

석사학위논문

3T3-L1 세포에서 산귤 (*Citrus sunki* Hort. ex Tanaka) 과피 유래 polymethoxyflavones이 지방대사에 미치는 영향

제주대학교 대학원

생명과학과

김 무 한

2010년 2월

3T3-L1 세포에서 산귤 (*Citrus sunki* Hort. ex Tanaka) 과피 유래 polymethoxyflavones이 지방대사에 미치는 영향

지도교수 김 세 재

김 무 한

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2010년 2월

김무한의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장	_____	Ⓜ
위 원	_____	Ⓜ
위 원	_____	Ⓜ

제주대학교 대학원

2010년 2월

Effects of polymethoxyflavones (PMFs) derived  
from *Citrus sunki* Hort. ex Tanaka on lipid  
metabolism in 3T3-L1 cells

Moo-Han Kim  
(Supervised by Professor Se-Jae Kim)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for  
the degree of Master of Science

2010. 2

This thesis has been examined and approved

\_\_\_\_\_  
Thesis director, Duck-Chul Oh, Prof. of Biology

\_\_\_\_\_  
(Name and signature)

\_\_\_\_\_  
Date

Department of Life Science  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

## ABSTRACT

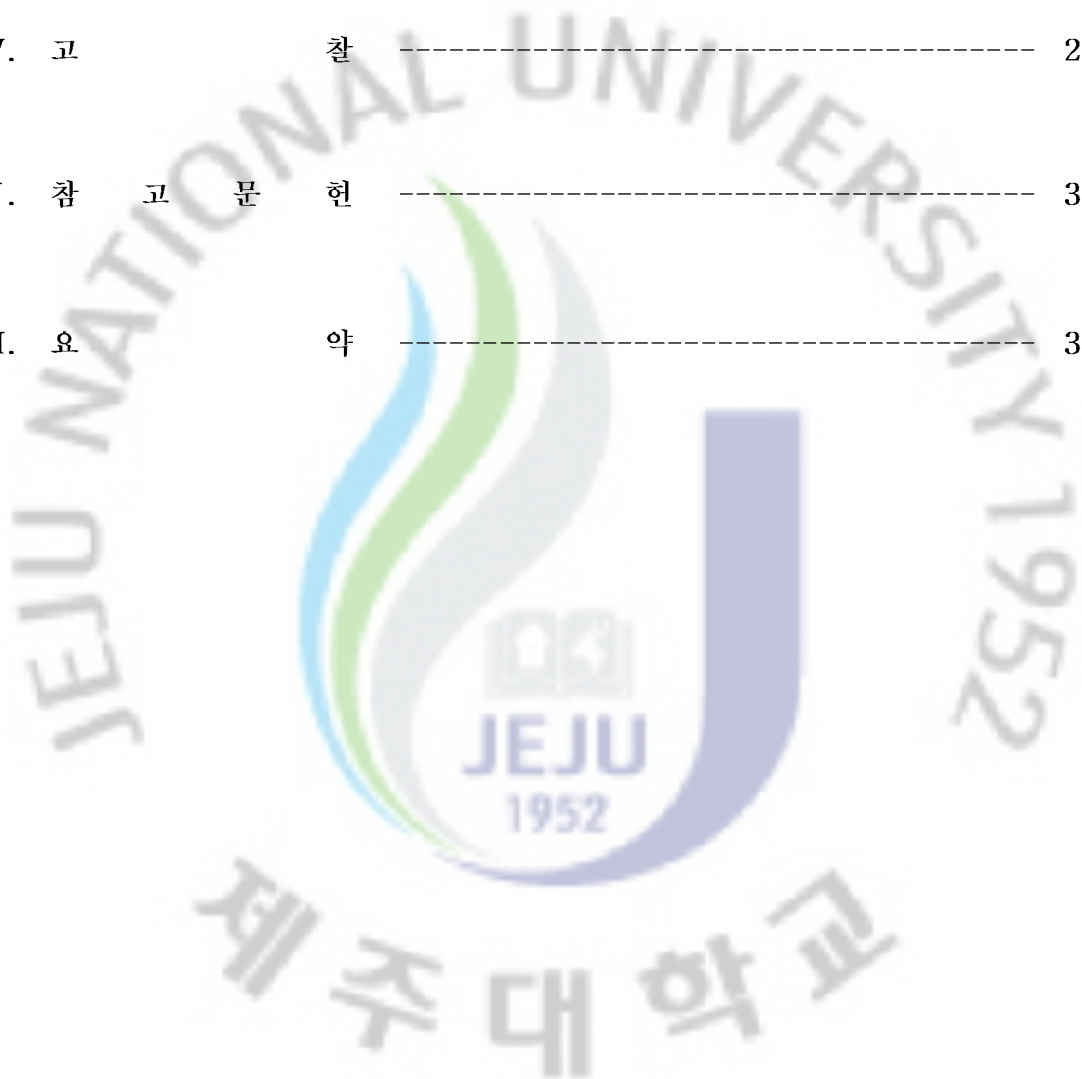
The peel of *Citrus sunki* Hort. ex Tanaka, which contains various kinds of alkaloids and flavonoids, has been used in traditional Korean medicine for centuries. Especially, polymethoxyflavones (PMFs) are characteristic of citrus plant, exhibit a broad spectrum of biological activities. In order to evaluate the availability of citrus PMFs in preventing the metabolic disorders, we investigated the modulating effects of lipid metabolism in 3T3-L1 cells by PMFs derived from *C. sunki* peel. First of all, we investigated the effects of PMFs on lipolysis in fully differentiated adipocytes. PMFs increased dose-dependently the lipolysis in mature adipocytes. In line with their lipolytic activities, the phosphorylation of cAMP dependent protein kinase (PKA) and hormone sensitive lipase (HSL) were increased dose-dependently by PMFs. Secondary, the effects of PMFs on the adipocyte differentiation were evaluated using 3T3-L1 pre-adipocytes. Treatment with PMFs instead of 3-isobutyl-1-methoxyxanthine (IBMX) promoted dose-dependent accumulation of lipid droplet during the differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes. Furthermore, the expressions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ), adipocyte fatty acid binding protein (aP2), and adipokines such as adiponectin and resistin were increased dose-dependently by PMFs treatment in the absence of 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX). Then, we confirmed that PMFs potentiated the activation of cAMP dependent protein kinase (PKA), which is acting as an early stage signal in adipocyte differentiation. These results suggest that lipolytic and lipogenic effects by PMFs in 3T3-L1 cells are exerted through activation of signaling cascades mediated by cAMP.

Key word : flavonoids, polymethoxyflavones, 3T3-L1 cells, differentiation, lipolysis, aP2, PPAR $\gamma$ , PKA, HSL

## 목 차

A B S T R A C T	-----	1
목 차	-----	2
LIST OF TABLE	-----	4
LIST OF FIGURES	-----	5
I. 서 론	-----	6
II. 재 료 및 방 법	-----	10
1. 시료 및 추출	-----	10
2. 세포 배양	-----	10
3. LDH 분석	-----	10
4. 분화 유도	-----	11
5. Oil Red O 염색	-----	12
6. Free glycerol 함량 측정	-----	12
7. Western blot	-----	13
8. RNA 분리 및 Real time-PCR	-----	13
9. 면역 형광 염색	-----	16
10. 통계처리	-----	16

III. 결	과	-----	17
1.	지방세포에서 PMFs에 의한 지방분해(lipolysis) 촉진 활성	-----	17
2.	전구지방세포에서 PMFs에 지방합성(lipogenesis) 촉진 활성	-----	23
IV. 고	찰	-----	29
V. 참	고 문 헌	-----	32
VI. 요	약	-----	38



## LIST OF TABLES

Table 1. The primer sequences of the genes used in real time-PCR -----	15
---	----



## LIST OF FIGURES

Figure 1. Chemical structure of the PMFs -----	9
Figure 2. Effects of PMFs on lipolysis of differentiated adipocytes -----	18
Figure 3. PMFs stimulate lipolysis -----	19
Figure 4. Effect of PMFs on the cytotoxicity of differentiated adipocyte -----	20
Figure 5. PMFs stimulate phosphorylation of PKA and HSL -----	21
Figure 6. Intracellular distribution of phospho-HSL in 3T3-L1 adipocytes -----	22
Figure 7. Effect of PMFs on the cytotoxicity of 3T3-L1 preadipocyte -----	24
Figure 8. Effects of PMFs on lipid accumulation of 3T3-L1 cells during adipocyte differentiation in absence of IBMX -----	25
Figure 9. Western blot analysis of PPAR $\gamma$ and aP2 in 3T3-L1 cells treated with PMFs -----	26
Figure 10. Effects of PMFs on adipokine gene expression -----	27
Figure 11. PMFs stimulate upstream signaling of PPAR $\gamma$ -----	28



## I. 서 론

고등동물에서 백색지방조직 (white adipose tissue)은 에너지 항상성을 유지해 주는 역할을 하지만 과잉 생성되면 비만으로 발달하게 되어 제 2형 당뇨병 (non-insulin dependent diabetes mellitus)과 고혈압, 동맥경화 같은 심장 질환의 주요 원인으로 작용한다 (Must *et al.*, 1999). 비만과 제 2형 당뇨병 연구에는 3T3-L1 전구지방세포 (preadipocyte)가 널리 사용되고 있다. 3T3-L1 전구지방세포는 confluence 상태에 이르면 세포 분열을 정지하고 mitotic clonal expansion을 형성하여 지방 조직 분화에 필요한 유전자들을 발현한다 (Tang *et al.*, 2003). 3T3-L1 전구지방세포는 우태아혈청 (Fetal bovine Serum)이 있는 조건에서도 자연적인 분화가 일어나지만, 배지에 인슐린, dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)을 처리해주면 지방세포 분화가 현저하게 촉진된다 (MacDougald *et al.*, 1995; Gregoire *et al.*, 1998 ; Cowherd *et al.*, 1999). 전구지방세포에서 지방세포로의 분화유도는 지방산과 프로스타글란딘과 같은 리간드가 peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)  $\gamma$ 에 결합하고, glucocorticoids와 같은 호르몬이 CCAAT/Enhancer binding protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ )와 C/EBP $\delta$  에 작용하게 됨으로서 시작되며 인슐린은 인슐린 수용체에 의해 매개되는 Ras-MAPK (mitogen-activated protein kinase) 신호전달 경로를 거쳐 전구지방세포를 지방세포로 분화되도록 작용한다 (Smith *et al.*, 1988). 세포신호 전달 과정에서 extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2)는 extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK1)에 의해 타이로신 잔기와 트레오닌 잔기가 인산화 되어 활성화되며, 활성화된 ERK 1/2는 하류 전사인자들의 활성을 조절함으로써 세포 증식, 세포 분화에 관여한다고 알려져 있다 (Ceresa and Pessin, 1998). 여러 인자들 중 C/EBP $\beta$  와 C/EBP $\delta$ 가 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$  의 발현에 관여한다고 알려져 있으며, 이렇게 발현된 C/EBP $\alpha$  와 PPAR $\gamma$  는 지방세포로 분화에 필요한 유전자들의 전사활성을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Cowherd *et al.*, 1999).

한편, 체지방조직 (백색지방세포, 갈색지방세포), 심근조직 및 골격근에 주로 존재하는 hormone sensitive lipase (HSL)는 저장된 중성지질 (triacylglycerol)의 가수분해에 관여하여 체지방량과 체중조절에 중요한 역할을 한다 (Masuno and Okuda,

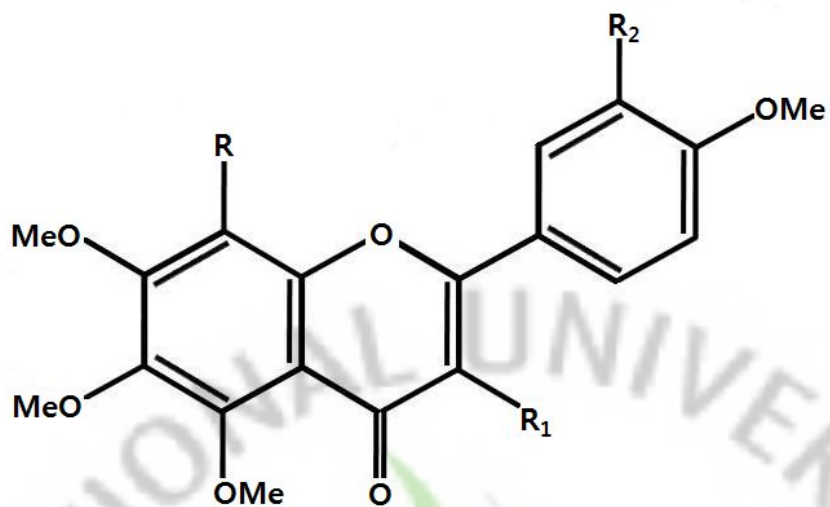
1995; Inoue *et al.*, 1999). 3T3-L1 지방세포에서 HSL은 고농도의 포도당 존재 하에서 인슐린에 의해 발현이 유도된다 (O'Rourke *et al.*, 2002). HSL의 지질분해 능력은 세포내에서 adenylyl cyclase (AC)와 cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE)의 작용으로 세포내 cAMP 농도가 높아지면 cAMP dependent protein kinase (PKA)가 활성화되는 경로에 의해 매개된다. 활성화된 PKA는 HSL의 Ser563, Ser659 그리고 Ser660 잔기의 인산화를 촉진하여 HSL 활성화를 유도한다고 알려져 있다 (Degerman *et al.*, 1990; Anthonsen *et al.*, 1998). 이에 반하여, cAMP-activated protein kinase (AMPK)는 HSL의 Ser565 잔기를 인산화시킴으로써 PKA에 의해 Ser563 잔기가 인산화된 HSL의 활성을 감소시킨다 (Watt *et al.*, 2006). 최근에는 ERK 1/2에 의한 HSL의 Ser600 잔기의 인산화 또한 HSL 효소 활성을 증강시키는 것으로 보고되었다 (Greenberg *et al.*, 2001). 활성화된 HSL은 지방소적에 함유되어 있는 중성지질을 가수분해하여 2분자의 자유지방산 (Free fatty acid, FFA)을 방출하며, 방출된 monoacylglycerol은 monoacylglycerol lipase (MGL)에 의해 1분자의 FFA와 1분자의 글리세롤로 분해된다 (Langin *et al.*, 1996).

감귤류(citrus plants)의 과피에는 알카로이드류와 플라보노이드류 [flavanone, flavonol, isoflavone, catechin, polymethoxyflavones (PMFs)] 등이 함유되어 있으며 (Mouly *et al.*, 1994 ; Rouseff *et al.*, 1987), 이러한 phytochemicals 들의 작용으로 감귤류 과피는 항염 작용 및 설사 억제효능 (Francis *et al.*, 1989; Guengerich and Kim, 1990), 항알러지 작용 (Chung *et al.*, 2000), 항염증 작용 (Choi *et al.*, 2007) 등과 같은 다양한 생리활성들을 나타낸다고 알려지고 있다. 특히, 감귤류에만 존재하는 PMFs는 산소를 함유한 피론 (pyrone) 고리로 연결된 2개의 벤젠 (benzene) 고리를 가지고 있으며 (Green *et al.*, 2007), 이 기본 골격에 메톡시 (CH<sub>3</sub>O)가 결합한 수와 위치에 따라서 nobiletin, heptamethoxyflavone, tangeretin 등으로 나뉜다 (Figure 1). PMFs는 세포 성장, 항암작용 (Kuo *et al.*, 1996), 심혈관질환 개선 효과, 항염효과 (Garcia and Castillo, 2008; Choi *et al.*, 2007) 등과 같은 활성들을 가진다고 보고된 바 있어 감귤 종에 따른 PMFs의 함량은 감귤류의 생리활성에 매우 중요한 요소로 평가되고 있다.

제주 재래귤인 산귤 (혹은 진귤이라고 부름; *Citrus sunki* Hort. ex Tanaka)은 “산물”이라 불리며 (Kim, 1988), 그 과피를 건조시킨 진피는 예로부터 전통한의학에서 약재로 사용하여 왔다. 본 연구는 PMFs를 다량 함유하고 있는 산귤 과피가 지

질대사 개선 소재로서의 활용가능성을 평가하기 위한 일환으로서 3T3-L1 세포에서 PMFs가 지질대사에 미치는 영향을 분자생물학적으로 분석하였다.





	R	R1	R2
Sinensetin	H	H	MeO
Nobiletin	MeO	H	MeO
Heptamethoxyflavone	MeO	MeO	MeO
Tetramethylscutellarein	H	H	H
Tangeretin	MeO	H	H
Hexamethyl- $\sigma$ -quercetagenin	H	MeO	MeO

Figure 1. Chemical structure of the PMFs

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료 및 추출

본 연구에 사용된 산귤(*Citrus sunki* Hort. ex Tanaka)은 2008년 1월말 제주특별자치도 서귀포시 효돈동에 위치한 EM Life 영농조합 법인으로부터 제공 받았다. 실험에 사용한 PMFs는 Ko 등 (2009, unpublished data)의 방법에 따라 분리하였다. 간략하게 설명하면, 산귤에서 과피를 분리하여 3일 간 동결 건조한 후 분쇄하였다. 분쇄된 과피는 3일간 열수 추출한 후 여과된 추출액을 회전 감압 농축기로 농축하였다. 농축시킨 시료는 증류수에 현탁하여 핵산과 1:1 비율로 혼합하여 용매 분획하였다. 용매 분획한 상층액은 회전 감압 농축기로 농축한 후 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

### 2. 세포 배양

Mouse 3T3-L1 전구지방세포주는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하였다. 세포배양은 10% bovine calf serum (BCS; Gibco, USA)과 1% penicillin/streptomycin (P/S; Gibco, USA)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 수행하였다. 세포는 T-75 cell culture flask 바닥에 세포가 70% 정도 찼을 때 계대 배양하여 유지하였다.

### 3. 세포독성 평가를 위한 LDH 분석

세포독성분석을 위한 LDH 분석은 LDH 측정 kit (LDH Cytotoxicity Detection Kit; TaKaRa, Japan)를 사용하여 수행하였다. 3T3-L1 전구지방세포 (8.0×10<sup>3</sup> cells/well)를 96 well cell culture plate에서 24시간 배양한 후, 배지에 PMFs (3.125, 6.25, 12.5, 25 및 50 µg/mL)를 처리하여 72 시간 동안 더 배양하였다. 배양이 끝난 후 배양액 50 µL에 LDH 측정 혼합액 50 µL를 넣고 반응시킨 후, HCl (최종 0.2 N)를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 micro reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군은 세포에 Triton X-100 (Sigma, USA) 용액을 최종 1%가 되도록 처리한 세포 배양액을 사용하였다. PMFs의 독성 분석은 3회 반복 실험하였으며 아

래 식에 의해 산출된 평균값으로 나타내었다.

$$\text{세포독성률 (\%)} = 100 \times (A_{\text{sample}} - A_{\text{lower control}}) / (A_{\text{upper control}} - A_{\text{lower control}})$$

$A_{\text{sample}}$  = 시료를 첨가한 배지의 흡광도

$A_{\text{lower control}}$  = 시료를 첨가하지 않은 배지의 흡광도

$A_{\text{upper control}}$  = Triton X-100을 첨가한 배지의 흡광도

#### 4. 분화 유도

지방세포로 분화 유도는 Harmon and Harp (2001)과 Prusty 등 (2002)의 방법을 변형하여 수행하였다. 3T3-L1 전구세포를 10% BCS와 1% P/S가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 6 well cell culture plate ( $2.0 \times 10^5$  cells/well)에 접종하고 48시간 동안 배양하여 pre-confluent 상태가 되도록 하였다. Pre-confluent 상태에서 배지를 한 번 더 교환하여 48시간을 더 배양하였다. Confluent 상태 (분화유도 0일째)에서 배양액을 분화유도 배지[10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, USA), 1% P/S, 1  $\mu\text{mol/L}$  dexamethasone (DEX; Sigma, USA), 0.5 mmol/L 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX; Sigma, USA) 및 5  $\mu\text{g/mL}$  인슐린 (Sigma, USA)이 함유된 DMEM 배지]로 교환하여 2일간 (분화유도 2일째) 분화 유도하였다. 지방세포 분화에 미치는 PMFs의 영향은 이때 PMFs (10, 20 및 40  $\mu\text{g/mL}$ )을 분화유도배지에 첨가하여 분석하였다. 분화유도 2일 후에 세포 배양액을 PMFs, 10% FBS, 1% P/S 및 5  $\mu\text{g/mL}$  인슐린이 포함된 DMEM 배지로 교환하였고, 분화유도 4일째부터는 세포 배양액을 10% FBS와 1% P/S가 포함된 DMEM 배지로 2일 마다 교환하였다. 그리고 PMFs의 세포내 cAMP에 미치는 영향을 관찰하기 위한 전구지방세포의 분화유도는 IBMX가 제외된 분화유도 배지를 이용하여 상기한 조건과 동일하게 수행하였다.

PMFs의 지방분해 능 및 HSL 그리고 PKA 단백질의 인산화에 미치는 영향을 분석하기 위한 분화유도를 다음과 같이 수행하였다. Confluent 상태 (분화유도 0일째)의 세포를 10% FBS, 1% P/S, 1  $\mu\text{mol/L}$  DEX, 0.5 mmol/L IBMX 및 5  $\mu\text{g/mL}$  인슐린이 포함된 DMEM 배지에서 2일간 분화유도 하였다. 분화유도 2일 후 배지를 10% FBS, 1% P/S 및 5  $\mu\text{g/mL}$  인슐린이 포함된 DMEM 배지로 교환해주고, 다시

2일 후 (분화유도 4일째) 부터는 실험에 사용된 때까지 2일 마다 10% FBS와 1% P/S가 포함된 DMEM 배지로 교환하였다. 분화유도 8-10일째에 배양용기에서 배지를 제거하고 Oil Red O 염색을 하기위한 세포는 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에 PMFs를 농도별 (10, 20 및 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )처리 하였고, HSL의 인산화를 확인하기 위한 것은 세포는 phosphate-buffered saline (PBS)으로 2번 세척한 후 DMEM 배지로 교환하여 4시간 배양한 후 PMFs (10, 20 및 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 처리하였다.

## 5. Oil Red O 염색

Oil Red O 염색 및 정량 분석은 Cho 등 (2003)의 방법으로 수행하였다. 분화유도 7-9일째 된 세포를 PBS로 1회 세척하고 10% formalin [37% formaldehyde solution (Sigma, USA) 1/10으로 희석]으로 1시간 동안 고정한 후, 증류수로 2회 세척하였다. 그리고 Oil Red O 염색액은 isopropanol (Merck, Germany)로 희석한 0.6% Oil Red O (Sigma, USA)와 증류수를 6:4로 희석한 후 여과하여 제조하였다. 세척된 세포는 Oil Red O 염색액으로 1시간 동안 염색한 후 증류수로 3회 세척하여 현미경 하에서 관찰하였다. 염색된 지방소적의 중성지방의 함량을 정량하기 위해서 4% NP-40 (Amresco, USA)이 포함된 isopropanol를 첨가하여 Oil Red O를 다시 용해시킨 후 micro reader로 520nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 6. Free glycerol 함량 측정

Free glycerol 함량은 free glycerol reagent kit (Sigma, USA)를 사용하여 측정하였다. 3T3-L1 전구 지방세포를 분화유도 방법에 따라 8일간 배양하여 분화시킨 후, PMFs를 24시간 동안 농도별 (2.5, 10 그리고 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 처리하였다. 이후 배양액 10  $\mu\text{L}$ 에 free glycerol 측정 혼합액 0.8ml를 넣고 10분간 30°C에서 반응시켰고 micro reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Free glycerol 비율은 대조군 대비 % 값으로 계산 하였고 3회 반복 실험하였다.

## 7. Western Blot 분석

Western blot 분석을 위한 단백질은 지방세포를 PBS로 2회 세척 후 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mmol/L NaF, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aprotinin, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pepstatin 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  leupeptin 및 10% RIPA lysis buffer (Upstate Biotechnology, USA)를 함유하고 있는 단백질 분리 시약을 이용해 1시간 동안 분해시킨 후 원심분리 (15000 rpm, 4°C, 20분)하여 상층액으로 획득하였다. 단백질 농도는 Bio-rad protein assay kit (Bio-rad, USA)를 사용하여 micro reader로 595nm에서 흡광도를 측정하고 정량하였다. 단백질(40  $\mu\text{g}$ )은 10% (PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , phospho-HSL,  $\beta$ -actin) 혹은 15%(A-FABP) SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동으로 분리한 후 poly vinylidene difluoride (PVDF) membrane (Milipore, USA)에 전이 (200mA, 180분)시켰다. 단백질이 전이된 PVDF membrane은 상온에서 1시간 동안 5% skim milk로 blocking 시킨 후, 1차 항체와 반응시켰다. 1차 항체 반응은 PPAR $\gamma$  antibody (1:500, Santa Cruz, USA), C/EBP $\alpha$  antibody (1:2,000, Santa Cruz, USA), A-FABP antibody (aP2; 1:5,000, Santa Cruz, USA), phospho-HSL (Ser660) antibody (1:2,000, Cell Signaling, USA),  $\beta$ -actin antibody clone AC-74 (1:10,000, Sigma, USA)를 이용하여 4°C에서 하루 밤 동안 수행하였다. 1차 항체 반응이 끝난 PVDF membrane은 0.05% Tween 20이 포함된 Tris buffered saline (TBS-T) 용액으로 4회 세척한 후 peroxidase-conjugated된 2차 항체 (Jackson ImmunoResearch, USA)를 1:2,000, 1:5,000 혹은 1:10,000으로 희석하여 1시간동안 반응한 후 TBS-T로 4회 세척하였다. 각 단백질의 발현양은 WEST-ZOL western blot detection system (iNtRON Biotechnology, Korea)로 반응시켜서 X-ray 필름 (Ortho CP-G plus; Agfa Gevaert N.V., Belgium)으로 검출하여, Image J 1.42q (National Institutes of Health, USA)로 분석한 후  $\beta$ -actin에 대한 발현량으로 보정하여 정량화 하였다.

## 8. RNA 분리 및 Real time-PCR

Real time-PCR 분석을 위한 total RNA는 분화유도 8일째 된 세포를 사용하여 분리하였다. Trizol Reagent (Invitrogen, USA)를 첨가하여 세포를 균질화한 후, 여기에 chloroform을 첨가하여 원심분리 (15,000  $\times$  g, 15분)하였다. 상층액을 회수하여 동량의 isopropanol을 첨가하여 원심분리 (15,000  $\times$  g, 15분)하여 RNA를 침전시켰



다. 침전된 RNA는 70% 에탄올로 세척한 후, 건조시켜 DEPC 처리된 증류수에 용해시킨 후 260nm의 흡광도를 측정하여 정량하였다. A260 / A280nm 의 비율이 1.6-2.0 범위 내의 값을 갖는 RNA 시료를 실험에 사용하였다.

cDNA는 Maxime RT PreMix Kit (iNtRON Biotechnology, Korea)를 이용하여 합성하였다. 1  $\mu$ g total RNA와 DEPC 처리된 증류수를 총 20  $\mu$ L를 kit에 넣고 45 $^{\circ}$ C 60분, 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응하여 cDNA를 합성한 후 여기에 30  $\mu$ L의 DEPC 처리된 증류수를 첨가하였다.

Real time polymerase chain reaction (PCR)은 1  $\mu$ L의 cDNA, 각 primer는 1  $\mu$ L (10 pmol/L/ $\mu$ L)씩, 2 $\mu$ L DEPC-증류수 와 5  $\mu$ L iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix (Bio-rad, USA)를 혼합한 후 Peltier thermal cycler (Bio-rad, USA) real time PCR 기기를 이용하여 수행하였다. PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C/20초, 65 $^{\circ}$ C/20초, 72 $^{\circ}$ C/30초로 하여 44회 증폭하였고 결과는 1회 증폭할 때 마다 흡광도로 측정하였다. 결과 분석은 Chromo4 Real-Time PCR Detection System v1.10 (Bio-rad, USA)을 이용하여  $\beta$ -actin 대비 상대적 값으로 정량하였다.

Table 1. The primer sequences of the genes used in real time-PCR analysis

Gene		Primer sequence
Adiponectin	Forward	5'-GAC CTG GCC ACT TTC TCC TC-3'
	Reverse	5'-GTC ATC TTC GGC ATG ACT GG-3'
Resistin	Forward	5'-AAG TCC TCT GCC ACG TAC CC-3'
	Reverse	5'-GCT TCA TCG ATG GGA CAC AG-3'
$\beta$ -actin	Forward	5'-AGG CTG TGC TGT CCC TGT AT-3'
	Reverse	5'-ACC CAA GAA GGA AGG CTG GA-3'



## 9. 면역형광염색법

면역형광염색을 위해 지방세포를 PBS로 1회 세척하고 10% formailin으로 실온에서 15분간 고정 후, MeOH로 -20℃에서 10분간 세포 투과성을 높였다. 그리고 PBS로 5분간 세척한 후, blocking solution (PBS, 0.1% BSA, 0.3% Triton-X100)으로 60분간 blocking 하였다. 그 후 blocking solution을 제거하고 phospho-HSL(Ser 660) antibody를 antibody dilution buffer (PBS, 1% BSA, 0.3% Triton-X100)에 1:800 으로 희석하여 4℃에서 하루 밤 동안 반응하였다. 1차 항체 반응이 끝나면 PBS로 5분씩 3회 세척하였고 anti rabbit-FITC (Santa Cruz, USA) secondary antibody를 antibody dilution buffer에 1:1,000으로 희석한 후 실온에서 2시간 처리하였다. 반응이 끝난 세포는 PBS로 5분씩 3회 세척하여 공초점레이저스캐닝현미경 (Olympus, Japan)으로 결과를 검경하였다.

## 10. 통계처리

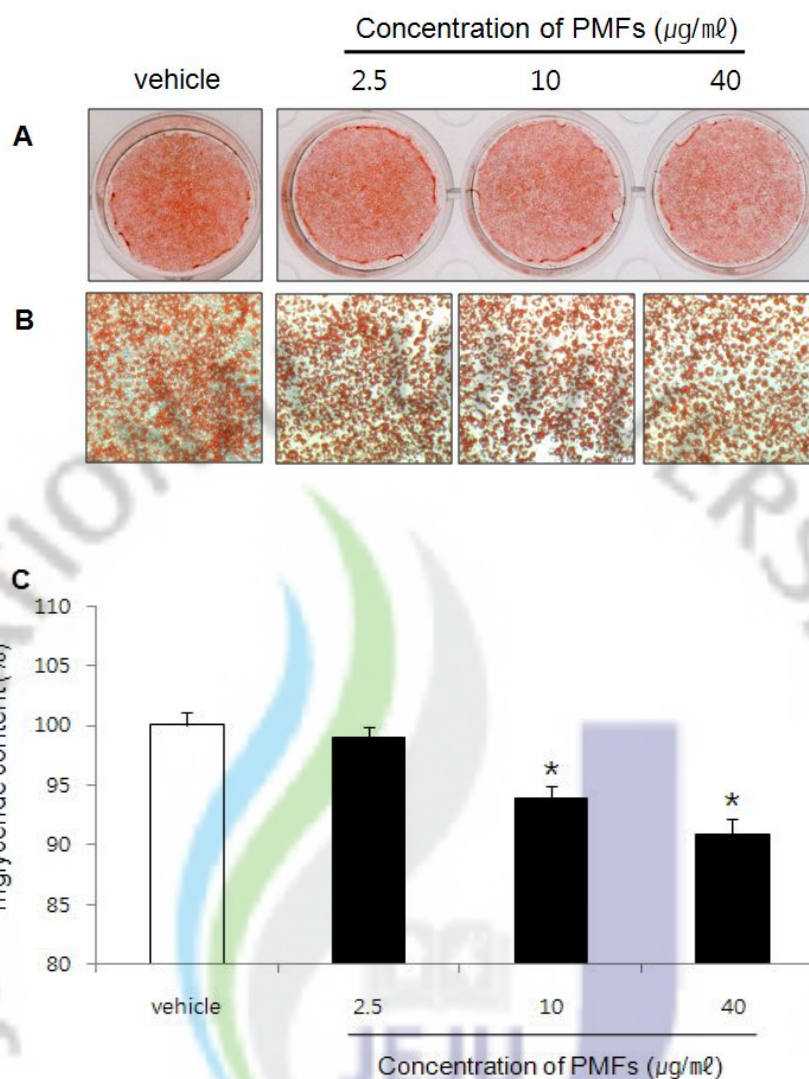
*In vitro* 실험결과는 평균±표준편차로 나타냈으며 student's t-test로 유의성을 검정하였다.

### III. 결 과

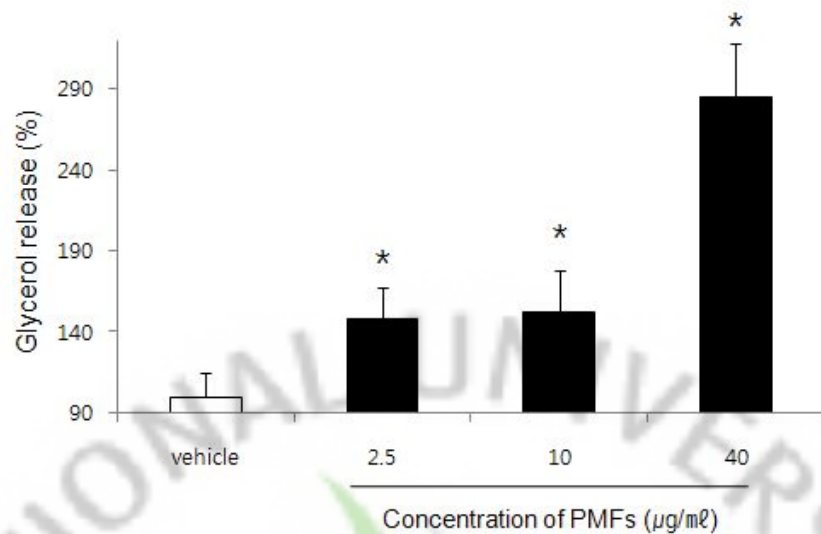
#### 1. 지방세포에서 PMFs에 의한 지방분해(lipolysis) 촉진

분화된 3T3-L1 지방세포에 축적된 지방 분해에 미치는 PMFs의 영향을 알아보기 위하여 3T3-L1 전구지방세포에 분화유도 물질을 처리하여 육안으로 관찰하여 약 90%이상 분화가 일어나도록 유도하였다. 이렇게 분화가 완성된 지방세포에 PMFs를 처리한 후 지방소적 분해에 미치는 PMFs의 영향을 Oil Red O 염색법으로 관찰하였다 (Figure 2). Figure 2에서 보여주는 바와 같이 PMFs를 처리하지 않은 대조군에 비해 PMFs를 처리한 군에서는 축적된 지방소적이 농도 의존적으로 감소되었다. 그리고 현미경 관찰시 지방소적이 크기가 농도 의존적으로 줄어들음을 확인할 수 있었다 (Figure 2A, B). 지방소적의 염색 강도를 정량한 결과, PMFs를 처리하지 않은 대조군 (100%)에 비해 PMFs를 2.5, 10 및 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 군에서는 각각 98.9, 93.8 및 90.9%의 값을 나타내었다 (Figure 2D). 또한 실제 분해된 중성지질이 지방산과 글리세롤로 가수 분해되어 세포 밖으로 방출되었는지 확인하기 위해 배지 내 글리세롤 방출량을 측정하였다. 배지 내 방출된 글리세롤의 양을 측정한 결과, PMFs를 처리 하지 않은 대조군 (100%)에 비해 PMFs를 2.5, 10 및 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 군에서는 각각 147.8, 152.1 및 284.8%의 값을 나타내었다 (Figure 3). PMFs에 의한 이러한 지방분해 활성이 지방세포에 대한 독성 작용에 의하여 나타나는 것인지 확인 하기위해 LDH 분석법으로 세포독성을 조사하였다. PMFs를 각 농도별로 처리한 세포 배양액을 획득하여 LDH 분석을 한 결과, PMFs를 처리하지 않은 대조군 (0%)에 비해 PMFs를 2.5, 10 및 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 군에서 세포 독성률은 0 - 1.7% 수준으로 실험에 사용한 최고농도 (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )까지는 세포 독성이 없는 것으로 나타났다 (Figure 4).

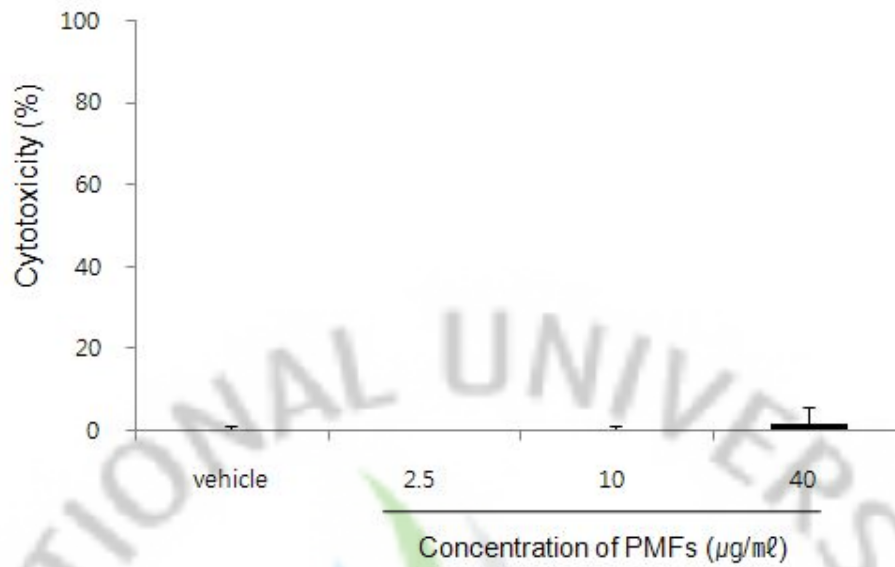
PMFs에 의한 지방분해 활성을 분자수준에서 확인하기 위하여 지질분해 효소인 HSL와 상위 조절인자인 PKA의 인산화에 미치는 영향을 Western blot 분석으로 분석하였다. 분화된 지방세포에 30분간 PMFs를 처리한 결과, 양성대조군에 비해 PMFs를 처리한 세포에서 PKA와 HSL 모두 활성화되는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 5). Figure 6에서 보여주는 바와 같이 HSL의 인산화는 면역형광염색법으로 명확하게 확인할 수 있었다.



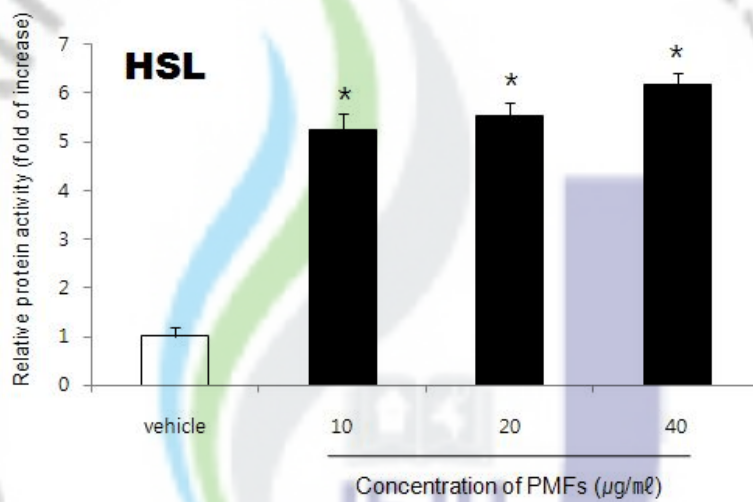
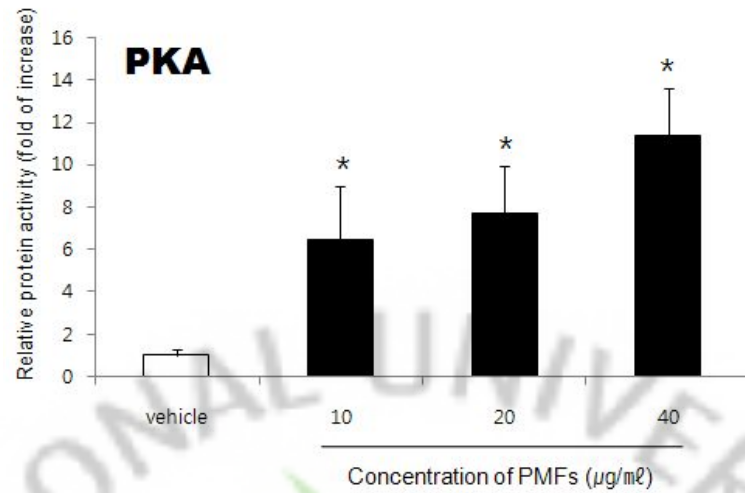
**Figure 2. Effects of PMFs on lipolysis of differentiated adipocytes.** 3T3-L1 cells were differentiated in the presence of MDI differentiation medium for 8 days. After then, differentiated adipocytes were treated with 10% FBS contained DMEM and PMFs for 2 days. (A) Macroscopic pictures of stained cells. (B) Microscopic pictures (magnification, 200 $\times$ ) of stained cells. (C) Triglyceride contents. Lipid accumulation was assessed by the quantification of OD<sub>520</sub> as described in Materials and Method. Vehicle (DMSO), positive control. The mean values of the results are shown with the SD (n = 3). The data shown are representative of three experiments. \* $p < 0.05$ .



**Figure 3. PMFs stimulates lipolysis.** Differentiated 3T3-L1 adipocytes were treated with PMFs at indicated concentrations (2.5, 10 and 40 µg/mL). Then glycerol released in medium was measured at 48 hour after stimulation. Data were presented as the relative ratio of glycerol content in control (vehicle, DMSO). The mean values of the results are shown with the SD (n = 3). The data shown are representative of three experiments. \* $p < 0.05$ .

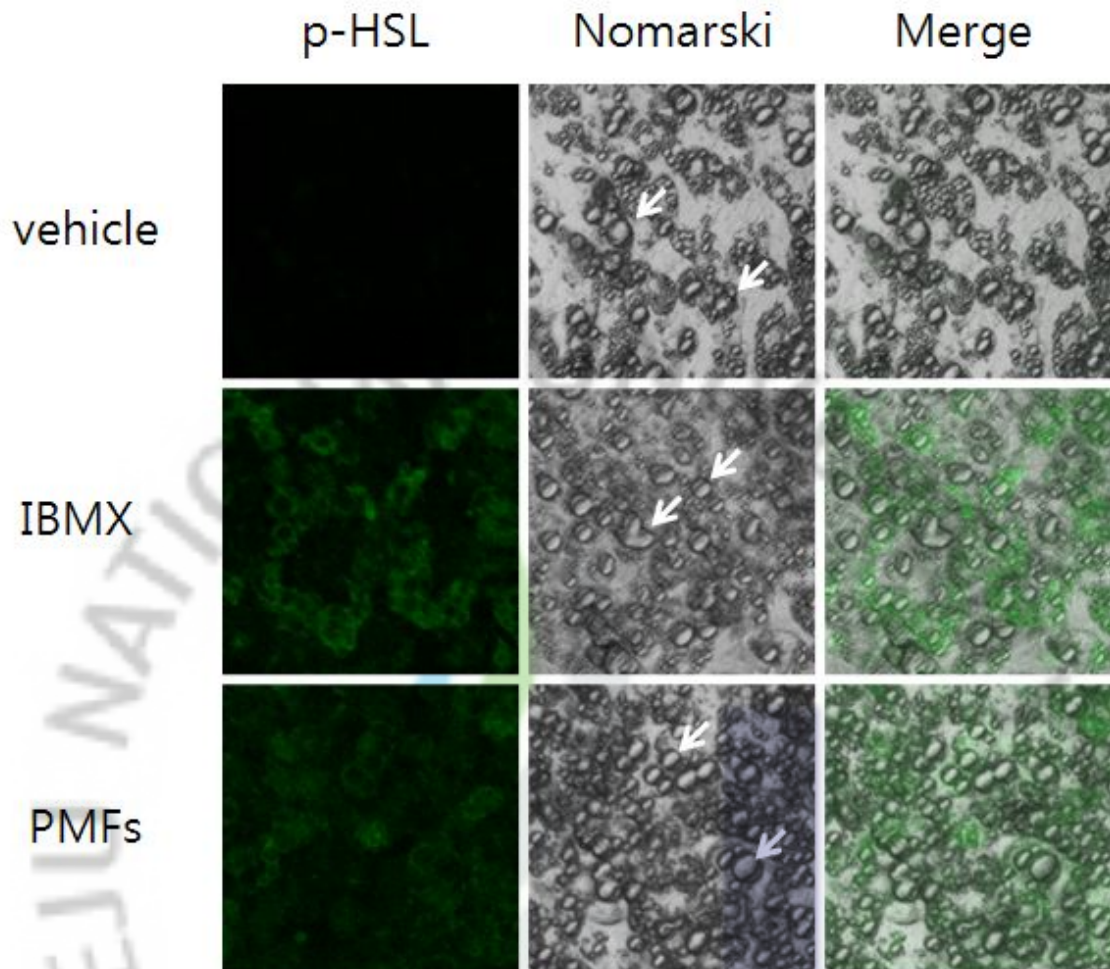


**Figure 4. Effect of PMFs on the cytotoxicity of differentiated adipocyte.** Differentiated adipocytes were treated with various concentrations of PMFs (2.5, 10 and 40  $\mu\text{g/mL}$ ) for 48 hours. Cytotoxicity was determined by LDH assay. Vehicle (DMSO), positive control. The mean values of the results are shown with the SD ( $n = 3$ ). The data shown are representative of three experiments.



**Figure 5.** PMFs stimulated phosphorylation of PKA and HSL. 3T3-L1 cells were differentiated in the presence of MDI differentiation medium for 8 days. Differentiated adipocytes were treated with DMEM and PMFs for 30 minutes. The mean values of the results are shown with the SD ( $n = 3$ ). The data shown are representative of three experiments. \* $p < 0.01$ .



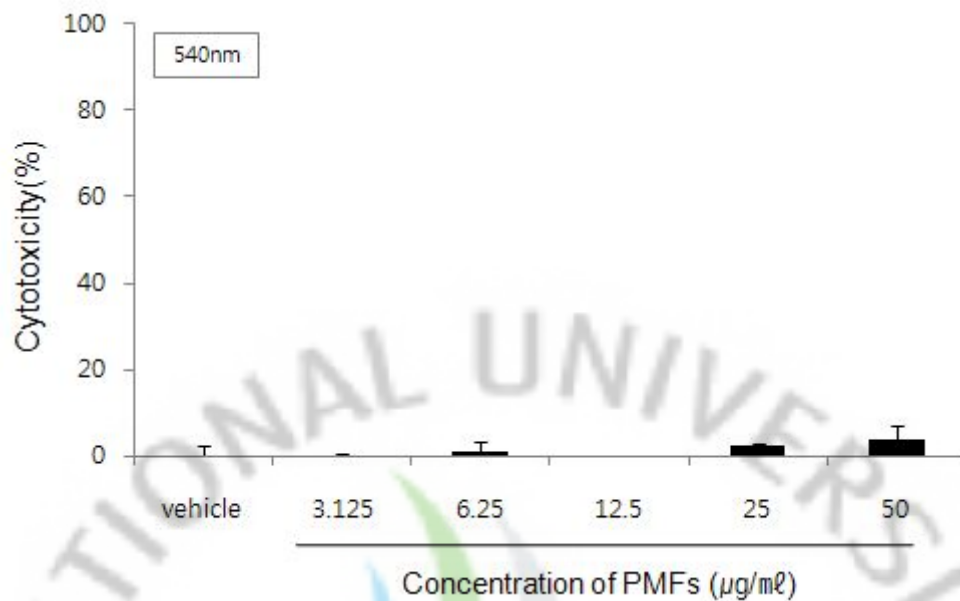


**Figure 6. Intracellular distribution of phospho-HSL in 3T3-L1 adipocytes.** 3T3-L1 cells were differentiated in the presence of MDI differentiation medium for 8 days. Differentiated adipocytes were treated with DMEM and PMFs for 30min. Adipocytes were fixed, incubated antibody against phospho-HSL, followed by incubation anti-rabbit FITC-conjugated secondary antibody, and subjected to confocal fluorescent microscopy. Vehicle, DMSO; White arrow, lipid droplet; magnification, 200×

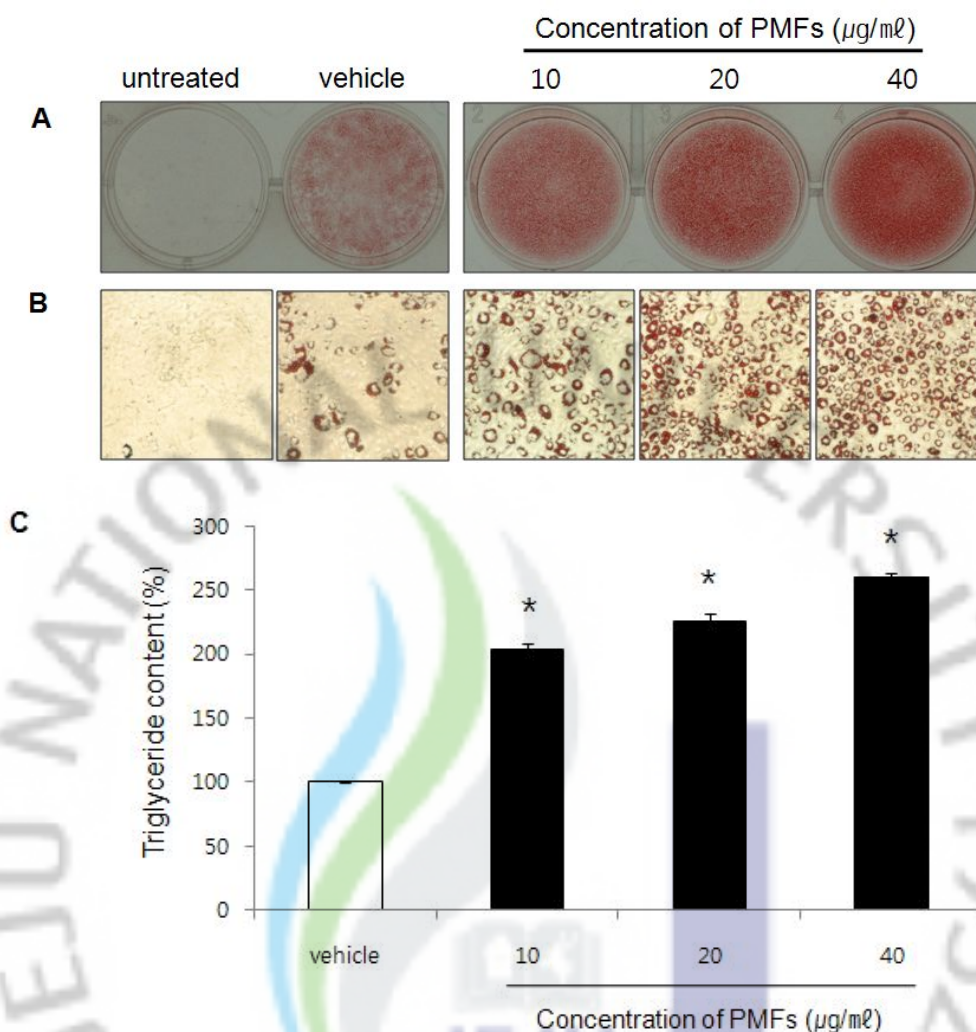
## 2. 전구지방세포에서 PMFs에 의한 지방합성(lipogenesis) 촉진

우선, 3T3-L1 전구지방세포에 처리되는 PMFs의 적정 처리농도를 결정하기 위하여 LDH 방법으로 세포독성을 분석하였다 (Figure 7). 3T3-L1 전구지방세포에 PMFs를 농도별 (3.125, 6.25, 12.5 및 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 처리한 결과, 세포독성이 0, 0.9, 0, 2.3 및 3.8%로 처리한 농도 간에 유의성이 없어 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지는 세포독성이 없는 것으로 판단되었다. PMFs가 3T3-L1 전구지방세포 분화에 어떠한 영향을 나타내는지를 알아보기 위하여 분화유도 배지에서 IBMX 대신 PMFs를 첨가하여 분화의 척도가 되는 지방소적을 Oil Red O 염색법으로 관찰하였다 (Figure 8). Figure 8A에서 보여주는 바와 같이, PMFs를 처리하지 않은 양성대조군에 비해 PMFs를 처리한 군에서는 지방소적 형성이 농도 의존적으로 증가하였다. 지방소적의 염색 강도를 정량한 결과, PMFs를 처리하지 않은 양성대조군 (100%)에 비해 PMFs를 10, 20 및 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 군에서는 각각 203.5%, 226.2/5 및 260%의 값을 나타내었다 (Figure 8C).

분자수준에서 PMFs가 전구지방세포 분화에 미치는 영향을 확인하기 위하여 분화조절 전사인자인 PPAR $\gamma$ 와 분화지표 단백질인 aP2의 발현을 Western blot 방법으로 분석하였다. 분화유도 배지에 IBMX 대신 PMFs를 처리한 세포군에서 PPAR $\gamma$ 와 aP2 단백질 발현이 농도 의존적으로 증가하였다 (Figure 9). 특히, 분화된 지방세포에서 분비되는 아디포넥틴과 레지스틴의 mRNA를 real-time PCR 방법으로 분석한 결과, PMFs 처리에 의해 아디포넥틴과 레지스틴의 mRNA 발현이 농도 의존적으로 증가됨을 확인할 수 있었다 (Figure 10). 그리고 PMFs에 의한 분화촉진 활성화에 관여하는 신호전달 경로를 확인하기 위하여 PPAR $\gamma$ 의 상위 조절 인자인 CREB를 활성화 시키는 PKA의 인산화를 Western blot 분석 방법으로 확인하였다. IBMX가 없는 분화 조건에서 PMFs는 PKA 단백질의 인산화를 대조군에 대비해서 증가함을 확인할 수 있었다 (Figure 11).



**Figure 7.** Effect of PMFs on the cytotoxicity of 3T3-L1 preadipocyte. Preconfluent preadipocytes were treated with various concentrations of PMFs (3.125, 6.25, 12.5, 25 and 50 µg/mL) for 72 hours. Cytotoxicity was determined by LDH assay. Vehicle (DMSO), positive control. The mean values of the results are shown with the SD (n = 3). The data shown are representative of three experiments. \* $p < 0.05$ .



**Figure 8. Effects of PMFs on lipid accumulation of 3T3-L1 cells during adipocyte differentiation in absence of IBMX.** 3T3-L1 cells were differentiated in the presence of PMFs and ID differentiation medium (excluding IBMX) for 8 days. Differentiated adipocytes were stained with Oil Red O at day 8. (A) Macroscopic pictures of stained cells, (B) Microscopic pictures ( $\times 200$ ) of stained cells, (C) Triglyceride contents. Lipid accumulation was assessed by the quantification of  $\text{OD}_{520}$  as described in Materials and Method. Untreated, negative control; vehicle (DMSO), positive control. The mean values of the results are shown with the SD ( $n = 3$ ). The data shown are representative of three experiments. \*  $p < 0.05$ .

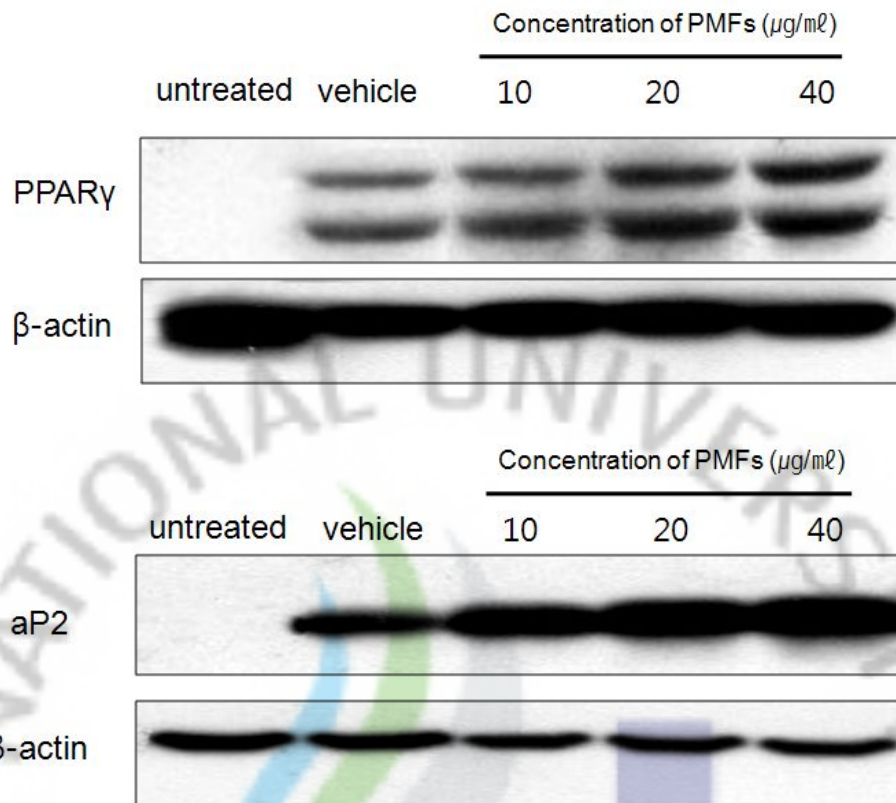
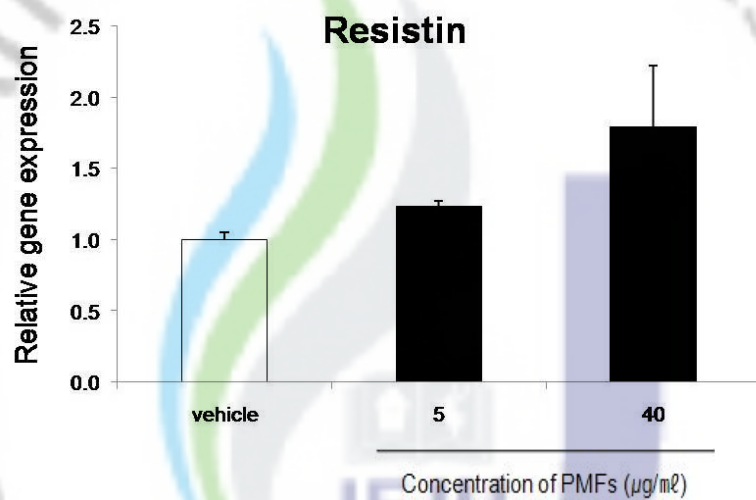
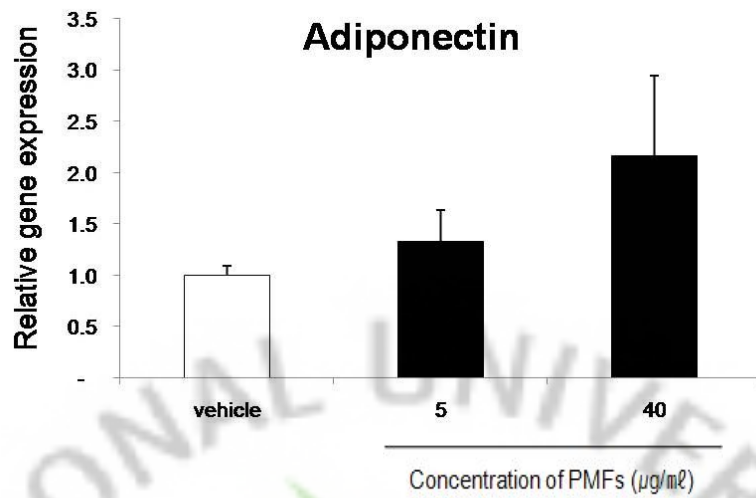
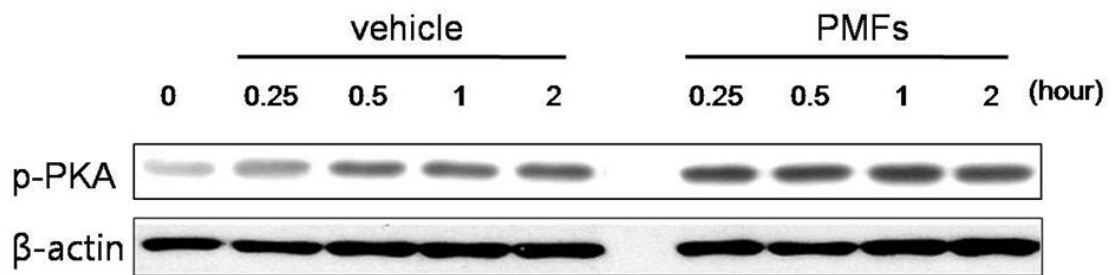


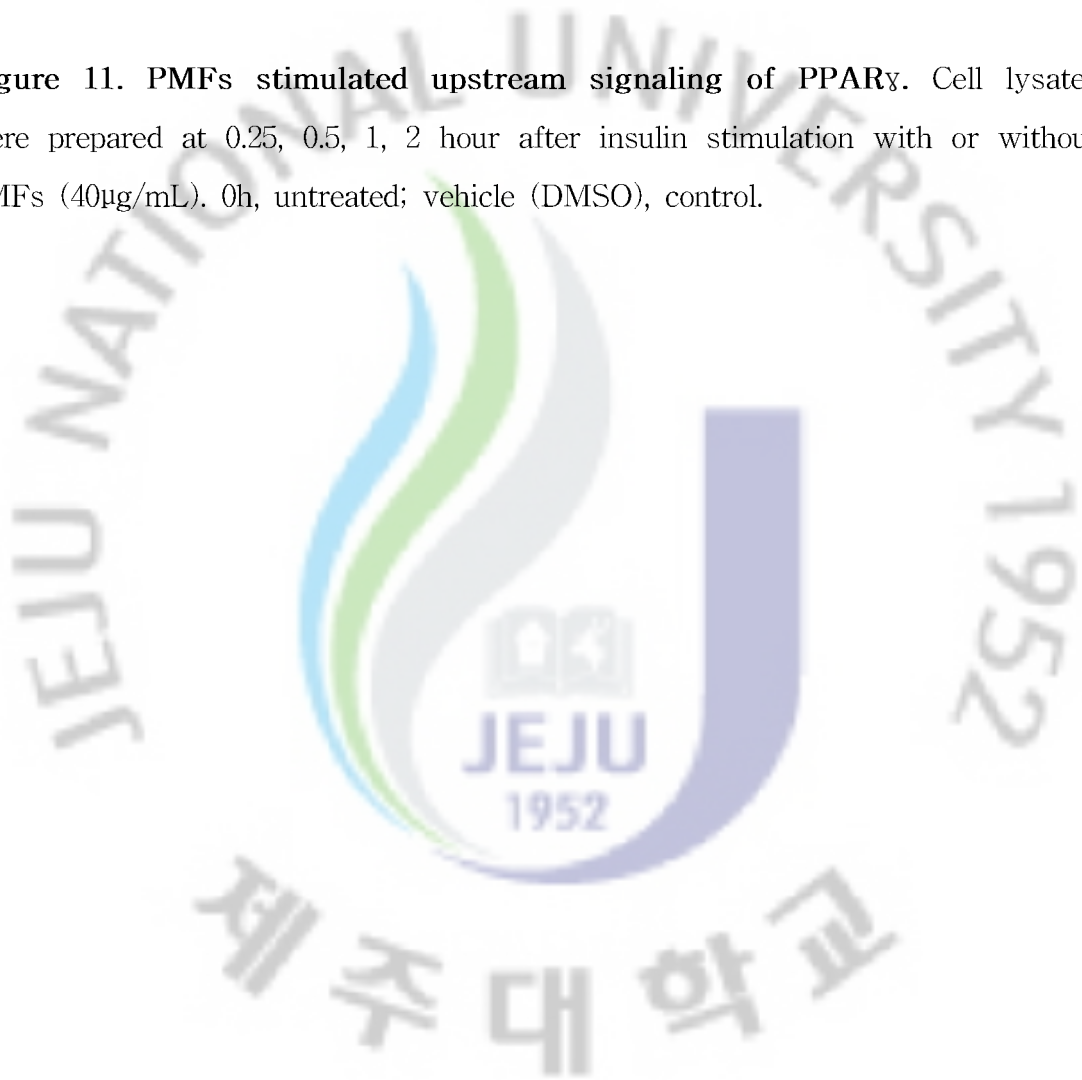
Figure 9. Western blot analysis of PPAR $\gamma$  and aP2 in 3T3-L1 cells treated with PMFs. 3T3-L1 cells were differentiated for 6 day in the presence of ID differentiation medium (excluding IBMX) and PMFs. Untreated, negative control; ID, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  insulin and 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$  dexamethasone.



**Figure 10. Effects of PMFs on adipokine gene expression.** Total RNAs were prepared from 3T3-L1 cells at day 8. Relative ratio of gene expression in vehicle versus 5, 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PMFs are indicated. The mean values of the results are shown with the SD ( $n = 3$ ). The data shown are representative of three experiments. \*  $p < 0.05$ .



**Figure 11. PMFs stimulated upstream signaling of PPAR $\gamma$ .** Cell lysates were prepared at 0.25, 0.5, 1, 2 hour after insulin stimulation with or without PMFs (40 $\mu$ g/mL). 0h, untreated; vehicle (DMSO), control.



## IV. 고찰

본 연구는 제주도 채래 감굴류에서 지질대사 개선 소재를 탐색하는 연구의 일환으로, 3T3-L1 세포를 이용하여 채래감굴 과피 추출물들이 지방세포 분화 및 지질대사에 대한 활성을 나타내는 산굴을 실험재료로 선발하여 수행하였다. 특히, 산굴 과피는 다양한 활성을 가진다고 보고된 PMFs를 다량 함유하고 있기 때문에 산굴 과피를 이용하여 실험에 사용된 PMFs를 분리하였다.

지방조직은 고등동물에서 에너지 항상성을 유지하는데 중요하지만 과잉 생성될 경우 여러 질환이 원인이 된다. Genistein, catechin, nobiletin, naringenin 등 여러 flavonoids 가 지질대사 개선에 긍정적인 영향을 끼친다는 보고가 있다 (Harmon and Harp, 2001; Hwang *et al.*, 2005; Saito *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009). 따라서 본 연구에서는 PMFs가 3T3-L1 세포에서 지질 대사에 미치는 영향을 조사 하였다. 90%이상 분화된 3T3-L1 지방세포에 PMFs를 처리한 결과, PMFs가 지방세포에 축적된 지방소적을 감소시키는 활성을 가지고 있음을 알 수 있었다. 그리고 현미경 관찰시 지방세포에서 지방소적의 크기의 감소가 일어났음을 확인 할 수 있었다. 더욱이 지방소적에 중성지질이 가수 분해 되면 3 분자의 자유지방산과 1분자의 글리세롤로 분해되는데 (Zimmermann *et al.*, 2009), 방출된 글리세롤 함량을 측정 한 결과 PMFs 처리 시 지방세포의 배지 내 글리세롤 함량이 증가하였음을 볼 수 있었다. 이는 Ahn (2006)등이 보고한 연구로 미루어 볼 때 PMFs가 축적된 지질을 분해하는데 작용하는 것으로 사료 된다. 하지만 이것이 지방세포의 지질대사에 PMFs가 독성으로 작용하여 이러한 현상이 일어나는지 확인하기 위해 LDH를 측정 한 결과, 세포독성이 나타나지 않아 독성으로 인한 현상이 아님을 알 수 있었다.

지방세포에서의 지질분해(lipolysis)의 기전은 adipose triacylglycerol lipase (ATGL)가 중성지질을 diacylglycerol로, HSL은 diacylglycerol을 monoacylglycerol로 가수분해하고 monoacylglycerol lipase (MGL)는 monoacylglycerol을 가수분해한다 (Zechner *et al.*, 2005). 이 중 HSL은 호르몬에 의해 조절되는 효소로 PKA 의존적인 경로와 PKA 독립적인 경로를 통해 조절 된다 (Holm, 2003). cAMP에 의해 조절되고 활성화가 된 phospho-PKA는 HSL의 인산화를 촉진하며 활성화된 HSL은 세포질에서 지방소적 표면으로 이동한다. Perilipin은 지방소적표면에 있는 단백질로



평소에는 CGI-58과 결합되어 지방소적의 분해를 막지만 활성화된 phospho-PKA에 의해 인산화가 되면 CGI-58은 세포질로 방출되고 perilipin은 HSL 연계해 지질을 분해한다. 이때 방출된 CGI-58은 ATGL과 결합하여 ATGL를 활성화 시켜 역시 지질분해를 시작 한다 (Zimmermann *et al.*, 2009). 이에 따라 PMFs가 지질분해 기전에서 어떠한 경로를 통해 지질 분해를 유도하는지 알아보기 위해 지질분해 관련 효소를 확인하였다. 확인 결과 PMFs를 처리한 군에서 HSL의 인산화가 양성대조군에 비해 농도 의존적으로 증가함을 알 수 있었다. 또한 세포내 cAMP 농도에 의해 활성화가 되어 HSL의 인산화를 조절하는 phospho-PKA 역시 농도 의존적으로 증가함을 확인하였다. 그리고 면역형광염색법으로 phospho-HSL을 염색한 결과 역시 PMFs가 대조군에 비해 HSL의 인산화를 촉진시킴을 확인할 수 있었다. 플라보노이드 계열 중 많은 수가 PDE의 억제제로 작용하여 세포내 cAMP를 증가 시킨다는 보고가 있다. 이 중 genistein은 PDE의 촉매 위치에 결합하여 PDE의 활성을 저해한다고 보고되었다 (Peluso, 2006). 따라서 PMFs에 의한 lipolysis 활성화는 PMFs가 PDE의 활성을 저해함으로써 세포내 cAMP 수준을 높이는데 기여함으로써 매개될 것이라고 가정할 수 있지만 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

3T3-L1 전구 지방세포는 confluent 상태에서 성장정지 (growth arrest) 상태가 되는데 이때 인슐린, dexamethasone, IBMX 를 함께 처리 하면 지방세포로 분화된다고 알려져 있다 (Gregoire *et al.*, 1998). 따라서 위 결과에서 PMFs가 세포내 cAMP를 조절한다고 사료 되었기에 전구지방세포 분화에 있어서 세포내 cAMP를 조절 하는 IBMX 대신 PMFs를 처리하여 PMFs가 전구지방세포의 분화를 촉진하는지 확인하여 보았다. IBMX 대신 PMFs를 처리 하여도 전구지방세포의 분화를 유도 된다는 것을 확인 할 수 있었는데, 이는 Martini *et al.* (2009)등이 보고한 연구 결과와 일치 하였다. 따라서 PMFs는 전구지방세포에서 IBMX와 유사하게 전구 지방세포내의 cAMP 수준을 조절함으로써 지방세포 분화를 촉진하는 것으로 사료 된다.

PPARs 는 3T3-L1 전구지방세포의 분화를 조절하는 핵 내 수용체로 (Auwerx, 1999; Vamecq and Latruffe, 1999), 이중 PPAR $\gamma$ 는 리간드와 결합하면 RXR $\alpha$ 와 이형복합체를 형성하여 peroxisome proliferator response elements (PPRE)에 결합하여 aP2, phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) 등과 같은 표적유전자의 발현을 촉진 한다 (Schoonjans *et al.*, 1996). 그리고 분화됨에 따라 지방세포는 렘틴, 아디

포넥틴 레지스틴 등과 같은 아디포카인을 분비 (Kershaw and Flier, 2004) 한다고 알려져 있다. 이에 따라 실제로 분자적 수준의 분화가 일어났는지 알아보기 위해 지방세포 분화에 관련된 PPAR $\gamma$  와 aP2 단백질 발현량을 확인하였다. IBMX가 제외된 분화유도배지에서 PMFs는 지방세포 표지 유전자인 PPAR $\gamma$ 의 발현을 증가시킬 뿐 아니라 이들의 표적 유전자인 aP2의 발현량을 증가시킴으로써 분화배지에서 IBMX 대신 PMFs를 첨가하여도 분자수준에서 분화가 일어났음을 알 수 있었다. 또한 PMFs는 지방세포 분화 시 분비되는 아디포카인 중 아디포넥틴과 레지스틴의 mRNA 발현량 또한 증가시킴으로서 분화촉진 활성을 가지고 있음을 다시 한 번 확인 할 수 있었다.

IBMX는 cAMP를 AMP로 전환시켜주는 효소인 PDE의 억제제로, AMP를 cAMP로 전환하는 효소인 AC와 함께 세포내 cAMP 수준을 증가시켜 지방세포로의 분화를 촉진 시킨다 (Georges Vassaux et al., 1992; Tang *et al.*, 1999). 세포내 cAMP의 증가는 cAMP/PKA 신호전달 경로를 통해 cAMP-responsive element binding protein (CREB) 을 활성화 시키고 활성화된 CREB은 C/EBP $\beta$  유전자의 전사를 촉진함으로 지방세포의 분화에 영향을 끼친다 (Niehof *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2004). 이에 따라 PPAR $\gamma$ 의 상위 조절 인자를 확인한 결과 PMFs는 PKA의 인산화를 촉진함으로써 PMFs가 전구 지방세포의 초기 분화에 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다. 이는 최근 보고된 연구에 의하면 PMFs 중 하나인 nobiletin이 cAMP 신호전달체계에 영향을 끼쳐 전구지방세포에서 지방세포로 분화에 영향 준다는 결과(Saito *et al.*, 2007)와 일치한다. 본 연구에 사용된 PMFs는 nobiletin를 포함하여 7개의 PMF의 복합체이다. 따라서 PMFs가 세포내 cAMP를 증가시켜 전구지방세포에서 지방세포로 분화하는데 영향을 미치는 것으로 사료된다.

결론적으로 위 내용을 종합해 볼 때 PMFs는 다른 플라보노이드들과 같이 세포내 cAMP를 증가시킴으로서 세포내에 축적된 지질분해 뿐만 아니라 전구지방세포의 분화에 필요한 지방합성(lipogenesis)과 같은 지질대사에 영향을 미친다고 사료된다. 그러나 지질대사에 미치는 PMFs의 상세한 기작을 구명하기 위해서는 PMFs로부터 단일 PMF를 분리하여 개별적 PMF에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

## V. 참고 문헌

- Ahn, I. S., M. S. Do, B. H. Choi, C. S. Kong, S. O. Kim, M. S. Han and K. Y. Park. 2006. Reduced leptin secretion by fucoidan-added Kochujang and anti-adipogenic effect of fucoidan in mouse 3T3-L1 adipocyte. *J. Food Science and Nutrition*, 11: 31-35
- Anthonsen, M. W., L. Ronnstrand, C. Wernstedt, E. Degerman and C. Holm. 1998. Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, 273: 215-221
- Auwerx J. 1999. PPARgamma, the ultimate thrifty gene. *Diabetologia*, 42: 1033-1049
- Ceresa, B. P. and J. E. Pessin. 1998. Insulin regulation of the Ras activation/inactivation cycle. *Mol. Cell. Biochem*, 182: 23-29
- Cho, K. J., H. E. Moon, H. Moini, L. Packer, D. Y. Yoon and A. S. Chung. 2003.  $\alpha$ -Lipoic acid inhibits adipocyte differentiation by regulating pro-adipogenic transcription factors via mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Biol. Chem.*, 278: 34823-34833.
- Choi S. Y., H. C. Ko, S. Y. Ko, J. H. Hwang, J. G. Park, S. H. Kang, S. H. Han, S. H. Yun and S. J. Kim. 2007. Correlation between flavonoid content and the NO production inhibitory activity of peel extracts from various citrus fruits. *Biol. Pharm. Bull.* 30: 772-778

- Choi, S. Y., J. H. Hwang, H. C. Ko, J. G. Park and S. J. Kim. 2007. Nobiletin from citrus fruit peel inhibits the DNA-binding activity of NF- $\kappa$ B and ROS production in LPS-activated RAW 264.7 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 133: 149-155.
- Chung S. K., S. H. Kim, Y. H. Choi, E. Y. Song and S. H. Kim. 2000. Status of citrus fruit production and view of utilization in Cheju. *Food Ind, Nutr.* 5: 42-52
- Cowherd, R. M., R. E. Lyle and R. E. McGehee Jr. 1999. Molecular regulation of dipocyte differentiation. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 10 : 3-10
- Degerman, E., C. J. Smith, H. Tornqvist, V. Vasta, P. Belfrage and V. C. Manganiello. 1990. Evidence that insulin and isoprenaline activate the cGMP-inhibited low- $K_m$  cAMP phosphodiesterase in rat fat cells by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 533-537
- Francis A. R., T. K. Shetty and R. K. Bhattacharya. 1989. Modulation effect of plant flavonoids on the mutagenicity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Carcinogenesis*, 10: 1953-1955
- Garcia, O. B and J. Castillo. 2008. Update on Uses and Properties of Citrus Flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular and anti-inflammatory activity. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 6185-6205
- Green C. O., A. O. Wheatley, A. U. Osagie, E. Y. St. A. Morrison and H. N. Asemota. 2007. Determination of polymethoxylated flavones in peels of selected Jamaican and Mexican citrus (Citrus spp.) cultivars by high-performance liquid chromatography. *Biometical Chromatography*, 21: 48-54

- Greenberg, A. S., W. J. Shen, K. Muliro, S. Patel, S. C. Souza, R. A. Roth and F. B. Kraemer. 2001. Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J. Biol. Chem.*, 276: 45456-45461
- Gregoire, F. M., C. M. Smas, and H. S. Sul. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiological Review*, 78 : 783-809.
- Guengerich, F. P. and D. H. Kim. 1990. In vitro inhibition of dihydropyridine oxidation and aflatoxin B1 activation in human liver microsomes by naringenin and other flavonoids. *Carcinogenesis*, 11: 2275-2279
- Harmon, A. W. and J. B. Harp. 2001. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 280: 807-813
- Holm, C. 2003. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochemical Society Transactions*, 31: 1120-1124
- Hwang, J. T., I. J. Park, J. I. Shin, Y. K. Lee, S. K. Lee, H. W. Baik, J. H. Ha and O. J. Park. 2005. Genistein, EGCG, and apsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338: 694-699
- Inoue M., C. Z. Wu, D. Q. Dou, Y. J. Chen and Y. Ogihara. 1999. Lipoprotein lipase activation by red ginseng saponins in hyperlipidemia model animals. *phytotherapy*, 6: 257-265
- Kershaw, E. E. and J. S. Flier. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *The Jour of Endocrinology & Metabolism*, 89: 2548-2556

- Kim, H. Y. 1988. Distribution, taxonomy, horticultural characters of the local Citrus spp. in Cheju, and the genetic markers among them. *Phd thesis, Cheonnam National University, Cheonnam, Korea*
- Kuo S. M. 1996. Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Letter*, 110: 41-48
- Langin, D., C. Holm and M. Lafontan. 1996. Adipocyte hormone sensitive lipase: a major regulator of lipid metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society*, 55: 93-109
- Lee, M. S., C. T. Kim, I. H. Kim and Y. H. Kim. 2009. Inhibitory effects of green tea catechin on the lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. *Phytotherapy Research*, 23: 1088-1091
- Martens, S. and A. Mithofer. 2005. Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry*, 66: 2399-2407
- Martini, C. N., M. V. Plaza and M. C. Vila. 2009. PKA-dependent and independent cAMP signaling in 3T3-L1 fibroblasts differentiation. *Molecular and cellular Endocrinology*, 298: 42-47
- Masuno H. and H. Okuda. 1995. Glycosylation and secretion of lipoprotein lipase by 3T3-L1 adipocytes: effects of brefeldin A. *J. Atheroscler. Thromb*, 2: 46-52
- Mouly, P. P. M., C. G. Arzouyan, E. M. Gaydou and J. M. Estienne. 1994. Differentiation of citrus juices by factorial discriminant analysis using liquid chromatography of flavonone glycosides. *J. Agric. Food. Chem.*, 42: 70-79

- Must, A., J. Spadano, E. H. Coakley, A. E. Field, G. Colditz and W. H. Dietz. 1999. The disease burden associated with overweight and obesity. *J Am Med Assoc.*, 282: 1523-1529.
- Niehof, M., M. P. Mannas and C. Trautwein. 1997. CREB controls LAP/C/EBP $\beta$  transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 17: 3600-3613
- O'Rourke L., L. M. Gronning, S. J. Yeaman and P. R. Shepherd,. 2002. Glucose-dependent regulation of cholesterol ester metabolism in macrophages by insulin and leptin. *J Biol Chem.* 277: 42557-42562
- Peluso, M. R., 2006. Flavonoids attenuate cardiovascular disease, inhibit phosphodiesterase, and modulate lipid homeostasis in adipose tissue and liver. *Experimental Biology and Medicine* 231: 1287-1299
- Rouseff, R. L., S. F. Martin and C. O. Youtsey. 1987. Quantitative survey of narirutin, naringin, hesperidin and neohesperidin in citrus. *J. Agric. Food Chem.*, 35: 1027-1030
- Saito, T., D. Abe and K. Sekiya. 2009. Nobiletin enhances differentiation and lipolysis of 3T3-L1 adipocyte. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 357: 371-376.
- Schoonjans K., B. Staels and J. Auwerx. 1996. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Acta.* 1302: 93-109.
- Smith, P. J., L. S. Wise, R. Berkowitz, C. Wan and C. S. Rubin. 1988. Insulin-like growth factor-1 is an essential regulator of the differentiation 3T3-L1 adipocyte. *J. Biol. Chem.*, 263: 9402-9408

- Tang, Q. Q., M. S. Jiang and M. D. Lane. 1999. Repressive effect of Sp1 on the C/EBP $\alpha$  gene promoter: role in adipocyte differentiation. *Molecular and Cellular Biology*. 19: 4855-4865
- Tang Q. Q., T. C. Otte, and M. D. Lane. 2003. Mitotic clonal expansion: A synchronous process required for adipogenesis. *PNAS*. 100: 44-49.
- Vamecq, J. and N. Latruffe. 1999. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet*, 354: 141-148
- Watt, M. J., A. G. Holmes, S. K. Pinnamaneni, A. P. Garnham, G. R. Steinberg, B. E. Kemp and M. A. Febbraio. 2006. Regulation of HSL serine phosphorylation in skeletal muscle and adipose tissue. *Am J. Physiol. Endocrinol. Metab*, 290: 500-508
- Zechner, R., J. G. Strauss, G. Hammerle, A. Lass and R. Zimmermann. 2005. Lipolysis: pathway under construction. *Current Opinion in Lipidology*, 16: 333-340
- Zhang, J. W., D. J. Klemm, C. Vinson and M. D. Lane. 2004. Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer binding protein  $\beta$  gene during adipogenesis. *J. Biol. Chem*, 279: 4471-4478
- Zimmermann, R., A. Lass, G. Haemmerle and R. Zechner. 2009. Fate of fat: The role of adipose triglyceride lipase in lipolysis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797: 494-500



## VI. 요 약

다양한 알칼로이드류와 플라보노이드류 등을 함유하고 있는 산골은 수 세기동안 전통 한의학 약재로 사용되어 왔다. 산골 과피에는 감귤류에만 존재하는 polymethoxyflavones (PMFs)이 다량 함유되고, PMFs는 다양한 생물학적 활성을 지닌다고 알려져 있다. 본 연구에서는 지질대사 개선 소재로서의 산골 과피의 유용성을 평가하기 위하여 PMFs가 지질대사에 미치는 영향을 3T3-L1 세포를 사용하여 분석하였다. 우선, 분화된 3T3-L1 지방세포에서 PMFs의 지방분해능을 조사하였다. PMFs는 농도 의존적으로 분화된 지방세포의 지방소적 분해를 증가시켰다. 특히, PMFs는 지방분해에 관여하는 cAMP dependent protein kinase (PKA) 와 hormone sensitive lipase (HSL) 인산화를 촉진하였다. 둘째로, 지방세포 분화배지에서 cAMP 농도를 증가 시키는 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) 대신에 PMFs를 처리하여 PMFs가 전구지방세포 분화에 미치는 영향을 분석하였다. 전구 지방세포에 인슐린, 텍사메타손과 함께 PMFs를 처리할 경우 농도 의존적으로 지방소적 축적이 증가되었다. 더욱이, PMFs는 지방세포 분화를 촉진하는 peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ )와 분화지표 단백질인 adipocyte fatty acid binding protein (aP2)의 발현을 증가시켰다. 또한, PMFs는 adipokine의 일종인 adiponectin과 resistin mRNA 발현을 농도 의존적으로 증가시켰다. 그리고 PMFs는 지방세포 분화과정에서 초기단계 신호로 작용하는 PKA의 활성화를 촉진시키는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구결과로 미루어 볼 때, 3T3-L1 세포에서의 PMFs에 의한 지방분해 활성과 분화촉진 활성 모두 cAMP에 의해 매개되는 신호전달을 통해 일어난다고 사료된다.