2018; revised August 16, 2018; accepted August 17, 2018