



α -Lipoic acid의 희석용매, 처리농도, 처리시간에 따른 3T3-L1 지방세포 성장에 미치는 영향

서은영*
장안대학교 식품영양과

The Effects of α -Lipoic Acid in Adilution Solvents, Dose- and Time-dependent Manner on Cell Growth Blocking in 3T3-L1

Eunyoung Seo*

Department of Food and Nutrition, Jangan University

Abstract

Purpose: This study examined the effects of α -lipoic acid in diluted solvents on cell growth in 3T3-L1 cells according to the treated concentration and times. **Methods:** Adipocyte 3T3-L1 cell were cultured. Confluent cells underwent starvation with SFM for 1 day and then were cultured in a medium containing various concentrations 0, 100, 200, and 400 μ mol/L of α -lipoic acid. The cell viability was measured using the EZ Cyttox assay kit. In addition, the effect of α -lipoic acid of diluted solvents on the cell growth in 3T3-L1 cells was examined according to the treated concentration and times. **Results:** The α -lipoic acid diluted ethanol inhibited cell proliferation in a dose and time dependent manner. The α -lipoic acid diluted ethanol induced adipocyte 3T3-L1 cells proliferation with an adipocyte inducer. In addition, α -lipoic acid inhibited adipocyte 3T3-L1 growth in a dose and time dependent manner ($p < 0.05$). **Conclusion:** This study showed that a treatment with α -lipoic acid diluted ethanol inhibits cell growth of, adipocyte 3T3-L1 cells induced with an adipocyte inducer, (200 μ mol/L of α -lipoic acid) treated for 48 hr.

Key Words: α -Lipoic acid, cell growth, 3T3-L1, treatment condition

1. 서 론

α -Lipoic acid(1,2-dithiolane-3-pentanoic acid)는 두 개의 황 원자를 함유하는(Snell et al. 1937) 물질로, 일부 육류의 간과 신장에 존재하며, 시금치, 토마토, 짙은양배추, 브로콜리, 감자 등의 식물에 미량 존재한다고 보고되고 있다(Gleiter et al. 1996; Teichert et al. 1998; Breithaupt-Grgler et al. 1999). α -Lipoic acid는 항산화 기능과 체내 합성량 부족으로 비타민 유사물질로 분류되고 있고(Reed 1957; Rosenberg et al. 1959), 체내 미토콘드리아에서 octanoic acid와 sulfur 물질로부터 일부 합성된다고 알려져 있다(Jordan et al. 1997; Wada et al. 1997). 또한, 피루브산이나 α -케토글루타르산과 탈수소효소복합체를 형성하여 아세틸전이효소 합성에도 관여한다. α -Lipoic acid의 대표적인 효과로는 체내 활성산소종(SOD)을 제거하여, 세포의 산화적 손상으로부터 재생을 돕는 항산화 작용에 대한 효과 연구가 가장 많이 보고되고

있으며(Maliska & Winiarska 2005), 그 외 당뇨병 환자의 상승된 혈당을 저하시키고, 간에서 글리코겐 합성, 인슐린, C-peptide를 개선시켜 탄수화물 대사에도 관여하는 것으로 보고되고 있다(Lee et al. 2005). 그 외 식욕을 억제하고, 에너지 소비를 증가시키는 작용을 하며(Kim et al. 2004), 체내 저장 지방량을 낮추고, 간에서 중성지방의 축적을 감소시키며(Yi et al. 2013), 지방 합성과 very low density lipoprotein (VLDL) 분비를 낮추는 등의 지질 대사에도 관여하는 것으로 알려져 있다(Saengsirisuwan et al. 2004).

비만은 한국인의 주요 사망원인인 암, 심혈관질환, 고혈압, 제2형 당뇨병 등의 만성퇴행성 질환의 위험성을 증가시키는 심각한 영양적인 문제이다(Kim et al. 2005). 특히, 2009년 35.6%였던 한국 성인 남성의 비만율은 매년 꾸준히 증가하여 2015년 기준 40% 이상으로 성인 남성의 10명 중 4명이 비만인 것으로 진단되고 있다. 생리학적 측면으로 비만은 체내 지방조직(adipose tissue)의 과잉 축적으로 정의할 수 있

*Corresponding author: Eunyoung Seo, Department of Food and Nutrition, Jangan University, Hwasung, Gyeonggi-do 445-756, Korea
Tel: +82-31-299-3664 Fax: +82-31-299-3609 E-mail: e.young719@jangan.ac.kr

으며, 지방 조직은 일부 세포로부터 분화되어 형성 된다 (Hirsch & Batchelor 1976). 비만 효과연구에는 영양소 섭취 비율의 조절이나 식품 성분을 이용한 연구가 많이 진행되고 있으며, 특히 식품의 기능성 성분인 파이토케미컬(phytochemicals)을 이용한 식욕 억제 기전에 관여하는 호르몬이나 조절단백질의 변화를 통한 차단, 활성화도 저하 효과 등을 통해 검증되고 있다. 임상 실험으로는 체지방량 감소나 비만과 관련된 생화학적 지표 변화로 효과를 보고하고 있다. 그러나 α -Lipoic acid의 기능적 효능의 임상 연구에서 처치 기준이 되어야 할 *in vitro* 실험의 진행은 매우 제한적이며, 특히 비만과 관련된 연구의 기초가 되어야 할 지방세포 내에서 α -Lipoic acid 처리 농도, 처리 시간, 그 성분의 희석 용매별 효과 차이는 따로 보고된 바 없었다. 이에, 본 연구에서는 비타민 유사물질인 α -lipoic acid를 다양한 용매로 희석하여 지방세포로 특화된 3T3-L1 세포에 지방분화유도물질을 처리하여 지방세포로 분화시킨 후 다양한 조건에서 세포 성장에 미치는 효과를 관찰해보고자 하였다.

II. 연구내용 및 방법

1. 실험재료 및 세포 배양

실험에 사용된 α -Lipoic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA)는 3차 증류수로 100 mM, ethyl alcohol (Sigma)로 500 mM, dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma)에 100 mM로 희석하여 stock을 만들어 냉동 보관하여 각 실험마다 배양액에 희석하여 사용하였다. 실험에 사용된 세포는 mouse fibroblast 3T3-L1 preadipocyte는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ incubator에서 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, WelGENE, Daegu, Korea), 10% bovine calf serum (BCS) (WelGENE), 100 µg/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (WelGENE)이 포함된 배양액에서 배양하였다(Green & Kehinde 1975). 세포가 70-80% 정도 confluent되면 phosphate buffered saline solution (PBS)로 2번 씻어내고 trypsin-EDTA (WelGENE)를 처리하여 세포를 모은 후 계대 배양하였고, 배양액은 1-2 일마다 교환하여 정상적인 세포 상태를 유지하였다(Lee et al. 2006).

2. 지방세포분화 유도

계대 배양한 세포는 지방세포로 분화를 유도하기 위해 3T3-L1세포에 10% fetal bovine serum (FBS, WelGENE), 10 µg/mL insulin (Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 µmol dexamethasone (Dex) (Sigma), 0.5 mM isobutylmethylxanthine (IBMX) (Sigma), 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin을 넣은 배양액으로 교체하여 지방세포분화를 유도하였다.

지방세포로의 분화 후에는 10% BCS, 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin을 넣은 DMEM 배양액으로 분화 상태를 유지하였다(Seo 2015). 세포 분화 후 α -lipoic acid (Sigma)는 배양액에 농도별, 시간별로 용매를 달리해 희석한 α -lipoic acid를 각각 처리하여 지방세포 성장에 미치는 효과를 관찰해보았다.

3. 세포 성장

α -Lipoic acid의 희석 용매, 첨가 농도, 처리 시간에 따른 세포 증식 효과를 알아보기 위해 96 well plate에 0.5×10⁴ cells/mL의 농도로 plating 하고, 48시간 후에 confluence 되면 BCS가 포함된 regular medium (RM)에 5 µg/mL transferrin, 5 ng/mL selenium, 1,000 units/mL penicillin, 1,000 µg/mL streptomycin, WelGENE)으로 배양액을 교환하였다(Kim et al. 2005). 실험에 사용된 처리 물질인 α -Lipoic acid는 3차 증류수, DMSO, ethanol 등 각각 다른 용매에 희석하여 stock (1 mg/mL)을 만들어 실험하였다. α -Lipoic acid는 화학적 성질상 소수성을 띄고 있어, 대표적인 유기용매인 DMSO, ethanol에는 입자 없이 완전히 용해되었다. 그러나, 친수성 용매인 3차 증류수에는 α -lipoic acid가 완전히 용해되지 않아, 용매를 water bath 37°C에서 3분간 데워 용해하였으며, 37°C, 24시간 동안 vortexing하여 α -lipoic acid의 입자가 완전히 용해된 것을 확인한 후 실험에 사용하였다. 각 용매별 α -lipoic acid는 동일한 조건으로 배양된 3T3-L1 세포에 0, 100, 200, 400 µmol/L로 처리하였으며, 0, 24, 48, 96시간마다 살아있는 세포를 염색하여 흡광도를 측정하였다. RM에 α -lipoic acid를 희석용매별, 처리농도별, 처리 시간별로 세포에 첨가하여 배양액을 교체하였다. 조건별 α -lipoic acid는 세포에 첨가한 후 24시간마다 같은 조건의 배양액으로 교체한 후 시간 경과에 따라 Cell viability 측정은 EZ-Cytox cell viability assay kit (Daeil Lab, Seoul, Korea)을 이용 하였다. EZ-Cytox solution을 처리한 후, 3시간 후 490 nm에서 spectrophotometer (Tecan, Austria GmbH, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다(Yeh et al. 1995). 모든 실험은 독립적으로 3번 이상 같은 조건에서 실험하였으며, 3번의 독립적인 결과를 통계 처리하여 관찰하였다.

실험 (1) α -lipoic acid 희석 용매: 3차 증류수, dimethyl sulphoxide (DMSO) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), ethanol (Sigma)에 각각 희석하여 처리하였다.

실험 (2) α -Lipoic acid의 처리 농도별: 세포는 serum starvation 후 SFM에 α -lipoic acid를 0, 2.5, 7.5, 10 µg/mL, 0, 5, 10, 20 µg/mL, 0, 25, 50, 100 µg/mL 농도로 처리하였다.

실험 (3) α -Lipoic acid의 처리 시간별: SFM에 α -lipoic acid를 0, 6, 12, 24시간, 0, 12, 24, 48시간, 0, 24, 48, 96 시간 동안 처리하였다.

4. 통계 처리

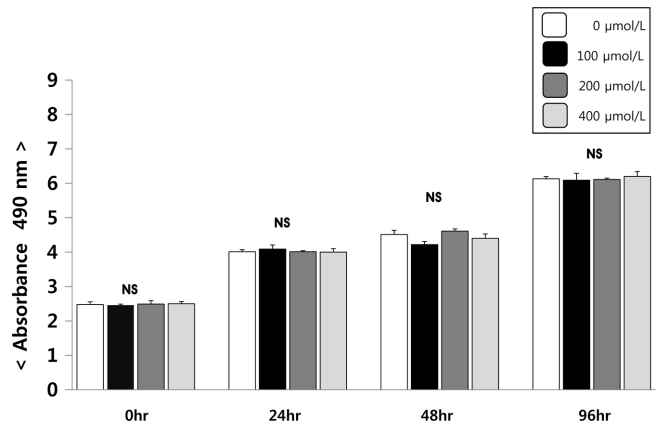
본 연구의 실험으로 얻어진 결과는 독립적으로 3번 이상 실시하였으며 얻어진 결과를 SAS 9.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA) 프로그램을 이용하여 통계처리 하였다. 여러 조건으로 진행한 실험의 결과는 대조군과 실험군의 평균값과 표준편차를 계산하여 사용하였고, 각 군 간의 차이는 one-way analysis of variance (ANOVA) 분석 후 $\alpha=0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하여 유의성을 검증하였다.

III. 결과 및 고찰

1. α -Lipoic acid의 희석 용매별 세포 증식

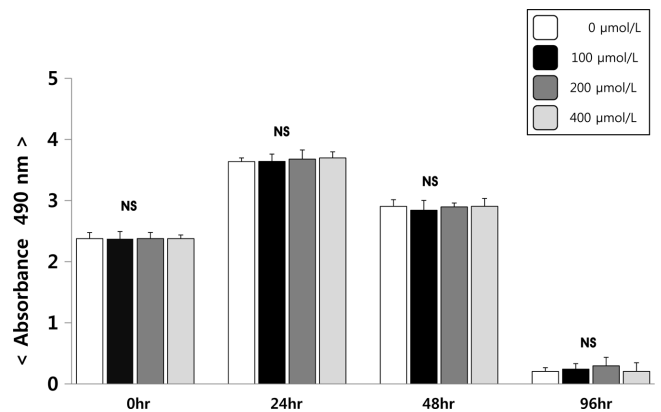
실험 결과, 3차 증류수로 희석한 α -lipoic acid를 농도별로 처리한 실험군에서는 대조군에 비교하여 세포 증식에는 아무런 영향을 미치지 않는 것이 관찰되었다<Figure 1> ($p<0.05$). α -Lipoic acid를 처리하지 않은 대조군에 비해 3차 증류수로 희석한 α -lipoic acid를 처리한 군에서도 시간에 따른 세포 성장은 관찰되었으나, 실험군간의 세포 성장은 전혀 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다.

DMSO 용매로 희석된 α -Lipoic acid를 처리한 군에서는 처리시간 24시간까지는 대조군과 실험군간의 성장의 차이는 나타내지 않았으나, 처리시간 48시간 후부터는 세포의 성장에 심각한 영향을 미쳐 생존하는 세포가 매우 적다고 판단되었다. 96시간 이후는 대조군과 모든 실험군에서 세포의 생존이 매우 미비한 것이 관찰되었다<Figure 2> ($p<0.05$). 대조군과 실험군 간의 유의적인 차이도 관찰되지 않았으며, 이러한 결과는 α -lipoic acid의 처리에 의한 차이가 아니라, 용매로 사용한 DMSO가 3T3-L1세포에 성장에 치명적인 손상을 입혀 세포가 사망하는 것으로 사료된다. 처리시간 96시간 후에는 이러한 현상이 더욱 심해졌으며, 실험 첫 단계에 24 well plate 각 well에 동일한 수로 plating 한 세포의 수보다 더 적은 수의 세포만 생존되는 것이 관찰되었다. 그러므로 이러한 결과는 실험에서 사용된 3T3-L1 세포의 생육조건에는 유기용매인 DMSO가 적당하지 않으며, 이는 결과적으로 DMSO의 농도가 높을수록 세포의 성장에는 치명적인 결과를 준다는 것이 관찰되었다. Ethanol 용매로 희석한 α -Lipoic acid를 처리한 세포에서는 α -lipoic acid의 농도와 처리시간에 따라 세포 성장을 유의적으로 억제되는 것이 관찰되었다<Figure 3> ($p<0.05$). α -Lipoic acid를 처리한 24시간 후부터 400 $\mu\text{mol/L}$ 로 처리한 실험군에서 유의적으로 성장이 억제되었다. 또한, 48, 96시간 후부터는 α -lipoic acid를 처리한 모든 실험군에서 세포의 성장이 유의적으로 억제되는 것이 관찰되었다. 지방세포 3T3-L1에 비타민 유사물질인 α -lipoic acid를 ethanol로 희석하여 0, 100, 200, 400 $\mu\text{mol/L}$ 로 처리하고, 처리시간을 0, 24, 48, 96시간으로 하였을 때 α -lipoic acid를 처리한 48시간, 400 $\mu\text{mol/L}$ 로 처리한 실험군에서 유의적으로 세포의 성장이 억제되는 것을 관찰



<Figure 1> Effect of α -Lipoic acid diluted distilled water on cell proliferation in 3T3-L1 cells.

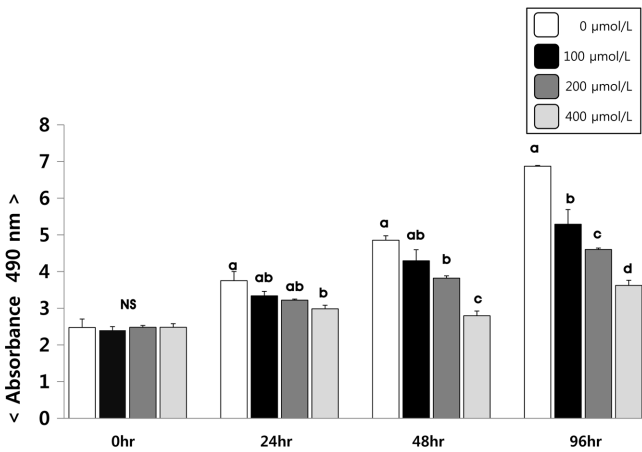
Each bar represents the mean \pm SD from three independent experiments. Comparisons among different concentration of α -lipoic acid that yielded significant difference ($p<0.05$) are indicated by different letters above each bar



<Figure 2> Effect of α -Lipoic acid diluted DMSO on cell proliferation in 3T3-L1 cells.

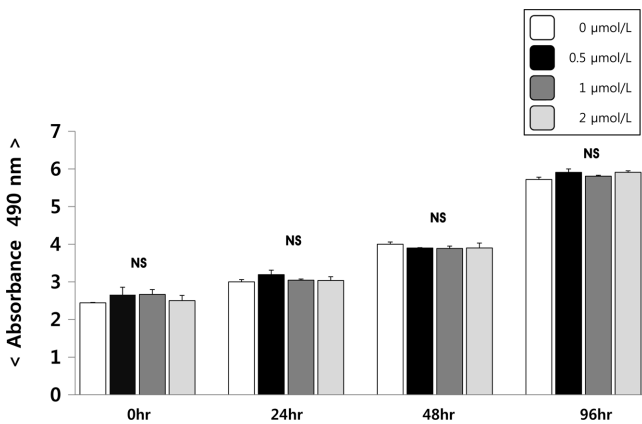
Each bar represents the mean \pm SD from three independent experiments. Comparisons among different concentration of α -lipoic acid that yielded significant difference ($p<0.05$) are indicated by different letters above each bar.

되었고, 처리한 지 96시간 이후부터는 α -lipoic acid를 200, 400 $\mu\text{mol/L}$ 처리한 실험군에서도 대조군에 비해 세포의 성장이 유의적으로 억제되었다. Davis et al.(2009)에 따르면, mouse skin fibroblast cell에 100 μmol DL- α -lipoic acid를 처리한 후 γ -방사선 양(dose)을 달리하여 조사한 후, MTT assay를 실시하여 생존력(viability)을 알아본 결과, 방사선의 양과 생존력(viability)은 음의 상관관계를 나타냈으며, Koh et al.(2005)은 뼈의 파골세포에 α -lipoic acid를 처리한 결과, 파골 전구 세포에 직접 작용하여 파골세포 형성과 성장이 억제되었다고 하였다. Artwohl et al.(2007)도 human endothelial cell에 α -lipoic acid를 0, 1, 50, 500, 1000 μmol 로 처리한 후 세포 증식을 알아본 결과, α -lipoic acid를 50 μmol 이상으로 처리하였을 때 세포 증식을 유의적으로



<Figure 3> Effect of α -Lipoic acid diluted ethanol on cell proliferation in 3T3-L1 cells.

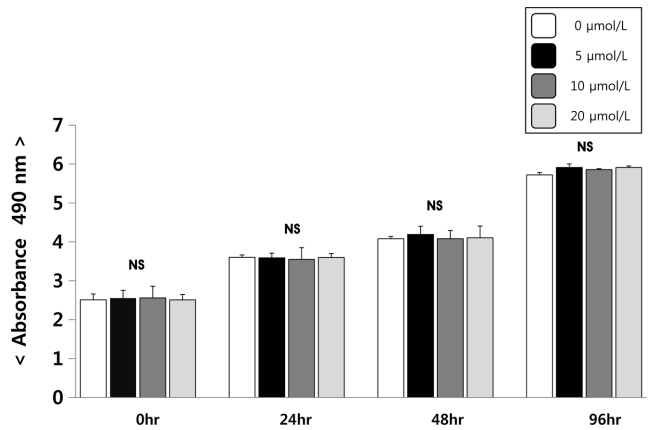
Each bar represents the mean \pm SD from three independent experiments. Comparisons among different concentration of α -lipoic acid that yielded significant difference ($p < 0.05$) are indicated by different letters above each bar.



<Figure 4> Effect of treated 0, 0.5, 1 and 2 $\mu\text{mol/L}$ α -Lipoic acid on cell proliferation in 3T3-L1 cells.

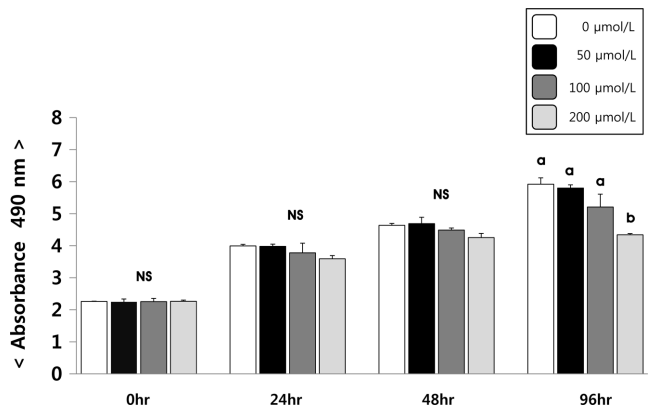
Each bar represents the mean \pm SD from three independent experiments. Comparisons among different concentration of α -lipoic acid that yielded significant difference ($p < 0.05$) are indicated by different letters above each bar.

억제하였으며, 세포에 vascular epidemial growth factor (VEGF)를 처리하여 세포의 성장을 유도한 후 α -lipoic acid를 같은 농도로 처리했을 때도 50 μmol 이상으로 처리하였을 때 세포 증식을 유의적으로 억제한 것으로 보고하였다. 따라서 본 연구 <Figure 3> 결과 같이 분화 유도 후 2일째부터 α -lipoic acid를 400 $\mu\text{mol/L}$ 이상으로 처리하였을 때 지방 세포의 성장을 억제하는 것이 관찰되었다. 또한 위에서 비교한 여러 연구들에서도 α -lipoic acid를 희석하는 용매로는 ethanol을 가장 많이 이용하였으며, 이러한 결과는 ethanol 용매로 희석한 α -lipoic acid가 3T3-L1 세포에 처리하였을 때 다른 용매를 사용한 방법보다 세포의 성장이 유의적으로 억제된다는 것이 관찰되었다.



<Figure 5> Effect of treated 0, 5, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ α -Lipoic acid on cell proliferation in 3T3-L1 cells.

Each bar represents the mean \pm SD from three independent experiments. Comparisons among different concentration of α -lipoic acid that yielded significant difference ($p < 0.05$) are indicated by different letters above each bar.

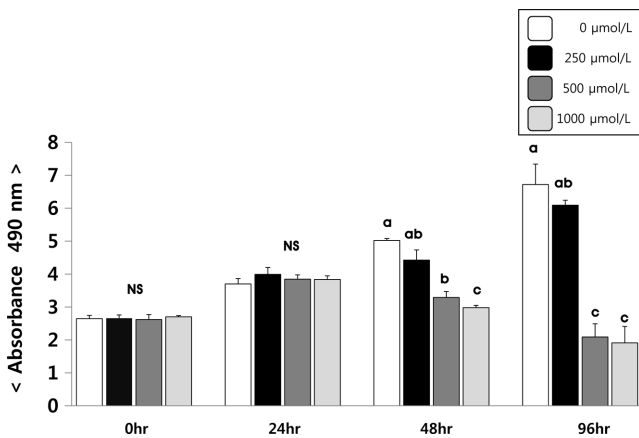


<Figure 6> Effect of treated 0, 50, 100 and 200 $\mu\text{mol/L}$ α -Lipoic acid on cell proliferation in 3T3-L1 cells.

Each bar represents the mean \pm SD from three independent experiments. Comparisons among different concentration of α -lipoic acid that yielded significant difference ($p < 0.05$) are indicated by different letters above each bar.

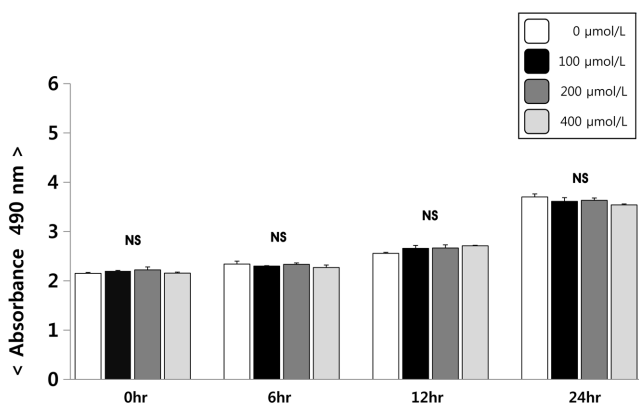
2. α -Lipoic acid의 처리 농도에 따른 세포 증식

α -Lipoic acid의 처리 농도별 세포 성장에 미치는 효과를 관찰해보기 위해 다양한 처리 농도 세포에 α -lipoic acid 처리하였다. 처리농도 0, 0.5, 1, 2 $\mu\text{mol/L}$ 로 실험을 진행하였을 때의 결과는 처리 시간 0, 24, 48, 96시간의 조건에도 3T3-L1의 세포 성장에는 아무런 영향을 미치지 않았다 <Figure 4> ($p < 0.05$). α -Lipoic acid의 처리농도를 10배로 증가시켜 처리한 0, 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ 실험에서도 처리농도에 관계없이 성장에 변화를 나타내지 않았다 <Figure 5> ($p < 0.05$). 그러나, 처리 농도를 증가시켜 0, 50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ 로 처리하고, 96시간 후 200 $\mu\text{mol/L}$ 로 처리한 실험군에서는 대조군에 비해 73.3%로 세포의 성장이 유의적으로 낮아졌다 <Figure 6> ($p < 0.05$). α -Lipoic acid의 200 $\mu\text{mol/L}$



<Figure 7> Effect of treated 0, 250, 500 and 1000 μmol/L α-Lipoic acid on cell proliferation in 3T3-L1 cells.

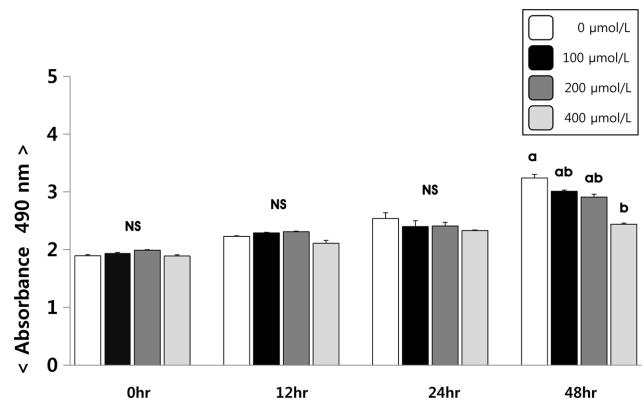
Each bar represents the mean±SD from three independent experiments. Comparisons among different concentration of α-lipoic acid that yielded significant difference (p<0.05) are indicated by different letters above each bar.



<Figure 8> Effect of treated α-Lipoic acid for 0, 6, 12 and 24 hr on cell proliferation in 3T3-L1 cells.

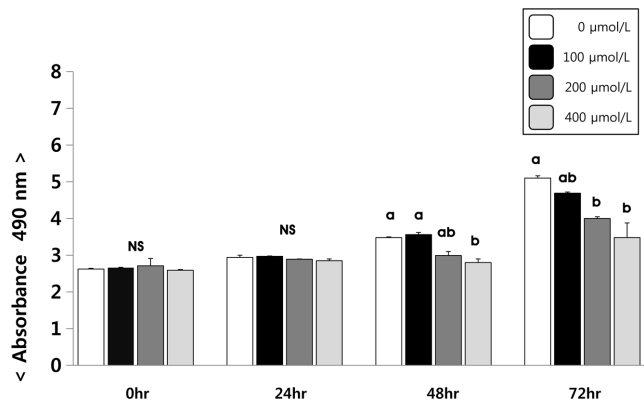
Each bar represents the mean±SD from three independent experiments. Comparisons among different concentration of α-lipoic acid that yielded significant difference (p<0.05) are indicated by different letters above each bar.

로 처리한 실험군에서 유의적으로 성장이 억제된 것이 관찰되어 α-lipoic acid를 고농도(250, 500, 1000 μmol/L)로 처리하여 다시 실험하였다. 결과는 세포에 처리한 24시간 후에는 처리농도에 따라 대조군과 실험군간의 차이가 관찰되지 않았으나, 처리시간 48시간 이후부터는 500, 1000 μmol/L 실험군에서 대조군에 비해 96%→91%로 성장이 유의적으로 억제되었다<Figure 7> (p<0.05). 그러나, 처리시간 96시간 이후부터 α-lipoic acid를 500, 1000 μmol/L로 처리한 실험군에서 생존한 세포의 수가 급격히 감소되었다. 이러한 결과는 α-lipoic acid를 고농도로 3T3-L1세포에 처리하였을 때와 α-lipoic acid를 희석하는 용매로 DMSO를 사용한 결과와 유사하게 관찰되었으며, 이는 α-lipoic acid를 고농도로 3T3-L1 세포에 처리하면 세포 손상을 주어, 세포가 사망하는 것으로



<Figure 9> Effect of treated α-Lipoic acid for 0,12, 24 and 48 hr on cell proliferation in 3T3-L1 cells.

Each bar represents the mean±SD from three independent experiments. Comparisons among different concentration of α-lipoic acid that yielded significant difference (p<0.05) are indicated by different letters above each bar.



<Figure 10> Effect of treated α-Lipoic acid for 0,24, 48 and 72 hr on cell proliferation in 3T3-L1 cells.

Each bar represents the mean±SD from three independent experiments. Comparisons among different concentration of α-lipoic acid that yielded significant difference (p<0.05) are indicated by different letters above each bar.

사료된다. α-Lipoic acid(ALA)는 양쪽성 물질(water and fat soluble)로 blood brain barrier와 세포막을 쉽게 통과할 수 있으며, 중금속과 쉽게 결합하는 능력을 가지고 있으며 세포 내에서 항상 존재하는 효소에 의해 dihydrolipoic acid로 환원되어, 비타민 C, 비타민 E, coenzyme A10, ubiquinone과 같은 다른 항산화제의 순환을 도와주는 역할을 한다(Han et al. 1997). 섭취된 α-lipoic acid는 항산화 작용에 의해 자유기가 관여하는 중금속중독, 간질환, 방사능 중독, 당뇨병, 당뇨병성 neuropathy, 신경퇴행성 질병, HIV 감염, 동맥경화증과 같은 질병의 치료와 노화방지에 효과가 있다고 보고되고 있다(Ghibu et al. 2008; Brooks et al. 1984). 체내에서는 미토콘드리아 내에서 lipoic acid synthase의 촉매작용에 의해 합성되어지는데, 미토콘드리아 내에서는 pyruvate

dehydrogenase와 α -ketoglutarate dehydrogenase의 보조인자로 작용한다(Pari & Murugavel 2004). 그 외에도 동물 실험에서 lipoic acid를 식이에 보충하였을 때 다양한 생리적 활성이 변화되었다고 하였다. 식이를 통한 lipoic acid는 drug, 고과당식사(high fructose diet), 노화, 육체적인 운동 등에 의한 산화적 스트레스를 효과적으로 개선시켰으며, 포도당 대사 조절로 인슐린 저항성과 제2형 당뇨병을 개선하였고, 저지혈증(hypolipidemia)을 개선시키는 데에도 효과를 나타냈다(Packer 2009). 이러한 연구들과 결과를 비교해 볼 때, α -lipoic acid는 본 실험에 사용한 지방세포외에 질병을 유발하는 여러 대사적인 조건들을 항산화 능력을 통해 효과적으로 회복시키고, 지방세포의 경우 세포의 성장을 저해하여 비만으로의 진행을 차단하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

3. α -Lipoic acid의 처리 시간에 따른 세포 증식

3T3-L1에 α -lipoic acid를 처리하는 시간에 따라 세포 성장에 미치는 효과도 관찰해보았다. α -lipoic acid의 농도를 0, 100, 200, 400 $\mu\text{mol/L}$ 로 처리하고, 0, 6, 12, 24시간 동안 세포에 α -lipoic acid를 처리하였을 때 처리시간에 따라 세포의 성장에는 아무런 변화가 일어나지 않았다<Figure 8> ($p < 0.05$). 그렇지만, α -Lipoic acid의 처리 농도를 동일하게 한 후, 처리시간을 0, 12, 24, 48시간 후 세포성장을 관찰한 결과, 처리시간 48시간, 처리농도 400 $\mu\text{mol/L}$ 에서 대조군에 비해 세포의 성장이 억제되는 것을 관찰하였고<Figure 9> ($p < 0.05$), 0, 24, 48, 72시간 처리하였을 때에는 48시간, 400 $\mu\text{mol/L}$ 실험군에서 대조군에 비해 80.4% 성장이 유의적으로 억제되는 것이 관찰되었다. 처리시간을 72시간, 200 $\mu\text{mol/L}$ 실험군에서 78.4%, 400 $\mu\text{mol/L}$ 군에서는 68.2%로 대조군에 비해 세포의 성장이 유의적으로 낮아졌다<Figure 10> ($p < 0.05$).

α -Lipoic acid를 3T3-L1 세포에 처리 농도를 다르게 처리하였을 때에도 α -lipoic acid는 세포 성장을 억제하였다. α -Lipoic acid를 세포에 처리한 후 48시간 후, 처리농도를 400 $\mu\text{mol/L}$ 로 처리한 실험군은 대조군에 비해 유의적으로 세포의 성장이 억제되었다. Hahm et al.(2014)의 연구에서도 α -lipoic acid를 3T3-L1세포에 처리하였을 때 지방 세포로의 분화가 희석되었으며, 세포 내 지방 축적이 유의적으로 억제되었다고 하였다. 또한 Prieto-Hontoria et al.(2013)의 연구에서는 lipoic acid를 처리한 후 48시간 이후부터 지방세포에서 분비되는 adiponectine 생성을 효과적 억제하였다고 하였다. 본 연구 결과에서도 다른 연구들과 유사하게 α -lipoic acid는 지방세포로의 분화와 지방 세포 성장을 효과적으로 억제하였으며, 이는 비만을 유도하는 여러 과정 중 가장 기초적인 단계에서 α -lipoic acid는 지방세포 성장을 분명히 억제하는 효과가 있다고 하겠다.

V. 요약 및 결론

본 연구에서는 항염증, 항암, 항산화 효과 등이 보고되고 있는 비타민 유사물질 α -Lipoic acid를 지방세포인 3T3-L1에 희석용매별, 처리농도별과 처리시간별로 세포 성장에 미치는 영향에 대해 관찰해보고자 실시하였다. α -Lipoic acid를 지방세포인 3T3-L1에 희석용매별로 처리하였을 때 ethanol로 희석한 α -lipoic acid를 400 $\mu\text{mol/L}$ 로 48시간 이상 처리하였을 때 대조군에 비해 유의적으로 성장이 억제되었다. 처리 농도에 따른 세포성장에 미치는 영향은 α -lipoic acid가 100 $\mu\text{mol/L}$ 이하의 낮은 농도에서는 유의적인 성장 억제를 관찰할 수 없었으며, 500 $\mu\text{mol/L}$ 이상의 높은 농도에서는 세포의 생존이 불가능하여 세포가 사망되는 것이 관찰되었다. 또한, 처리시간을 달리한 실험에서는 α -lipoic acid를 세포에 처리한 지 48시간 후부터 유의적으로 세포의 성장이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. 여러 결과들을 종합해볼 때, 비타민 유사물질인 α -lipoic acid는 지방세포 3T3-L1에서 세포의 성장을 유의적으로 억제하였으며, α -lipoic acid의 희석 용매로는 ethanol을 사용하고, 처리농도 200 $\mu\text{mol/L}$ 이상, 처리시간 48시간 후부터 세포의 성장이 유의적으로 감소되는 것이 확인되었다. 그러므로, α -lipoic acid는 비만과 관련된 많은 질병을 치료하거나 억제하는 예방적인 차원에서의 기능성 식품이나 비만 치료제로의 개발 가능성이 관찰되었으며, 이를 위해서 동물과 인체를 대상으로 더 깊이 있고 폭넓은 임상 연구와 독성에 대한 안정성 연구가 진행되어질 것이 요구되어진다. 또한 본 실험 결과는 α -lipoic acid를 이용한 많은 *in vitro* 실험에서 실험 조건을 정하는 과정에서 상당히 활용도가 높을 것이라 사료되며, 본 연구는 여러 *in vitro* 실험 과정에서 기초 자료로 이용되어질 것을 기대해본다.

감사의 글

본 연구는 2018년 장안대학교 학술연구비 지원으로 수행되었습니다.

Conflict of Interest

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

References

Snell EE, Strong FM, Peterson WH. 1937. Growth factors for bacteria: Fractionation and properties of an accessory factor for lactic acid bacteria. *Biochem J.*, 31(10):1789-

1799

- Gleiter CH, Schug BS, Hermann R, Elze M, Blume HH, Gundert-Remy U. 1996. Influence of food intake on the bioavailability of thioctic acid enantiomers. *Eur J Clin Pharmacol.*, 50(6):513-514
- Teichert J, Kern J, Tritschler HJ, Ulrich H, Preiss R. 1998. Investigations on the pharmacokinetics of alpha-lipoic acid in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther.*, 36(12):625-628
- Breithaupt-Grögler K, Niebch G, Schneider E, Erb K, Hermann R, Blume HH, Schug BS, Belz GG. 1999. Dose-proportionality of oral thioctic acid-coincidence of assessments via pooled plasma and individual data. *Eur J Pharm Sci.*, 8(1):57-65
- Reed LJ. 1957. The chemistry and function of lipoic acid. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem.*, 18:319-347
- Rosenberg HR, Culik R. 1959. Effect of alpha-lipoic acid on vitamin C and vitamin E deficiencies. *Arch Biochem Biophys.*, 80-86
- Jordan SW, Cronan JE Jr. 1997. Biosynthesis of lipoic acid and posttranslational modification with lipoic acid in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.*, 279:176-183
- Wada H, Shintani D, Ohlogge J. 1997. Why do mitochondria synthesize fatty acids? Evidence for involvement in lipoic acid production. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 18; 94(4):1591-1596
- Maliska D, Winiarska K. 2005. Lipoic acid : characteristic and therapeutic application. *Postepy Hig Med Dosw.*, 59:535-543
- Lee WJ, Lee IK, Kim HS, Kim YM, Koh EH, Won JC, Han SM, Kim MS, Jo I, Oh GT, Park IS, Youn JH, Park SW, Lee KU, Park JY. 2005. Alpha-lipoic acid prevents endothelial dysfunction in obese rats via activation of AMP-activated protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 25(12):2488-2494
- Kim MS, Park JY, Namkoong C, Jang PG. 2004. Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Nature medicine.*, 10(7):727-733
- Yi X, Pashai A, Xia M, Moreau R. 2013. Reversal of obesity-induced hypertriglyceridemia by (R)- α -lipoic acid in ZDF (fa/fa) rats. *Biochem Biophys Res Commun.*, 439(3):390-395
- Saengsirisuwan V, Perez FR, Sloniger JA, Maier T, Henriksen EJ. 2004. Interactions of exercise training and alpha-lipoic acid on insulin signaling in skeletal muscle of obese Zucker rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 287(3): E529-536
- Kim DM, Ahn CW, Nam SY. 2005. Prevalence of obesity in Korea. *Obes Rev.*, 6(2):117-121
- Hirsch J, Batchelor B. 1976. Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clin Endocrinol Metab.*, 5(2):299-311
- Green H, Kehinde O. 1975. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell.*, 5(1):19-27
- Lee MS, Kim CT, Kim CJ, Cho YJ, Kim YH. 2006. Effects of *Portulaca Oleracea* L. Extract on lipolysis and hormone sensitive lipase (HSL) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Korean J Nutr.*, 39(8):742-747
- Seo EY. 2015. Effects of (6)-gingerol, ginger component on adipocyte development and differentiation in 3T3-L1. *J Nutri Health.*, 48(4):327-334
- Yeh WC, Cao Z, Classon SL, McKnight SL. 1995. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three member of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Gene.*, 9:168-181
- Chu SK, Seo EY, Kim WK, Kang NE. 2008. Effect of cyanidin on cell motility and invasion in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Korean J Nutr.*, 41(8):711-717
- Davis GDJ, Masilamoni JG, Arul V, Sakthivelu IV, Kumar MSM, Baraneedharan U, Paul SFD. 2009. Radioprotective effect of DL- α -lipoic acid on mice skin fibroblasts. *Cell Biol Toxicol.*, 25:331-340
- Koh JM, Lee YS, Byun CH, Chang EJ, Kim H, Kim YH, Kim HH, Kim GS. 2005. Alpha-lipoic acid suppresses osteoclastogenesis despite increasing the receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoprotegerin ratio in human bone marrow stromal cells. *J Endocrinol.*, 185(3):401-413
- Artwohl M, Muth K, Kosulin K, de Martin R, Hölzenbein T, Rainer G, Freudenthaler A, Huttary N, Schmetterer L, Waldhäusl WK, Baumgartner-Parzer SM. 2007. R-(+)-alpha-lipoic acid inhibits endothelial cell apoptosis and proliferation: involvement of Akt and retinoblastoma protein/E2F-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 293(3):E681-689
- Han D, Sen CK, Roy S, Kobayashi MS, Tritschler HJ, Packer L. 1997. Protection against glutamate-induced cytotoxicity in C6 glial cells by thiol antioxidants. *Am J Physiol.*, 273: R1771-R1778
- Ghibu S, Richar C, Delemasure S, Vergely C, Mogosan C, Muresan A. 2008. An endogenous dithiol with antioxidant properties: Alpha-lipoic acid, potential uses in cardiovascular disease. *Elsevier Masson SAS.*, 57:161-165
- Brooks GA, Casey MD, Timothy PW. 1984. Estimation of anaerobic energy production and efficiency in rat during exercise. *J Appl Physiol.*, 56:520-525
- Pari L, Murugavel P. 2004. Protective effect of alpha lipoic acid against chloroquine-induced hepatotoxicity in rats. *J Appl*

Toxicol., 24:21-26

Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. 1995. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med.*, 19:227-250

Hahm JR, Noh HS, Ha JH, Roh GS, Kim DR. 2014. Alpha-lipoic acid attenuates adipocyte differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 cells via dependent autophagy. *Life science.*, 100(2):124-132

Prieto-Hontoria PL, Fernandez-Galilea M, Perez-Matute P, Martinez JA, Moreno-Aliaga M. 2013. Lipoic acid inhibits adiponectin production in 3T3-L1 adipocyte. *J Physiol and Biochem.*, 69(3):595-600

Received September 27, 2018; revised October 03, 2018; accepted October 18, 2018