

Evaluation of Lipid Accumulation's Inhibitory Activity on 3T3-L1 Cells with Red Yeast Barley Extracts

Gi-Seok Kwon¹, Byung-Hyuk Kim², Jun-Hyeong Lee^{1,2}, Hak-Soo Hwang² and Jung-Bok Lee^{2*}

¹Division of Horticulture & Medicinal Plant, College of Life Sciences & Biotechnology, Andong National University, Gyeongbuk 36729, Korea

²Kyochon Research & Innovation Center, Kyochon Co., LTD., Gyeonggi 18469, Korea

Received November 19, 2020 / Revised January 25, 2021 / Accepted January 29, 2021

Red yeast rice has been extensively used as food and traditional medicine for thousands of years in East Asian countries. It is produced by the fermentation of a particular yeast (in general, *Monascus purpureus*) as rice and various cereals (barley, soybean, etc.). *Monascus* sp. produces many secondary metabolites during its growth, including pigments, monacolins, and γ -aminobutyric acid. Some metabolites – specifically, monacolin K, γ -aminobutyric acid, dimerumic acid, and monascus pigments – have been reported to lower cholesterol and blood pressure while showing anti-obesity effects. In this study, we investigated the anti-obesity effect of ethanol extract from red yeast barley (RYB) fermented with *Monascus* sp. BHN-MK 2 on 3T3-L1 cells. The anti-obesity effects of RYB extract were examined: its lipid accumulation inhibitory effect was tested by Oil Red O staining, and obesity-related mRNA expression levels were tested by real-time RT-PCR in MDI stimulated 3T3-L1 cells. The intracellular lipid content of MDI-stimulated 3T3-L1 cells decreased significantly to 5.04%, 12.24%, and 23.52% in response to 200, 400, and 800 μ g/ml RYB, respectively. Moreover, we evaluated that RYB extract significantly downregulated the expression of *C/EBP α* , *SREBP-1*, and *PPAR- γ* gene in a dose-dependent manner. As a result, red yeast barley ethanol extracts exerted the strongest anti-obesity effects. Also, the results indicate that red yeast barley could be used as a functional anti-obesity food material.

Key words : 3T3-L1, bioconversion, fermentation, *Monascus* sp., red-yeast barley

서 론

비만은 에너지 대사의 불균형을 유발하여 심혈관 및 대사 관련 질환의 주요 원인으로 작용하고, 조기 사망을 유발하는 주요 위험요소로 알려져 있다[18, 21]. 비만은 일반적인 건강 질환 중 하나로서 지방세포의 과도한 증식 및 축적의 결과로 나타난다. 비만은 지방 세포의 과도한 분화 및 세포 수 증가, 에너지 섭취와 소비 간 불균형, 유전적 요인 등 다양한 원인으로 유발된다.

비만 연구의 모델로 많이 활용되는 3T3-L1 전지방세포는 쥐의 섬유모세포 유래 전지방세포이다. 3T3-L1 전지방세포는 세포 분화 유도물질(MDI)과 호르몬의 관여에 의해 지방세포로 분화하며 지방세포 형성 과정에서 세포 morphology 변화, 유전자 및 단백질 발현, 호르몬 민감성 변화 등이 수반된다[13, 19, 29]. MDI (0.5 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthine, 0.5 μ M dexamethasone, 10 μ g/ml insulin)의 혼합물, 지방분화 유도물

질)와 호르몬에 의해 지방세포로의 분화가 시작되며, 분화 초기에 CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs)의 발현이 증가되고, 후기 전사인자이자 분화조절 전사인자인 peroxidase proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ)의 발현이 증가됨으로써 지방세포 특이 유전자 발현의 활성화, 분화 조절 및 축적을 유발하여 지방세포형성 및 분화과정의 완성이 이루어진다[7, 20, 28]. 또한 PPAR- γ 발현량 증가는 adiponectin, resistin과 같은 지방세포 특이 유전자의 발현을 유도하고, 이는 성숙된 지방세포로 분화되었을 때 지방산 산화, 당 대사 및 식욕조절 등 다양한 체내 에너지 대사를 조절하는 것으로 알려져 있다. 따라서 지방세포 분화 억제 및 감소, 지방 합성 및 분해 조절 등 지방 세포의 축적 조절에 대한 항비만 연구가 전 세계적으로 수행되고 있다[2, 14, 25, 28].

보리(*Hordeum vulgare* L.)는 한국에서 쌀만큼 중요한 식량으로 보리밥, 맥주, 식혜 등으로 섭취하며, 단백질, 지방, 무기질 등 다양한 영양성분을 함유하고 있다[1]. 또한, 보리는 luto-narin (isoorientin-7-Oglucoside), saponarin (flavone-C-glycosides)등의 다양한 폴리페놀과 플라보노이드가 함유되어 있으며, 수용성 식이 섬유인 β -glycan, 아미노산, 탄수화물이 함유하고 있으며, 보리 잎에 풍부하게 들어있는 superoxide dismutase (SOD)와 보리 잎에서 분리된 glycoprotein인 P4-D1, D1-G1은 강한 항염증 작용과 체지방 축적을 억제하는 등의 성인병 예방에 효과가 알려져 있다[6, 15, 23]. 또한 보리 섭취

*Corresponding author

Tel : +82-31-376-1973, Fax : +82-31-376-1907

E-mail : bio91@hanmail.net

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

는 혈중 콜레스테롤 감소, 총 콜레스테롤 함량 감소, 내장 지방 감소를 유도한다고 보고되었다[26, 32].

Monascus sp.는 생물전환을 통해 흰쌀을 붉은쌀인 홍곡으로 만들며, 이를 통해 얻어지는 천연 색소원은 중국을 비롯한 동아시아권 국가에서 수세기 동안 널리 사용되고 있다[16]. 홍곡은 monacolin K, lovastatin, mevinolin, γ -aminobutyric acid (GABA), acetylcholine 등의 다양한 생리활성 물질을 함유하여 항산화 효과, 혈압 상승 억제 등의 기능성이 있는 것으로 알려져 있다[5]. 특히 홍곡에 함유된 monacolin K는 콜레스테롤 합성 저해제로 사용되며 고지혈증 환자들로부터 콜레스테롤 저해 효과가 보고되었다[9, 34]. 따라서 홍곡을 이용한 고기능성 생리활성 물질 개발과 건강기능식품 및 식품소재로 활용하려는 연구가 활발하게 이루어져, 2005년 식품의약품안전처에서 홍곡쌀을 혈중 콜레스테롤 농도개선에 도움을 주는 기능성 원료로 지정하였다[3]. *Monascus* sp.는 보리 및 수수와 같은 곡물을 발효할 수 있으나, 현재 *Monascus* sp.를 이용한 보리 발효물(홍맥)의 기능성 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 보리에 *Monascus* sp. BHN-MK 2를 접종 및 배양하여 생산된 홍맥을 70% 에탄올을 이용해 추출하고, 그 추출물이 3T3-L1 전지방세포 모델의 분화 및 지방 축적에 미치는 영향을 관찰하였다. 본 연구를 바탕으로 홍맥의 지방 축적 억제 기능성을 확인하고 비만 예방 소재 또는 다이어트용 기능성 식품소재로의 가능성을 검토하고자 한다.

재료 및 방법

추출물의 제조

본 연구에서는 기존에 확보된 *Monascus* sp. BHN-MK 2를 이용하여 보리를 발효하였으며, 발효된 홍맥 200 g당 1 l의 70% ethanol을 넣고 혼합하여 1시간 동안 80°C에서 추출하였다[10]. 이 추출액을 filter paper (Qualitative filter paper No. 2, Hyundai Micro, Korea)로 여과한 후 rotary vacuum evaporator를 이용하여 용매를 제거하고 농축하였으며 잔여 농축물은 -70°C 이하에서 동결 건조하여 시료로 사용하였다.

3T3-L1 전지방세포의 배양 및 분화

마우스 유래 3T3-L1 전지방세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양 받아 사용하였다. Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM, 1X, high glucose) (Welgene, Gyeongsan, Korea)에 10% Bovine Calf Serum (BCS, Welgene, Gyeongsan, Korea)과 1% Antibiotic antimycotic solution (Welgene, Gyeongsan, Korea)을 첨가하여 100% confluence 될 때까지 배양하였다. 3T3-L1 전지방세포의 분화를 유도하기 위해 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Welgene Gyeongsan, Korea)와 1% antibiotic antimycotic solution이 첨가된 DMEM으로 교체하고, 2일 후 FBS

함유 DMEM과 분화 유도 물질인 MDI solution (0.5 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthine, 0.5 μ M dexamethasone, 10 μ g/ml insulin)을 함께 처리하였다. 이때, 홍맥 추출물의 지방분화 억제 효과를 관찰하기 위해 시료를 농도별로 함께 처리하였다. 음성대조군은 0.5% DMSO (Dimethyl sulfoxide, Sigma-aldrich D8418, USA)를 처리하였다. 분화유도 물질을 처리한 후 2일 마다 FBS 포함 DMEM, 10 μ g/ml insulin과 농도별 시료를 교환하여 10일 동안 분화시키면서 지방축적을 관찰하였다.

MTT assay를 이용한 세포 독성 평가

시료에 대한 세포 생존율 평가를 위해 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) assay를 실시하였다[30]. 배양된 3T3-L1 전지방세포주를 1.0×10^5 cells/200 μ l의 농도로 96 well plate에 분주하고 24시간 배양하며 부착 및 안정화하였다. 이후 농도별 시료를 처리하여 48시간 배양한 후 MTT 용액을 각 well에 100 μ l씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 1시간 동안 배양시켜 MTT의 환원 반응을 유도하였다. 반응된 MTT 시약을 제거한 후, 생성된 formazan 결정을 용해시키기 위해 각 well에 100 μ l의 DMSO를 첨가하고 540 nm에서 UV/VIS spectrophotometer (Tecan, Männedorf, Switzerland)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 흡광도 측정 후 세포 생존율은 아래의 식에 대입하여 계산해 나타내었다.

$$\text{Cell viability (\%)} = (A_{540}(\text{treated cells})/A_{540}(\text{control cells})) \times 100\%$$

지방세포 내 지방생성량 평가

분화에 따른 3T3-L1 전지방세포 내 중성지방 축적량을 평가하고자 각 시료와 함께 10일 동안 배양 및 분화된 세포의 Oil Red O staining을 진행하였다[22]. 3T3-L1 전지방세포 배양액을 제거한 뒤, 10% formalin 용액으로 실온에서 10분 동안 고정된 후 제거하였다. 그 후 같은 양의 formalin 용액을 첨가하여 1시간 이상 실온에서 방치한 후 증류수를 이용해 2회 세척하였다. 60% isopropanol을 이용해 다시 세척하고 세포를 완전히 건조시켰다. 세척 및 건조된 세포에 Oil Red O 용액을 첨가하여 10분 이상 방치하며, 세포 내 축적된 지방구를 충분히 염색하였다. 염색이 끝난 후, 증류수를 이용하여 3~4회 세척하고 현미경으로 관찰하였다. 세포 내 축적된 지방구 및 지방성분과 결합한 Oil Red O의 정량을 위해 증류수를 모두 제거하고 건조시킨 후 100% isopropanol을 첨가하여 용출시켰다. 용출된 Oil Red O solution을 회수하여 ELISA 490 nm에서 흡광도 측정을 통해 정량하였다.

지방 축적 관련 유전자 발현 평가

홍맥 추출물의 지방분화 억제능을 평가하기 위해 실험한 3T3-L1 전지방세포의 RNA를 추출하여 RT-PCR을 통해 유전

Table 1. Primer sequences for Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) analysis

Gene name		Primer sequence (5'-3')	Reference
GAPDH	Forward	TGAAGGTCCGGTGTGAACGGATTTGGC	[27]
	Reverse	CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC	
C/EBP- α	Forward	TGCTGGAGTTGACCAGTGAC	[4]
	Reverse	AAACCATCCTCTGGGTCTCC	
PPAR- γ	Forward	TCGCTGATGCACTGCCTATG	[31]
	Reverse	GAGAGGTCCACAGAGCTGATT	
SREBP-1	Forward	GGAGACATCGCAAACAAGCTGA	[35]
	Reverse	CAGACTGCAGGCCAGATCCA	

자 발현량을 확인하였다. 시료 처리 및 분화가 완료된 3T3-L1 전지방세포에 trizol-agent를 첨가하여 RNA를 분리하였고 *Multi* Bead™ Total RNA Prep Kit (Biofact, Daejeon, Korea)를 이용하여 total RNA를 추출 및 정량하였다. 정제된 RNA는 2X RT Pre-Mix kit (Biofact, Daejeon, Korea)를 이용해 cDNA로 합성하였다. RNA 추출과 cDNA 합성은 manufacturer's protocol을 따라 수행하였다. 합성된 cDNA와 Real-time PCR kit without intercalation dye (Biofact, Daejeon, Korea)를 이용해 유전자 발현 정도를 측정 및 평가하였다. 유전자의 발현은 house-keeping gene인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 internal control로 하여 지방세포 분화 관련 인자인 *C/EBP- α* , *SREBP1*, *PPAR- γ* 의 유전자 발현량을 확인하였다 (Table 1).

Real time RT-PCR은 Real time PCR (Bio-Rad CFX-96, Hercules, CA, USA)기기를 이용하였으며, Real-time PCR kit mixture와 10 pmol/ μ l forward primer, reverse primer, 그리고 합성된 cDNA를 혼합해 반응하였다. 반응액은 pre-incubation 95°C에 15분, denaturation 95°C 30초, annealing은 50°C 30초, extension은 72°C에서 30초로 설정하여 45 cycle을 수행하였다. 마지막 cycle후 얻어진 결과는 Bio-Rad CFX Maestro 1.1을 이용하여 분석하였다.

결 과

홍맥 추출물의 세포 독성

홍맥 추출물에 대한 세포 생존을 분화된 3T3-L1 전지방세포와 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay 방법을 통해 확인하였다 (Fig. 1). 200-800 μ g/ml 농도 범위에서 세포 생존율을 측정할 결과, 200 μ g/ml 농도는 92.32%, 800 μ g/ml 농도에서 91.54%의 세포 생존률이 확인되었다.

지방 축적 억제 효과

MDI를 처리하여 지방세포로 분화된 3T3-L1 전지방세포에 홍맥 추출물을 농도별로 처리하여 지방세포 내에 형성된 lipid

droplet을 염색하여 지방의 양을 간접적으로 측정하였다. Oil Red O 염색 시약은 3T3-L1 전지방세포의 생존에 영향을 미치지 않는 100 μ g/ml을 처리하였으며 세포 내 lipid droplet 염색을 통해 확인한 결과, MDI 만을 처리하여 배양시킨 양성 대조군에서는 세포 내 lipid droplet의 형성이 확인되었다(Fig. 2B). 하지만, 홍맥 추출물 200, 400, 800 μ g/ml이 첨가된 실험군에서는 농도 의존적으로 lipid droplet의 형성이 억제되는 현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 2D ~ Fig. 2F). 또한, FBS가 첨가된 DMEM을 이용해 배양한 대조군과 비교해 MDI만 처리한 실험군에서는 약 155%의 염색도를 보이며 다량의 ORO가 용출됨을 확인하였다(Fig. 3). Isopropyl alcohol을 이용해 염색도를 정량화 한 결과에서도 MDI만 처리된 실험군에 비해 홍맥 추출물이 200, 400, 800 μ g/ml로 첨가된 실험군의 490

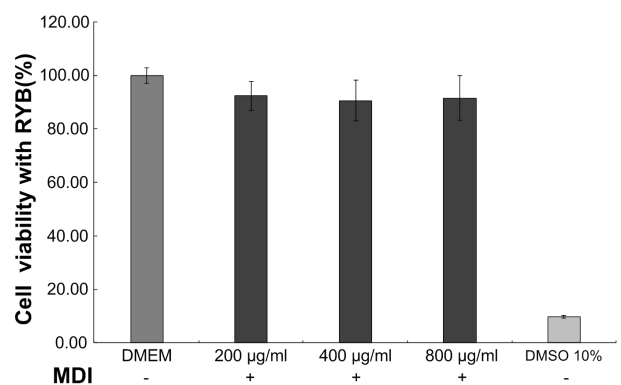


Fig. 1. Cell viability of 3T3-L1 adipocytes under various concentrations of Red Yeast Barely (RYB) extracts by MTT assay. 3T3-L cells were cultured in DMEM media in 96 well microtiter plate and after attachment different concentrations of RYB extracts were added to different wells contained same number of cells. Cells without treatment, only with DMEM was taken as control. Cell viability was calculated for each group by checking the absorbance of the dissolved formazan crystals in DMSO after addition of MTT reagent. Safe and toxic concentrations were determined. Data are expressed as mean \pm SEM of five different experiments.

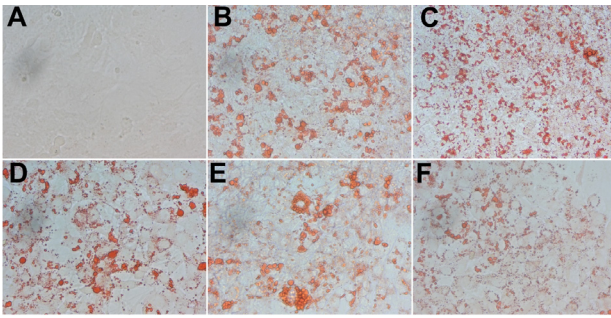


Fig. 2. Effects of RYB extracts on lipid droplet formation in 3T3-L1 cells. It was stained with Oil Red O dye and examined using a light microscope. It was captured at 9th day for adipocyte differentiation. A: the control group cultured with DMEM, B: Positive control group that was cultured using MDI mixed DMEM, C: Negative control group cultured with 0.5% DMSO mixed DMEM. Each picture from D to F was cultured with 200, 400, and 800 µg/ml RYB samples in adipocyte differentiation culture media.

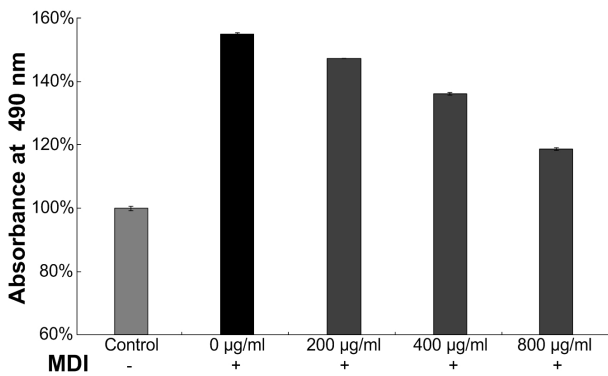


Fig. 3. Quantification of the stained lipid droplets were performed using the eluted Oil red O stain via measuring absorbance at 490 nm. The readings were normalized to background values of non-induced control DMEM. The OD values of all treatment conditions were compared to the adipogenic control group.

nm 흡광도는 0.493±0.001, 0.456±0.004, 0.397±0.004로 확인되었으며, 이는 147.20±0.06%, 136.03±0.37%, 119±0.43%로 용출량이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(Table 2, Fig. 3). 이를 통해 홍맥 추출물이 세포 생존에 영향을 끼치지 않고 지방 세포 분화만을 억제하는 것을 나타내며 홍맥이 3T3-L1 전지방세포구의 지방구 억제에 효과가 있음을 확인하였다.

Real time reverse transcription-PCR

Adipogenic transcription factor 발현에 미치는 영향을 Real-time PCR 기법을 활용하여 mRNA level에서 확인하였다(Fig. 4). *C/EBP-α*의 경우 200 µg/ml 농도에서 10.70의 발현량을 보이며 MDI 처리군 대비 약 6.87% 감소하였고, 400 µg/ml 농도에서 약 21.58%, 800 µg/ml 농도에서 약 37.77%의

발현 억제 활성을 확인하였다. *SREBP-1*의 발현은 세포 내 처리된 홍맥 추출물의 농도가 증가됨에 따라 각각 1.41, 1.23, 0.99로 확인되어 MDI 처리군값 2.18 대비 35.32%, 43.58%, 54.58%의 저해가 확인되었다. *PPAR-γ*의 발현은 200 µg/ml 농도일 때 4.92, 400 µg/ml 농도일 때 3.15, 800 µg/ml 농도일 때 2.27의 발현량을 확인하였다.

고 찰

본 연구에서는 홍맥 추출물의 항비만 효과를 연구하기 위해 3T3-L1 전지방세포에 분화유도물질인 MDI와 홍맥 추출물을 함께 처리하여 분화 과정 중 홍맥 추출물의 지방축적 억제 효과를 확인하고자 하였다.

세포 기반 MTT assay를 통해 홍맥 추출물의 세포 독성을 확인한 결과, 800 µg/ml 농도까지 세포의 생존을 확인하였으며, 가장 높은 농도인 800 µg/ml까지 90% 이상의 생존율을 확인하였으며, 홍맥 추출물의 지방분화 억제 활성을 평가하기 위한 처리 농도는 200, 400, 800 µg/ml로 설정하였다. MTT assay를 통해 홍맥 추출물은 세포 생존률에 변화가 없음을 확인하고 3T3-L1에 안전성을 확인하였다.

3T3-L1 전지방세포에 MDI와 홍맥 추출물을 처리하여 10일간 분화를 유도하고 시험물질을 반응시킨 결과, 홍맥 추출물을 처리하지 않고 분화유도 물질(MDI)만 처리된 세포는 세포질 내 지방구(lipid droplet)의 형성이 활발하게 유도된 것으로 확인되었다(Fig. 2B). 하지만 분화유도 물질(MDI)과 홍맥 추출물이 함께 처리된 세포의 경우, 첨가된 홍맥 추출물의 농도에 따라 3T3-L1 전지방세포의 지방세포로 분화 및 지방구(lipid droplet)의 성장이 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 2D ~ Fig. 2F). 이는 Oil Red O 염색을 통해 확인한 결과로, 지방구(lipid droplet)의 수는 큰 차이를 보이지 않으나 처리된 홍맥 추출물의 농도가 높을수록 지방구의 크기가 감소된다고 판단할 수 있었다.

홍맥 추출물이 3T3-L1 전지방세포에서 지방세포로 분화되는 과정에서 세포 내 lipid droplet 및 중성지방의 축적에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 Oil Red O 염색법을 시행하여 중성지방의 양을 측정하였으며, 지방세포 내 축적된 지방구의 중성지방을 붉은 색으로 염색하여 세포의 붉은색의 정도를 확인할 수 있으며 분화정도를 시각화 할 수 있는 장점을 가지고 있다[12]. Oil Red O는 중성지방과 cholesterol만을 특이적으로 염색하고 그 외에 인지질, 유리지방산 등은 염색되지 않기 때문에 지방세포의 분화 정도를 확인할 수 있다고 알려져 있다[17]. Isopropyl alcohol을 이용해 염색도를 정량화 한 결과에서도 MDI만 처리된 실험군에 비해 홍맥 추출물이 첨가된 실험군에서 염색도가 200, 400, 800 µg/ml로 처리한 결과 5.04%, 12.24%, 23.52%으로 용출량이 농도 의존적으로 감소하였으며, 홍맥 추출물이 지방세포의 분화를 억제하는 것을 확

Table 2. Quantification and ORO reduce rate (%) of the stained lipid droplets were performed using the eluted Oil red O stain via measuring absorbance at 490 nm

	Control	MDI	200 µg/ml	400 µg/ml	800 µg/ml
Absorbance (490 nm)	0.335±0.007	0.520±0.003	0.493±0.001	0.456±0.004	0.397±0.004
ORO reduce rate (%)	100.00±0.68%	155.01±0.33%	147.20±0.06%	136.03±0.37%	118.55±0.43%

The OD values of all treatment conditions were compared to the adipogenic control group.

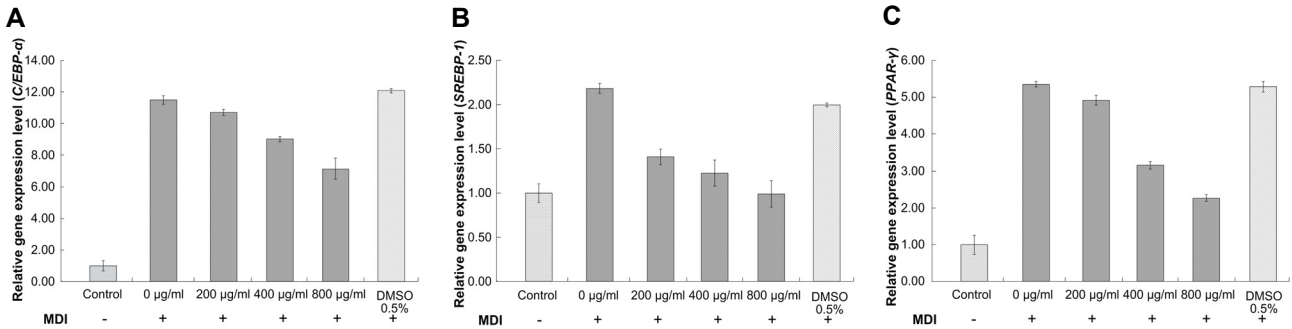


Fig. 4. Gene expression in 3T3-L1 cell depending on effect of red yeast barley (RYB). RT-PCR shows gene expression level of differentiation for adipocyte formation. A: *C/EBP-α*, B: *SREBP-1*, C: *PPAR-γ*. It was analyzed based on GAPDH as housekeeping gene. The data was expressed as mean ± SEM of three different experiments

인하였다(Table 2, Fig. 3). 이를 통해 홍맥 추출물은 세포 생존에 영향을 끼치지 않고 지방 세포 분화만을 억제하며, 홍맥 추출물이 3T3-L1 전지방세포의 지방 축적에 효과가 있음을 확인하였다. 홍국 추출물의 항비만 효과에 대한 연구는 매우 부족한 실정이다. 그러나 2,000 µg/ml의 홍국 추출물을 사용해서 지방세포분화를 약 86% 억제하는 것이 보고되었다 [11]. 또한, *Monascus ruber*로 발효하여 추출한 홍메밀 추출물 100 µg/ml은 약 12% 지방세포분화를 억제할 수 있었다[8]. *Monascus* sp. 발효산물의 기능성 연구는 *Monascus* sp.가 생성하는 천연색소와 monacolin K에 관한 연구가 주를 이루고 있으며 [24, 33], 지방세포분화 억제에 관한 연구는 매우 부족한 실정이며, 본 연구는 *Monascus* sp. 발효산물의 지방분화억제 효과에 관한 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

홍맥 추출물의 adipogenic transcription factor 발현에 미치는 영향은 mRNA level에서 확인하였다. 지방분화유도 물질인 insulin, dexamethasone와 IBMX를 처리하여 지방 분화를 유도할 경우 *C/EBP-α*, *SREBP-1*, *PPAR-γ*의 발현이 증가하게 된다 [7, 20, 28]. 홍맥 추출물이 지방 축적관련 유전자인 *C/EBP-α*, *SREBP-1*, *PPAR-γ* 유전자 발현은 Real-time PCR 분석을 통해 확인하였다. 지방 분화관련 유전자의 발현을 분석한 결과, MDI만 처리한 실험군에 비해 홍맥 추출물이 함께 처리된 실험군에서 홍맥 추출물의 농도가 높아질수록 지방 분화 전사 인자의 발현량이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 4). 특히 지방세포의 형성 및 특이 유전자 발현에 관여하는 *PPAR-γ*의 발현이 크게 감소되는 것으로 보아 지방 세포의 형성 억제능이 있는 것으로 판단된다(Fig. 4C). *C/EBP-α*, *SREBP-1*, *PPAR-γ* 유전자 발현이 농도 의존적으로 감소하

는 결과를 확인할 수 있었으며, 이 결과를 통해 홍맥 추출물은 3T3-L1 전지방세포에 대해 지방 세포 분화 억제 및 지방축적 저해에 효과가 있는 것으로 판단된다.

홍국은 이미 많이 알려진 기능성 식품으로서 다양한 연구가 진행되어 왔을 뿐 아니라 식재료 또는 건강기능식품으로 개발 및 사용되고 있다. 반면에 홍국균을 이용해 보리를 발효하고 홍맥으로서의 쓰임과 그에 대한 연구 및 산업화는 미비한 실정이다. 본 연구는 홍맥 추출물을 세포에 직접 처리하고, 홍맥 추출물에 대한 전지방세포의 지방분화능을 평가한 것에 가치가 있다. 이 연구를 기초로 하여 향후 항비만 활성 성분의 분리 또는 정제, 항비만 작용 기전 분석 등의 연구가 이루어 진다면 보리를 활용한 홍맥의 고부가가치화 및 산업화를 위한 기초자료로서 활용될 수 있을 것이다. 또한, 홍맥과 홍맥 추출물의 다양한 효능과 작용 기전이 검증을 통해 항비만 소재로서 대사증후군 관련 증상 또는 질환의 개선을 위한 기능성 소재로서 활용이 가능할 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 안동대학교 기본연구지원사업에 의하여 연구되었음.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Behall, K. M., Scholfield, D. J. and Hallfrisch, J. 2004. Diets containing barley significantly reduce lipids in mildly hypercholesterolemic men and women. *Am. J. Clin. Nutr.* **80**, 1185-1193.
2. Chawla, A., Schwarz, E. J., Dimaculangan, D. D. and Lazar, M. A. 1994. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* **135**, 798-800.
3. Cho, E. J., Lee, S. S. and Kwon, D. J. 2017. Manufacture technology of tofu shake added with red rice. *Kor. J. Food Preserv.* **24**, 942-948.
4. Choi, B. H., Ahn, I. S., Kim, Y. H., Park, J. W., Lee, S. Y., Hyun, C. K. and Do, M. S. 2006. Berberine reduces the expression of adipogenic enzymes and inflammatory molecules of 3T3-L1 adipocyte. *Exp. Mol. Med.* **38**, 599.
5. Endo, A. 1979. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. *J. Antibiot.* **32**, 852-854.
6. Eun, C. S., Hwang, E. Y., Lee, S. O., Yang, S. A. and Yu, M. H. 2016. Anti-oxidant and anti-inflammatory activities of *Barley sprout* extract. *J. Life Sci.* **26**, 537-544.
7. Gregoire, F. M., Smas, C. M. and Sul, H. S. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* **78**, 783-809.
8. Hong, H., Park, J., Lumbea, W. L. and Hwang, S. G. 2017. *Monascus ruber*-fermented buckwheat (Red yeast buckwheat) suppresses adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J. Med. Food* **20**, 352-359.
9. Huang, C. F., Li, T. C., Lin, C. C., Liu, C. S., Shih, H. C. and Lai, M. M. 2007. Efficacy of *Monascus purpureus* went rice on lowering lipid ratios in hypercholesterolemic patients. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* **14**, 438-440.
10. Jeon, C. P., Lee, J. B., Choi, C. S. and Kwon, G. S. 2011. Physiological effect of Yogurt with powder two stage fermented *Dioscorea batatas* dence by *Monascus* sp. and *Lactobacillus* sp. *Kor. J. Microbiol.* **47**, 151-157.
11. Jeon, T., Hwang, S. G., Hirai, S., Matsui, T., Yano, H., Kawada, T., Lim, B. O. and Park, D. K. 2004. Red yeast rice extracts suppress adipogenesis by down-regulating adipogenic transcription factors and gene expression in 3T3-L1 cells. *Life Sci.* **75**, 3195-3203.
12. Kim, S. O., Kim, M. R., Hwang, K. A., Park, N. J. and Jeong, J. S. 2017. Inhibition of differentiation and anti-adipogenic effect of the *Salvia plebeia* R. Br. ethanol extract in murine adipocytes, 3T3-L1 cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **46**, 401-108.
13. Koutnikova, H. and Auwerx, J. 2001. Regulation of adipocyte differentiation. *Ann. Med.* **33**, 556-561.
14. Lakota, K., Wei, J., Carns, M., Hinchcliff, M., Lee, J., Whitfield, M. L., Sodin-Semrl, S. and Varga, J. 2012. Levels of adiponectin, a marker for PPAR-gamma activity, correlate with skin fibrosis in systemic sclerosis: potential utility as biomarker? *Arthritis Res. Ther.* **14**, R102.
15. Lee, K. S. and Park, G. S. 2014. Studies in the consumption and preference for sprout vegetable. *J. East Asian Soc. Dietary Life* **24**, 896-905.
16. Ma, J., Li, Y., Ye, Q., Li, J., Hua, Y., Ju, D., Zhang, D., Cooper, R. and Chang, M. 2000. Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine. *J. Agr. Food Chem.* **48**, 5220-5225.
17. McNeel, R. L. and Mersmann, H. J. 2003. Effects of isomers of conjugated linoleic acid on porcine adipocyte growth and differentiation. *J. Nutr. Biochem.* **14**, 266-274.
18. Moreno, D. A., Ilic, N., Poulev, A., Brasaemle, D. L., Fried, S. K. and Raskin, I. 2003. Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. *Nutrition* **19**, 876-879.
19. Morrison, R. F. and Farmer, S. R. 2000. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *Nutr. J.* **130**, 3116S-3121S.
20. Ntambi, J. M. and Kim, Y. C. 2000. Adipocyte differentiation and gene expression. *Nutr. J.* **130**, 3122S-3126S.
21. Ono, Y., Hattori, E., Fukaya, Y., Imai, S. and Ohizumi, Y. 2006. Anti-obesity effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.* **106**, 238-244.
22. Park, E. S., Lee, S. M. and Park, K. Y. 2018. *In vitro* anti-obesity effects of Kimchi prepared with solar salts without bitter on 3T3-L1 Adipocytes. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **47**, 229-234.
23. Park, Y. S., Nam, G. H., Jo, K. J., Kawk, H. W., Kim, M. J., Kim, J. T., Jang, S. H., Kim, M. J. and Kim, Y. M. 2020. The anti-obesity effect of *Barley sprout* ethanol extract. *KSBB J.* **35**, 72-77.
24. Patakova, P. 2012. *Monascus* secondary metabolites: production and biological activity. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 169-181.
25. Patel, L., Buckels, A. C., Kinghorn, I. J., Murdock, P. R., Holbrook, J. D., Plumpton, C., Macphee, C. H. and Smith, S. A. 2003. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR γ activators. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 472-476.
26. Poppitt, S. D., Van Druenen, J. D., McGill, A. T., Mulvey, T. B. and Leahy, F. E. 2007. Supplementation of a high-carbohydrate breakfast with barley β -glucan improves postprandial glycaemic response for meals but not beverages. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **16**, 16-24.
27. Reynolds, C. J., Koszewski, N. J., Horst, R. L., Beitz, D. C. and Goff, J. P. 2019. Localization of the 1, 25-dihydroxyvitamin d-mediated response in the intestines of mice. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **186**, 56-60.
28. Rosen, E. D. and MacDougald, O. A. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 885.
29. Rosen, E. D. and Spiegelman, B. M. 2000. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 145-171.
30. Sargent, J. M. and Taylor, C. G. 1989. Appraisal of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukaemia. *Br. J. Cancer* **60**, 206-210.
31. Sferrazzo, G., Palmeri, R., Vanella, L., Parafati, L., Ronsisvalle, S., Biondi, A., Basile, F., Li Volti, G. and Barbagallo, I. 2019. *Mangifera indica* L. leaf extract induces adiponectin and regulates adipogenesis. *Int. J. Mol.* **20**, 3211.

32. Shimizu, C., Kihara, M., Aoe, S., Araki, S., Ito, K., Hayashi, K., Watari, J., Sakata, Y. and Ikegami, S. 2008. Effect of high beta-glucan barley on serum cholesterol concentrations and visceral fat area in Japanese men—a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Plant Foods Hum. Nutr.* **63**, 21-25.
33. Srianta, I., Ristiari, S., Nugraha, I., Sen, S. K., Zhang, B. B., Xu, G. R. and Blanc, P. J. 2014. Recent research and development of *Monascus* fermentation products. *Int. Food Res. J.* **21**, 1-12.
34. Tsukahara, M., Shinzato, N., Tamaki, Y., Namihira, T. and Matsui, T. 2009. Red yeast rice fermentation by selected *Monascus* sp. with deep-red color, lovastatin production but no citrinin, and effect of temperature-shift cultivation on lovastatin production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **158**, 476-482.
35. Tu, T. H., Kim, C. S., Nam Goong, I. S., Nam, C. W., Kim, Y. I., Goto, T., Kawada, T., Park, T., Yoon Park, J. H., Ryoo, Z. Y., Park, J. W. Choi, H. S. and Yu, R. 2015. 4-1BBL signaling promotes cell proliferation through reprogramming of glucose metabolism in monocytes/macrophages. *FEBS J.* **282**, 1468-1480.

초록 : 홍맥 추출물의 3T3-L1세포에 대한 지방 축적 저해 활성평가

권기석¹ · 김병혁² · 이준형^{1,2} · 황학수² · 이중복^{2*}

(¹국립안동대학교 생명과학대학 원예생약융합학부, ²교촌에프앤비(주) 교촌중앙연구소)

홍국은 동아시아 국가에서 예로부터 음식과 전통의학에 이용되어 왔다. 홍국은 특정 미생물(일반적으로 *Monascus purpureus*)이 쌀을 발효시켜 생산되어진다. *Monascus* sp.는 2차 대사과정을 통해 *Monascus* 색소, monacolins, γ -aminobutyric acid 등을 생산할 수 있다. *Monascus* 종의 대사산물인 monacolin K, γ -aminobutyric acid와 dimethylglutamic acid 및 monascus pigments는 항산화 효과, 콜레스테롤과 혈압과 항비만 효과들이 알려져 있다. 본 연구에서는 *Monascus* sp.로 발효된 홍맥 에탄올 추출물의 항비만 활성을 알아보고자 지방 세포를 이용하여 실험을 실시하였다. 홍맥 에탄올 추출물의 항비만 효과는 MDI로 유도된 3T3-L1 전지방세포의 Oil Red O staining과 Real time RT-PCR을 이용하여 비만 유전자 발현을 통해 확인하였다. 홍맥 추출물을 3T3-L1 전지방세포에 각각 200 μ g/ml, 400 μ g/ml, 800 μ g/ml을 처리한 결과 5.04%, 12.24%, 23.52%로 지방축적을 감소시키는 것을 확인하였다. 또한, 홍맥 추출물은 3T3-L1 전지방세포로부터의 *C/EBP α* , *SREBP-1*, *PPAR- γ* 유전자의 발현이 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인하였다. 본 연구를 통해 홍맥 추출물의 지방 합성 억제활성을 확인하였으며, 향후 항비만 기능성 식품소재로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.