



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

3T3-L1 지방세포에서 꼬물꼬시래기
[*Gracilaria vermiculophylla* (OHMI)
PAPENFUSS] 추출물 및 분획층의
AMPK의 활성화 기전 연구

제주대학교 대학원

생물학과

김 호 민

2011년 2월

3T3-L1 지방세포에서 꼬물꼬시래기
[*Gracilaria vermiculophylla* (OHMI)
PAPENFUSS] 추출물 및 분획층의
AMPK의 활성화 기전 연구

지도교수 김 세 재

김 호 민

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2011년 2월

김호민의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

제주대학교 대학원

2011년 2월

Inhibitory effects of extracts and fractions
obtained from *Gracilaria vermiculophylla* (OHMI)
PAPENFUSS on 3T3-L1 adipocyte differentiation
mediated by the AMPK signaling pathway

Hyo-Min Kim

(Supervised by Professor Se-Jae Kim)

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

2011. 2

This thesis has been examined and approved

Chairperson of the Committee

Date

Department of Biology
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

ABSTRACT

Obesity results from the imbalance between energy intake and energy consumption, which may lead to a pathologic growth of adipocytes. I examined the effects of several extracts obtained from the edible seaweed *Gracilaria vermiculophylla* (OHMI) PAPENFUSS on the adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. The ethanol extract and the subsequent solvent fractions inhibited the accumulation of lipid droplets in a dose-dependent manner in 3T3-L1 preadipocytes, which were stimulated by differentiation inducers. Among solvent fractions the ethyl acetate fraction (GEFr) elicited the most inhibitory effect which involved a significant decrease of the expressions of the key adipocyte differentiation regulator, peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), CCAAT enhancer binding proteins α (C/EBP α) and fatty acid binding protein (aP2) by the protein level. AMP-activated protein kinase (AMPK), which is an enzyme that play a role in cellular energy homeostasis, emerges as a possible target molecule of anti-obesity. Thus the effects of GEFr on AMPK signalling pathways were investigated. GEFr significantly activated AMPK and its substrate, acetyl-CoA carboxylase (ACC) in 3T3-L1 adipocytes. GEFr increased activation of LKB1 and stimulated the intracellular ROS generation, both of which activated AMPK. GEFr effectively increased the gene expression of carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1) and uncoupling protein2 (UCP2), but not peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α (PGC-1 α). GEFr did not affected glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes, whereas, GEFr increased lipolysis in a dose-dependent manner. This study strongly suggested that *G. vermiculophylla* extract and its subsequent fractions, especially its active fraction GEFr have the potential for use in therapeutic design to improve the lipid metabolism.

Key word : *Gracilaria vermiculophylla*, 3T3-L1, PPAR γ , C/EBP α , aP2, AMPK, LKB1, ROS, CPT-1, UCP2, PGC-1 α , glucose uptake, lipolysis

목 차

A B S T R A C T	-----	i
목 차	-----	ii
L I S T O F T A B L E	-----	iv
L I S T O F F I G U R E S	-----	v
I. 서 론	-----	1
II. 재 료 및 방 법	-----	4
1. 시료의 추출 및 분획	-----	4
2. 세포 배양	-----	4
3. 세포 증식률 측정(MTT assay)	-----	4
4. 분화 유도 및 시료처리	-----	5
5. Oil-Red O 염색	-----	6
6. Free Glycerol 함량 측정	-----	6
7. RNA 분리 및 Real time-PCR	-----	7
8. Western Blot	-----	10
9. Glucose uptake 분석	-----	10
10. 세포내 ROS 측정	-----	11
11. 통계처리	-----	11

III. 결	과	-----	12
1.	꼬물꼬시래기 에탄올 추출물의 전구지방세포 분화유도 억제 효과	--	12
2.	꼬물꼬시래기 추출물 분획층의 전구지방세포 분화 억제활성	-----	16
3.	꼬물꼬시래기 에틸아세테이트 분획층 (GEFr)의 AMPK 신호전달의 활성화	-----	21
1)	AMPK 인산화 유도활성	-----	21
2)	LKB1 인산화와 ROS 생성	-----	21
3)	지방산 β -산화(fatty acid β -oxidation) 관련 유전자 발현 효과	-----	22
4)	당 흡수 (glucose uptake)와 지방분해 (lipolysis) 효과	-----	22
IV. 고	찰	-----	27
V. 참	고 문 헌	-----	31
VI. 요	약	-----	40

LIST OF TABLES

Table 1. The primer sequences of the genes used in real time-PCR analysis
and the expected size of their PCR products ----- 9



LIST OF FIGURES

Figure 1.	The effect of <i>Gracilaria vermiculophylla</i> extract (GVE) on the proliferation of 3T3-L1 preadipocyte -----	13
Figure 2.	The effects of <i>G. vermiculophylla</i> extract (GVE) on lipid accumulation of 3T3-L1 cells during adipogenesis -----	14
Figure 3.	Western blot analysis of PPAR γ , C/EBP α and aP2 in 3T3-L1 cells treated with GVE -----	15
Figure 4.	The effect of <i>G. vermiculophylla</i> hexane fraction (GHFr) and ethyl acetate fraction (GEFr) on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes -----	17
Figure 5.	The effect of <i>G. vermiculophylla</i> hexane fraction (GHFr) on lipid accumulation of 3T3-L1 cells during adipogenesis -----	18
Figure 6.	The effect of <i>G. vermiculophylla</i> ethyl acetate fraction (GEFr) on lipid accumulation of 3T3-L1 cells during adipogenesis -----	19
Figure 7.	Western blot analysis of PPAR γ , C/EBP α and aP2 in 3T3-L1 cells treated with GHFr and GEFr -----	20
Figure 8.	The effects of GEFr on AMPK and ACC activation in differentiated 3T3-L1 adipocytes -----	23
Figure 9.	The effects of GEFr on LKB1 phosphorylation and ROS generation in 3T3-L1 adipocyte -----	24
Figure 10.	The effect of GEFr on mRNA expression of β -oxidation related gene -----	25
Figure 11.	The effects fo GEFr on 2-Deoxy-D-[3 H]glucose uptake and glycerol release in 3T3-L1 adipocytes -----	26

I. 서 론

현대사회에서는 비만, 당뇨병, 고지혈증 및 심혈관계 질환 등과 같은 복합적 원인으로 대사 장애가 급격히 증가하는 추세이며, 우리나라의 주된 사망원인 또한 비만과 밀접하게 연관이 되는 암, 순환기계질환, 당뇨병이 높은 순위를 차지하고 있다 (2009 사망원인 통계연보, 2010).

비만은 에너지의 섭취가 에너지의 소비량을 초과할 때 발생하며 (Stephane *et al.*, 2007), 지질의 저장과 에너지 대사를 조절하는 지방조직을 구성하고 있는 지방세포의 성장과 크기 증가, 또는 그 수가 과도하게 증가되어 일어난다 (Ejaz *et al.*, 2009). 비만은 단순히 외형상의 문제만을 야기하는 것이 아니라 고혈압, 고지혈증, 고콜레스테롤증, 동맥경화, 당뇨병과 같은 여러 대사성 질환들과 밀접한 관계를 보이기 때문에 비만에 대한 관심과 연구가 많이 이루어지고 있다 (Kim *et al.*, 2002).

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 지방세포 유도 복합체 즉, 배지에 인슐린, glucocorticoid 계열의 dexamethasone (DEXA) 및 phospho- diesterase 저해제인 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)을 처리하면 지방세포 분화가 현저하게 촉진된다 (MacDougald *et al.*, 1995; Gregoire *et al.*, 1998 ; Cowherd *et al.*, 1999). 이렇게 분화유도된 세포는 형태가 변하기 시작하고 5-7일 간에 지방세포의 표현형을 획득하게 된다 (Sams and Sul., 1995, Gregoire *et al.* 1998). 전구지방세포에서 지방세포로 분화되는 과정은 지방산과 프로스타글란딘과 같은 리간드가 peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR γ)에 결합하고, glucocorticoids와 같은 호르몬이 CCAAT/ Enhancer binding protein beta (C/EBP β)와 C/EBP δ 에 작용하게 됨으로서 시작된다 (Smith *et al.*, 1988).

AMP-activated protein kinase (AMPK)는 serine/threonine kinase의 일원으로

세포 내 에너지 상태를 감지하는 일종의 ‘에너지 센서’ 역할을 하는 효소로서 (Ruderman and Prentki 2004; Winder and Hardie, 1999), 세포내 스트레스, 절식, 운동 또는 AMP:ATP 비율의 변화뿐만 아니라 지방세포 분비물질인 아디포넥틴 (Wu *et al.*, 2003), 렙틴 (Orci *et al.*, 2004) 등의 adipokine에도 민감하게 반응하여 활성화 된다. 활성화된 AMPK는 ATP를 소비하는 과정 (e.g. 지방산 합성, 당 생성 등)을 억제하는 반면 ATP를 생산하는 과정 (e.g. 지방산 산화와 해당과정)을 촉진하여 에너지 항상성을 조절한다 (Lee *et al.* 2006; Hardie 2007). AMPK의 구조는 하나의 catalytic α subunit ($\alpha 1$ 또는 $\alpha 2$)과 두 개의 regulatory subunit β ($\beta 1$ 또는 $\beta 2$)와 γ ($\gamma 1$, $\gamma 2$ 또는 $\gamma 3$)로 이형삼합체 구조를 이루고 있다 (Towler and Hardie 2007; Carling 2004). AMPK는 AMPKK (AMPK-Kinase)인 LKB1에 의해 α subunit의 catalytic domain에 위치한 threonine 172 잔기 (Thr172)가 인산화 됨으로서 활성화된다 (Hawley *et al.* 1996; Stein *et al.* 2000). 활성화된 AMPK의 표적 단백질인 acetyl-CoA carboxylase (ACC)는 지방형성과정 (lipogenesis)의 주요 효소로서 acetyl-CoA로부터 malonyl-CoA를 합성하는 역할을 한다 (Sim and Hardie 1988). 활성화된 AMPK에 의한 ACC의 Ser79 잔기의 인산화는 ACC 효소 활성을 저해하며, 결과적으로 AMPK 활성화는 malonyl-CoA 합성을 억제하여 중성지방의 합성을 감소시킨다 (Park *et al.* 2002). 또한 AMPK 활성화는 미토콘드리아와 존재하는 Uncoupling proteins (UCPs)와 peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator-1 α (PGC-1 α)를 활성화 시켜 미토콘드리아의 생성 (mitochondrial biogenesis)을 증가시키고 (Orci *et al.* 2004), malonyl-CoA의 합성저하를 통해 지방산을 미토콘드리아로 운반하는 carnitine palmitoyl transferase-1 (CPT-1)의 활성을 증가시켜 지방산의 β -산화 (fatty acid β -oxidation)를 증가시킨다 (Rossmeis *et al.* 2002).

한편 AMPK 활성화제인 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR)는 간접적인 경로를 통해 지방세포 분화의 마커인 fatty acid synthase (FAS), PPAR γ 및 C/EBP α 의 발현을 억제하고 (Habinowski and Witters 2001; Dagon *et al.*, 2006), cAMP-dependent protein kinase A (PKA)에 의해 활성화된 Hormone-sensitive lipase (HSL)의 Ser565 잔기를 인산화 시킴으로서 지방분

해를 억제한다 (Daval *et al.* 2005). 또한 AICAR는 인슐린에 무관하게 glucose transporter 4 (GLUT4) 단백질의 세포막으로의 이동과 세포내로 포도당 유입을 증가시킴으로서 인슐린 저항성을 개선하는 효과를 나타낸다고 보고되었다 (Kahn *et al.*, 2004; Merrill *et al.*, 1997; Yamaguchi *et al.*, 2005).

최근 들어 AMPK는 비만 및 제 2형 당뇨병의 치료의 주 표적분자로서 대두되고 있으며, 실제로도 당뇨병 치료제인 Metformin (Zhou *et al.* 2001) 이나 Thiazolidinediones (TZDs) (Ye *et al.* 2006; Kubota *et al.* 2006)은 직·간접적으로 AMPK를 활성화시킨다고 보고되어 있다. 따라서 AMPK를 활성화 경로를 통한 천연물 유래 항비만 신소재 개발 필요성이 증대되고 있다. 본 연구는 제주 연안의 해조류로부터 AMPK 활성화 천연물을 탐색하여 그 작용 기전을 구명하는 연구의 일환으로 수행하였다.

꼬물꼬시래기 [*Gracilaria vermiculophylla* (Ohim) Papenfuss)는 우리나라를 비롯하여 일본, 사할린, 타이완 등 세계각지에 분포하고 있으며, arachidonic acid 나 eicosapentaenoic acid 등의 불포화지방산이 풍부하여 주로 한천의 원료나 식용으로 이용되는 홍조류이다 (Imb *et al.*, 2001). 꼬물꼬시래기에서 항산화 효과 (Shin *et al.*, 2008), 항염증 효과 (Dang *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009)와 세포사멸효과 (Miao *et al.*, 2008)등의 생리활성에 대한 보고는 있지만 대사질환과 관련된 연구는 아직 보고된 바가 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 꼬물꼬시래기의 에탄올 추출물 및 용매 분획층, 특히 에틸아세테이트 분획층의 AMPK 활성화 기전을 조사하기 위해서 수행 되었다.

II. 재료 및 방법

1. 시료의 추출 및 분획

본 연구에 사용된 꼬물꼬시래기는 2010년 3월 제주도 동귀 지역의 조간대에서 채집하였다. 채집한 시료는 수돗물로 수세하여 염분을 제거하고 음지에서 건조한 후, 분쇄하여 분말을 획득하였다. 시료의 에탄올 추출물을 얻기 위하여 200 g의 분말을 2 l의 80% 에탄올에 48시간 추출하고 감압여과 하였다. 여과에서 남은 잔사는 같은 양의 80% 에탄올을 첨가하여 2차 추출한 후, 1차 추출물과 함께 감압회전농축기 (Buchi, R-200, Switzerland)로 농축하였다. 농축액에서 에탄올을 제거한 후 얻은 추출물은 동결건조 하여 분획 또는 세포 실험에 사용하였다. 에탄올 추출물의 용매 분획은 추출물에 물을 첨가하여 현탁시킨 후, 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 순으로 각각 3회씩 반복 수행하여 수득한 분획층을 감압농축 및 동결건조 하여 획득하였다. 80% 에탄올 추출물, 헥산 분획층, 에틸아세테이트 분획층은 DMSO에, 부탄올과 물 분획층은 phosphate buffered saline (PBS)에 녹여 세포실험에 사용하였다.

2. 세포 배양

Mouse 유래 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)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 수행하였다. 세포는 T-75 cell culture flask 바닥에 세포가 70% 정도 찼을 때 계대 배양하였다.

3. 세포 증식률 측정 (MTT assay)

시료가 세포의 성장에 미치는 영향을 측정하기 위하여 MTT 분석을 수행하였다. MTT 분석은 Zhang *et al* (2002)의 방법을 수정하여 수행하였다. 3T3-L1 전구지방세포를 1.0×10^4 cells/well의 수로 96 well micro plate에서 48시간 배양

후 10% bovine calf serum (BCS)에 희석한 각 시료를 농도별 (에탄올 추출물, 부탄올 분획층, 물 분획층 : 6.25, 12.5, 25, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 헥산, 에틸아세테이트 분획층 : 3.125, 6.25, 12.5, 25 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하였다. 세포를 48시간 배양 후 배양액에 2 mg/ml 농도의 3-(4,5-dimethylthiazol)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Amresco, USA) 용액을 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도가 되게 첨가하여 4시간 동안 배양한 후 배지를 제거하였다. 세포내에 생성된 formazan의 양은 200 μl 의 dimethylsulfoxide (DMSO; Amresco, USA)를 가하여 용해시킨 후 microplate reader (Bio-tek, USA)로 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 증식률은 시료를 처리하지 않은 대조군의 흡광도 값과 비교하여 다음의 식으로 산출하였다.

$$\text{Cell Viability (\%)} = 100 - [(\text{Control OD}_{540} - \text{Sample OD}_{540}) / \text{Control OD}_{540} \times 100]$$

4. 분화 유도 및 시료처리

지방세포로 분화 유도는 Harmon and Harp (2001)의 방법을 변형하여 수행하였다. 3T3-L1 전구세포를 10% BCS와 1% P/S가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 6 well cell culture plate (1.6 또는 2.0×10^5 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 μM dexamethasone (DEXA.; Sigma, USA), 0.5 μM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX; Sigma, USA) 및 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인슐린 (Sigma, USA)이 함유된 DMEM 배지]로 교환하여 2일간 (분화유도 2일째) 분화 유도하였다. 지방세포 분화에 미치는 꼬물꼬시래기 에탄올 추출물 및 분획층의 영향을 분석하기 위하여 분화유도 시 (day 0)에 각 시료를 농도별 (에탄올 추출물: 2, 10, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 헥산 및 에틸아세테이트 분획층: 1, 5, 25 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 분화유도배지에 첨가하였다. 분화유도 2일 후에 세포 배양액을 10% FBS, 1% P/S 및 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인슐린이 포함된 DMEM 배지로 교환하였고, 분화유도 4일째부터는 세포 배양액을 인슐린만 제거한 DMEM 배지로 2일 마다 교환하였다.

그리고 꼬물꼬시래기 에틸아세테이트층의 AMP-activated protein kinase (AMPK) 및 그 substrate인 Acetyl Co-A carboxylase (ACC)의 인산화와 그 하위 유전자 발현에 미치는 영향을 분석하기 위하여 지방세포의 분화를 다음과 같이 수행하였다. Confluent 상태 (분화유도 0일째)의 세포를 10% FBS, 1% P/S, 1 μ M DEXA., 0.5 mM IBMX 및 5 μ g/ml 인슐린이 포함된 DMEM 배지에서 2일간 분화유도 하였다. 분화유도 2일 후 배지를 10% FBS, 1% P/S 및 5 μ g/ml 인슐린이 포함된 DMEM 배지로 교환해주고, 다시 2일 후 (분화유도 4일째) 부터는 실험에 사용할 때까지 2일 마다 10% FBS와 1% P/S가 포함된 DMEM 배지로 교환하였다. 분화유도 8-10일째에 배양용기에서 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)로 2번 세척한 후 DMEM 배지로 교환하여 무혈청 상태 (serum-free stavation) 6시간 배양한 후 50 μ g/ml의 에틸아세테이트 분획층을 시간별 (0, 1, 3, 6, 12 및 24시간) 또는 농도별 (1, 5, 25 및 50 μ g/ml)로 12시간 동안 처리하여 AMPK 및 ACC의 인산화를 확인하였다.

5. Oil-Red O 염색

Oil Red O 염색 및 정량 분석은 Cho 등 (2003)의 방법으로 수행하였다. 분화유도 7-9일째 된 세포를 PBS로 2회 세척하고 PBS에 희석된 3.7% formalin [37% formaldehyde solution (Sigma, USA) 1/10으로 희석]으로 1시간 동안 고정 한 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 염색 후 증류수로 3회 세척하여 현미경하에서 관찰하였다. 염색된 지방소적의 함량을 정량하기 위해서 4% NP-40 (Amresco, USA)이 포함된 isopropanol를 첨가하여 Oil Red O를 다시 용해시킨 후 micro reader로 520nm에서 흡광도를 측정 하였다.

6. Free Glycerol release 측정

Free glycerol 함량은 free glycerol reagent kit (Sigma, USA)를 사용하여 측정하였다. 3T3-L1 전구 지방세포를 분화유도 방법에 따라 8일간 배양하여 분화

시킨 후, 에틸아세테이트 분획층을 48시간 동안 농도별 (0, 2, 10 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하였다. free glycerol 측정 시약 0.4 ml에 배양액 5 μl 를 넣고 10분간 37°C에서 반응시켰고 micro reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Free glycerol 정량을 위해서는 Standard glycerol solution (Sigma, USA)을 0, 4.0625, 8.125, 16.25, 32.5, 65, 130 및 260 μg glycerol/ml의 농도로 만들어 위와 동일하게 반응시켜 정량하였고, 3회 반복 실험하였다.

7. RNA 분리 및 real-time PCR

real-time PCR을 위한 total RNA는 분화유도 8일째 세포에 48시간동안 농도별 (2, 10 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리한 후 세포를 수거하여 분리하였다. Trizol Reagent (Invitrogen, USA)를 500 μl 첨가하여 상온에서 5-10 분간 세포를 균질화한 후, 튜브로 옮기고 chloroform 100 μl 를 첨가하여 원심분리 (12,000 \times g, 15분) 하였다. 상층액을 회수하여 새로운 튜브로 옮기고 동량의 isopropanol을 첨가하여 원심분리(12,000 \times g, 15분)하여 RNA를 침전시켰다. 침전된 RNA는 75% 에탄올로 3회 세척하고 건조시킨 후 DEPC 처리된 증류수에 용해시킨 후 nanodrop 2000 spectrometer (Nanodrop, USA)를 이용하여 260 nm의 흡광도를 측정하여 정량하였다. A260 / A280 nm 의 비율이 1.8-2.2 범위 내의 값을 갖는 RNA 시료를 DNase (Wako, Japan)를 처리하여 순수한 RNA만을 분리하여 실험에 사용하였다.

cDNA는 Maxime RT PreMix Kit (iNtRON Biotechnology, Korea)를 이용하여 합성하였다. 1 μg total RNA와 nuclease-free water를 총 20 μl 가 되게 tube에 넣고 45°C 60분, 95°C에서 5분간 반응하여 cDNA를 합성한 후 여기에 30 μl 의 nuclease-free water를 첨가하여 희석한 후 PCR에 사용하였다.

Real-time PCR은 5 μl 의 cDNA, 각 primer는 0.4 μl (10 pmol/L/ μl)씩, 2 μl nuclease-free water와 6 μl iQTM SYBR[®] Green Supermix (Bio-rad, USA)를 혼합한 후 Peltier thermal cycler (Bio-rad, USA) real time PCR 기기를 이용하여 수행하였다. PCR 조건은 95°C/20초, 65°C/20초, 72°C/30초로하여 49회 증폭하였고 결과는 1회 증폭할 때 마다 형광량을 측정하여 그 결과를 얻었으며, 모든 cycle이 완료된 후 65°C에서 95°C까지 반응시켜 primer의 melting curve를 분석

하였다. 결과 분석은 Chromo4 Real-Time PCR Detection System v1.10 (Bio-rad, USA)을 이용하여 β -actin 대비 상대적 값으로 정량하였다. Real-time PCR에서 사용된 primer의 염기서열을 Table 1.에 나타내었다.



Table 1. The primer sequences of the genes used in real-time PCR analysis and the expected size of their PCR products

Gene		Primer Sequence	Product size (bp)
PGC-1 α	Forward	5'-CTC AAA GAC CCC AAA GGA TG-3'	157 bp
	Reverse	5'-CGG TGT CTG TAG TGG CTT GA-3'	
CPT-1 α	Forward	5'-ACC CTG AGG CAT CTA TTG ACA-3'	174 bp
	Reverse	5'-TGA CAT ACT CCC ACA GAT GGC-3'	
UCP2	Forward	5'-GGT CGG AGA TAC CAG AGC AC-3'	172 bp
	Reverse	5'-TGA GGT TGG CTT TCA GGA GA-3'	
β -actin	Forward	5'-AGG CTG TGC TGT CCC TGT AT-3'	395 bp
	Reverse	5'-ACC CAA GAA GGA AGG CTG GA-3'	



8. Western blot

Western blot 분석을 위해 시료가 처리된 지방세포를 PBS로 2회 세척 후 1 mM PMSF, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM 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 단백질을 분리 시약을 이용해 1시간 동안 vortexing 하여 분해시킨 후 원심분리 (15000 rpm, 4°C, 20분)하여 상층액을 획득하였다. 단백질 농도는 Bio-rad protein assay kit (Bio-rad, USA)를 사용하여 micro reader로 595nm에서 흡광도를 측정하고 정량하였다. 35 μg 의 단백질을 10% (PPAR γ , C/EBP α , phospho-AMPK, AMPK α , LKB1, phospho-LKB1 및 β -actin), 6% (phospho-ACC) 혹은 15% (aP2) SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동으로 분리한 후 poly vinylidene difluoride (PVDF) membrane (Milipore, USA)에 전이 (100 V, 120분)시켰다. 단백질이 전이된 PVDF membrane은 상온에서 1시간 동안 5% skim milk 또는 5% BSA를 함유한 0.1% Tween 20이 포함된 Tris buffered saline (TTBS) 용액으로 blocking 시킨 후, 1차 항체와 반응시켰다. 단백질 분석을 위해 사용된 1차 항체는 PPAR γ antibody (1:500, Santa Cruz, USA), C/EBP α antibody (1:1,000, Santa Cruz, USA), p-AMPK antibody (1:2,000, Cell Signaling, USA), AMPK α antibody (1:5,000, Cell Signaling, USA), p-ACC antibody (1:1,000, Cell Signaling, USA), LKB1 and p-LKB1 antibody (1:1,000, Santa Cruz, USA), A-FABP antibody (aP2; 1:5,000, Santa Cruz, USA), β -actin antibody clone AC-74 (1:10,000, Sigma, USA) 등이며 4°C에서 하루 밤 동안 수행하였다. 1차 항체 반응이 끝난 membrane은 0.1% TTBS 용액으로 세척한 후 peroxidase-conjugated된 2차 항체 (Jackson ImmunoResearch, USA)를 1:2,000, 1:5,000 혹은 1:10,000으로 희석하여 1시간 동안 반응한 후 TTBS로 세척하였다. 각 단백질의 발현은 WEST-ZOL western blot detection system (iNtRON Biotechnology, Korea)로 반응시켜서 X-ray 필름 (Ortho CP-G plus; Agfa Gevaert N.V., Belgium)으로 검출하였다.

9. Glucose uptake 분석

시료가 세포내로 당흡수 (glucose uptake)에 미치는 영향을 알아보기 위하여 ^3H 로 표지된 2-Deoxy-D glucose (2-DOG)를 사용하여 glucose uptake 분석을

시행하였다. 실험에 사용된 3T3-L1 지방세포를 위에서 설명한 방법과 같이 12 well culture plate에 분화유도를 시킨 후 8 - 10일 째에 실험에 사용하였다. 분화 된 지방세포는 혈청이 미첨가된 serum-free 배지로 2회 세척한 후 동일한 배지를 1 ml 첨가하여 37 °C에서 2-6 시간 절식 배양하였다. 이렇게 배양된 세포를 Krebs-Ringer-Hepes (KRH) buffer [20 mM Hepes, 136 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.25 mM MgSO₄, 1.25 mM CaCl₂, (pH 7.4)]로 2회 세척하여 배지를 제거하고 동일한 buffer에 녹인 시료 (2, 10 및 50 µg/ml)를 첨가하여 1시간 배양한 후, 100 µl의 KRH buffer에 희석한 인슐린 100 nM을 처리하여 20분간 배양하고, 37 MBq 2-deoxy-D-[³H]-glucose (Amersham Biosciences, Sweden)와 1 mM 2-Deoxy-D-glucose (Sigma, USA)의 혼합물을 100 µl에 최종 농도가 각각 3.7 MBq와 0.1 mM이 되게 첨가하여 20분간 배양하였다. 배양액을 제거하고 차가운 PBS로 3회 세척한 후, 세포내로 흡수된 2-DOG의 양을 측정하기 위해 1% Triton X-100 lysis buffer를 1 ml 첨가하여 약 10분간 37°C에서 배양한 후, 세포내의 방사능을 Liquid Scintillation Counter (Tri-Carb 2700TR Packard, Meriden, CT, USA)를 이용하여 측정하였다.

10. 세포내 ROS 측정

세포 내 활성산소종은 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydro fluorecein diacetate acetyl ester (CM-H2DCFDA; Molecular Probes, Eugene, OR, USA)로 Hwang 등 (2005, 2007)의 방법에 따라 ROS를 염색하여 확인하였다. 분화유도된 3T3-L1 지방세포를 0.1% BSA가 함유된 DMEM 배지에 6시간 동안 절식배양 시키고 DMEM에 희석시킨 시료 (GEFr, *N*-acetylcystein)를 각 농도별 (GEFr; 0, 10 및 50 µg/ml, *N*-acetylcystein; 5 mM)로 12시간 동안 처리하였다. 시간 경과 후 세포는 PBS로 2회 세척하고 3.7% formaldehyde로 15분간 고정한 후, well 마다 최종 10 µM의 농도가 되도록 CM-H2DCFDA를 넣고 빛을 차단한 상태에서 30분간 상온에서 염색한 후, 형광현미경을 이용하여 확인하였다.

11. 통계처리

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

III. 결 과

1. 꼬물꼬시래기 에탄올 추출물의 전구지방세포 분화유도 억제 효과

우선 꼬물꼬시래기 에탄올 추출물 (GVE)의 3T3-L1 전구지방세포에 대한 세포 독성 여부를 확인하기 위하여 MTT 분석을 수행하였다. 3T3-L1 전구지방세포에 꼬물꼬시래기 에탄올 추출물을 농도별 (0, 6.25, 12.5, 25, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리한 결과, 모든 처리군에서 세포독성은 나타나지 않았다 (Figure 1). 오히려 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서부터 증식률이 유의적으로 증가하는 양상을 보여 GVE 처리가 세포독성에 영향을 미치지 않는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 최고 농도로 하여 세포 실험을 수행하였다.

3T3-L1 전구지방세포의 분화에 미치는 GVE의 영향을 알아보기 위하여 분화유도 시에 분화유도물질과 GVE (2, 10, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 동시 처리하여 분화유도 후 Oil Red O 염색으로 지방소적을 관찰하였다. Figure 2A에서 보는 바와 같이 GVE가 처리된 실험군에서는 지방소적이 농도 의존적으로 감소됨을 확인할 수 있었다. Oil Red O 염색의 강도를 정량화 한 결과, 2, 10, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 GVE를 처리한 실험군은 시료를 처리하지 않은 양성대조군 ($100\pm 18.0\%$)에 비해 106.9 ± 19.4 , 91.3 ± 18.5 , 15.6 ± 2.8 및 $13.7\pm 0.6\%$ 의 값을 나타내었다 (Figure 2B). GVE는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서부터 3T3-L1 전구지방세포의 분화를 유의적으로 저해하였다 (Figure 2B). GVE에 의한 형태적인 지방소적 형성 억제 효과를 분자적 수준에서 확인하기 위하여 지방세포 분화 관련 단백질들의 발현을 Western blot으로 분석하였다. GVE를 처리한 실험군에서 지방세포 분화를 조절하는 핵심 전사인자인 peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ), CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α), 그리고 지방세포 분화 마커인 fatty acid binding protein (aP2)의 발현이 대조군에 비해 농도 의존적으로 감소됨을 확인할 수 있었다 (Figure 3)

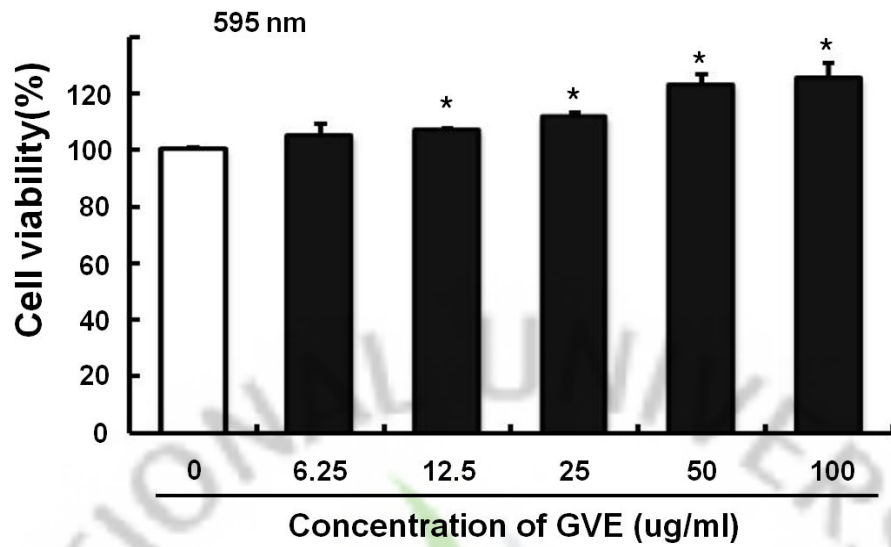
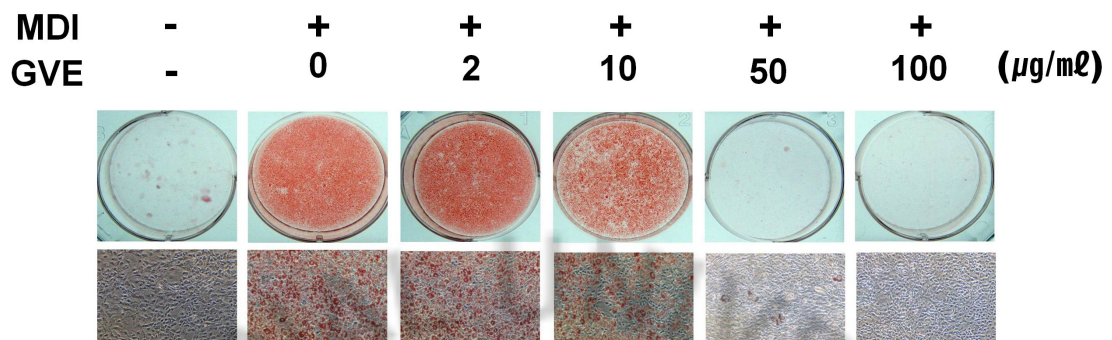


Figure 1. The effect of *Gracilaria vermiculophylla* extract (GVE) on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes. Preconfluent preadipocytes were treated with various concentration of GVE (0, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 48 hours. Cell viability was measured by MTT assay. 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, positive control (DMSO). (* $P < 0.05$ compared to positive control)

A



B

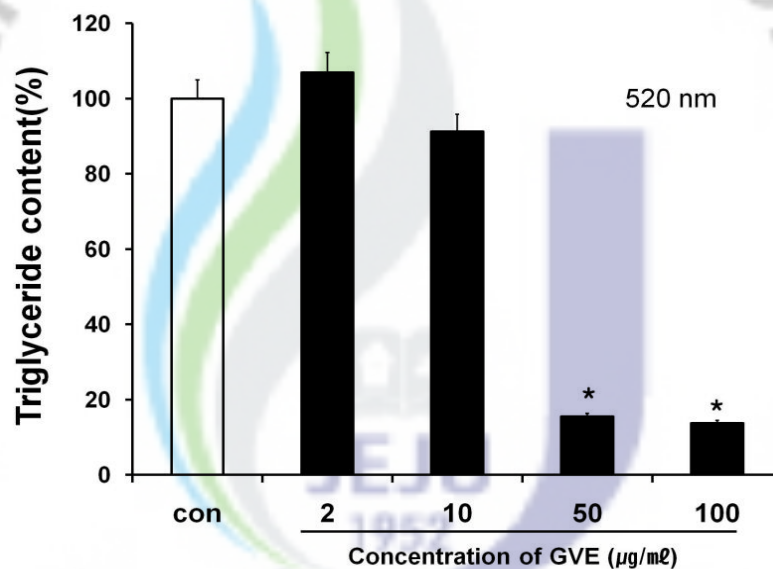


Figure 2. The effect of *G. vermiculophylla* extract (GVE) on lipid accumulation of 3T3-L1 cells during adipogenesis. 3T3-L1 cells were differentiated in the presence of GVE and MDI differentiation medium from day 0 to day 2. Differentiated adipocytes were stained with Oil Red O at day 8. (A) Macroscopic pictures of stained cells. (B) Triglyceride contents. Lipid accumulation is assessed by the quantification of OD_{520} as described in Materials and Method. MDI, 0.5 mM IBMX, 1 μM DEXA, and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Insulin. (* $P < 0.05$ compared to positive control)

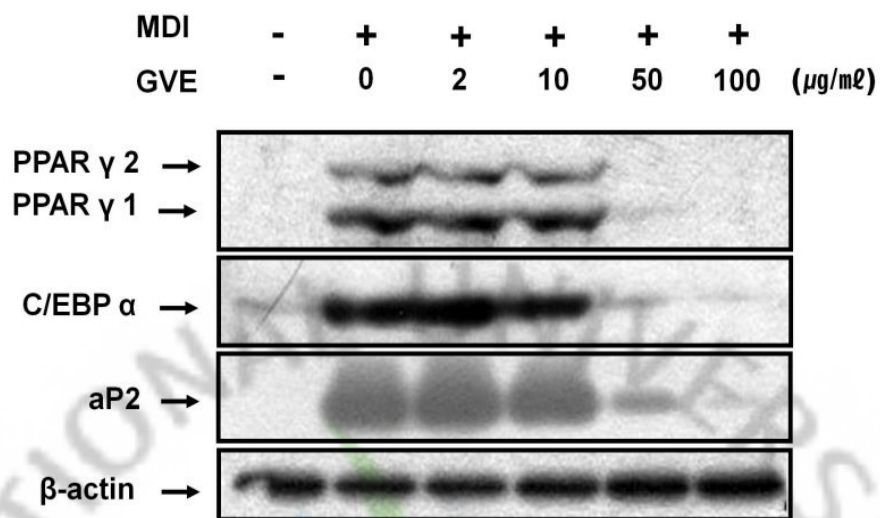


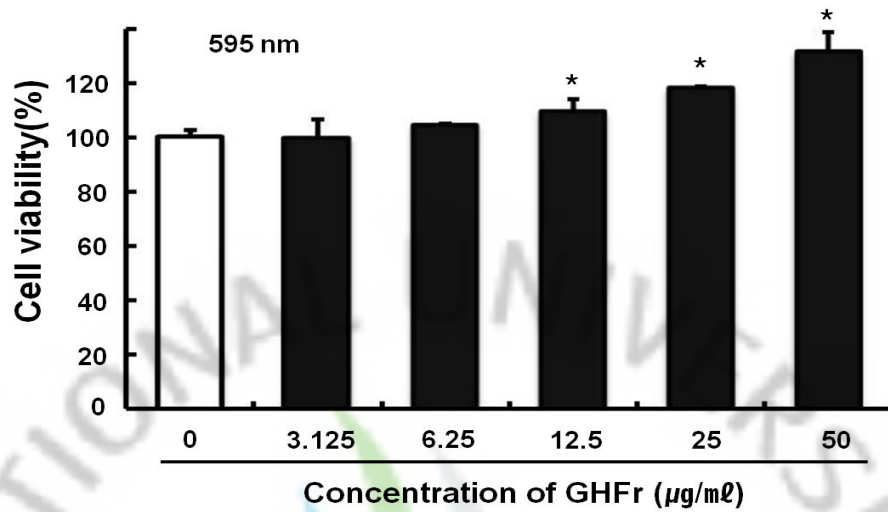
Figure 3. Western blot analysis of PPAR γ , C/EBP α and aP2 in 3T3-L1 cells treated with GVE. 3T3-L1 cells were differentiated for 6 day in the presence of MDI differentiation medium and GVE. MDI; 0.5 mM IBMX, 1 μM DEXA, and 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin.

2. 꼬물꼬시래기 추출물 분획층의 전구지방세포 분화 억제 활성

GVE의 전구지방세포 분화 억제 활성 성분들을 함유하는 분획물을 동정하기 위하여 GVE를 용매분획한 후 각 분획물의 세포독성을 MTT 분석으로 확인하였다. 헥산 (GHFr)과 에틸아세테이트층 (GEFr)을 3.125, 6.25, 12.5, 25 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 전구지방세포에 처리하였을 때, GHFr은 이들 농도에서 각각 100 ± 1.2 , 99.3 ± 6.7 , 104.7 ± 1.0 , 109.8 ± 4.3 , 118.9 ± 1.3 및 $133.1\pm 6.6\%$ 의 증식률을, GEFr은 이들 농도에서 각각 100 ± 1.0 , 117.7 ± 5.0 , 119.3 ± 1.2 , 118.5 ± 2.2 , 120.1 ± 1.0 및 $120.3\pm 2.3\%$ 의 증식률을 나타내어 두 분획물 모두에서 세포독성이 관찰되지 않았다 (Figure 4). GHFr의 경우 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서부터 유의적인 증가를 보였고 (Figure 4A), GEFr은 3.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서부터 유의적인 세포 증식효과를 나타내었다 (Figure 4B). 두 분획층 모두 처리한 농도범위에서 세포독성이 없다고 판단되어 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도를 최고 처리 농도로 세포 실험을 진행하였다.

3T3-L1 전구지방세포 분화유도와 함께 GHFr과 GEFr을 각각 1, 5, 25 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하여 두 분획층의 분화 억제 효과를 비교하였다. GHFr을 처리한 실험군에서는 가장 낮은 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서부터 지방소적의 감소를 확인할 수 있었고, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 부터 그 이상의 농도에서는 매우 효과적으로 지방소적의 축적을 억제함을 확인하였다 (Figure 5A). 또한 지방소적을 정량적으로 분석한 Figure 5B의 결과에서와 같이 GHFr을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리한 군에서부터 대조군에 비해 유의적인 지방소적 감소 효과를 나타냄을 확인하였다. 그리고 GEFr의 경우에는 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 세포에서부터 대조군에 비해 지방소적의 형성을 현저하게 억제하였다 (Figure 6A). 정량적인 분석에서도 대조군에 비해 모든 처리군에서 유의적으로 지방소적 생성을 억제함을 확인하였다 (Figure 6B). GHFr과 GEFr의 지방축적 억제 활성을 PPAR γ , C/EBP α , aP2 단백질 발현 수준에서 확인해본 결과, GHFr의 경우 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 군에서 (Figure 7A), GEFr의 경우에는 시료를 처리한 모든 군에서 단백질 발현이 감소하는 결과를 나타내었다 (Figure 7B).

A



B

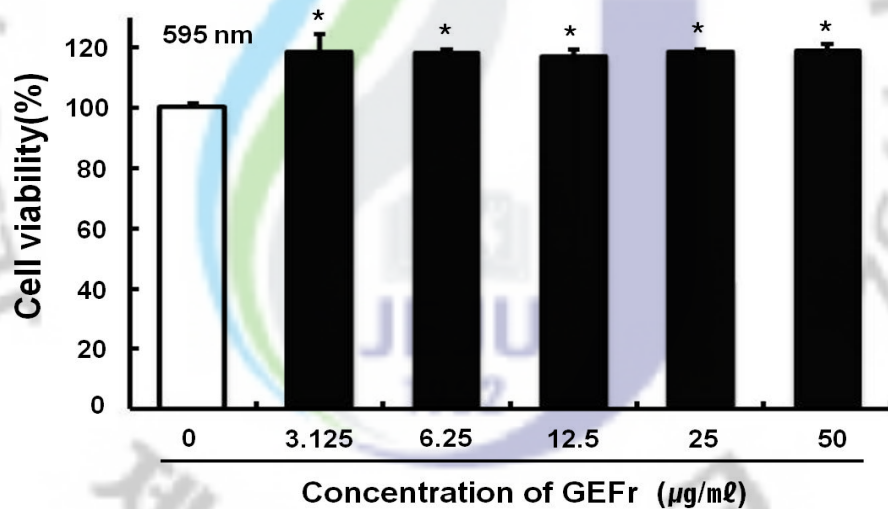
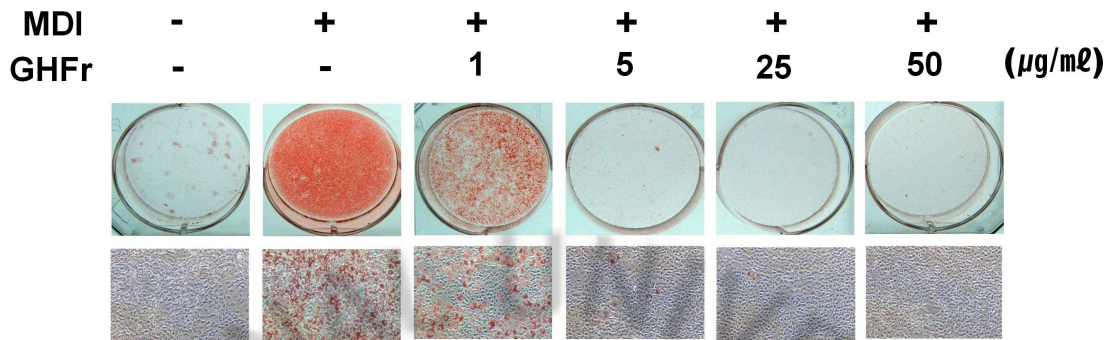


Figure 4. The effect of *G. vermiculophylla* hexane fraction (GHFr) and ethyl acetate fraction (GEFr) on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes. Preconfluent preadipocytes were treated with various concentration of (A) GHFr and (B) GEFr (0, 3.125, 6.25, 12.5, 25 and 50 $\mu\text{g/ml}$) for 48 hours. Cell viability was measured by MTT assay. 0 $\mu\text{g/ml}$; positive control (DMSO). (* $P < 0.05$ compared to positive control).

A



B

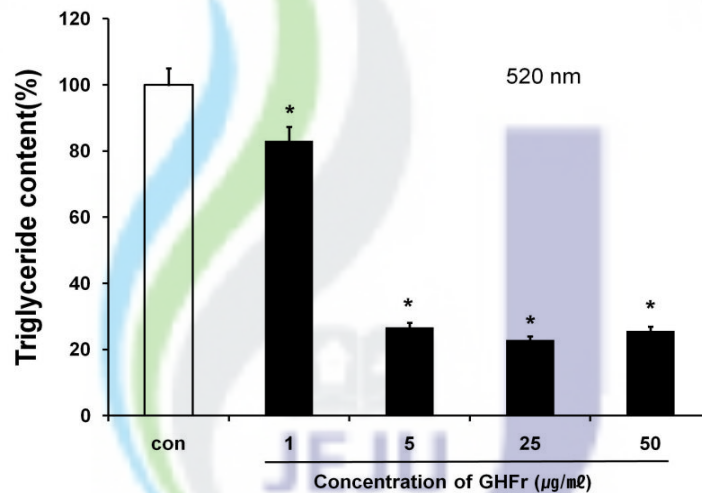
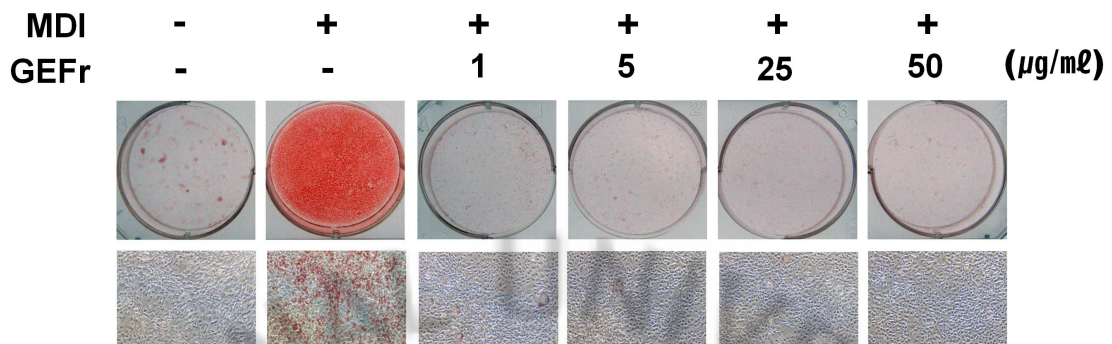


Figure 5. The effect of *G. vermiculophylla* hexane fraction (GHFr) on lipid accumulation of 3T3-L1 cells during adipogenesis. 3T3-L1 cells were differentiated in the presence of GHFr and MDI differentiation medium from day 0 to day 2. Differentiated adipocytes were stained with Oil Red O at day 8. (A) Macroscopic pictures of stained cells. (B) Triglyceride contents. Lipid accumulation was assessed by the quantification of OD_{520} as described in Materials and Method. MDI, 0.5 mM IBMX, 1 μM DEXA, and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Insulin. (* $P < 0.05$ compared to positive control)

A



B

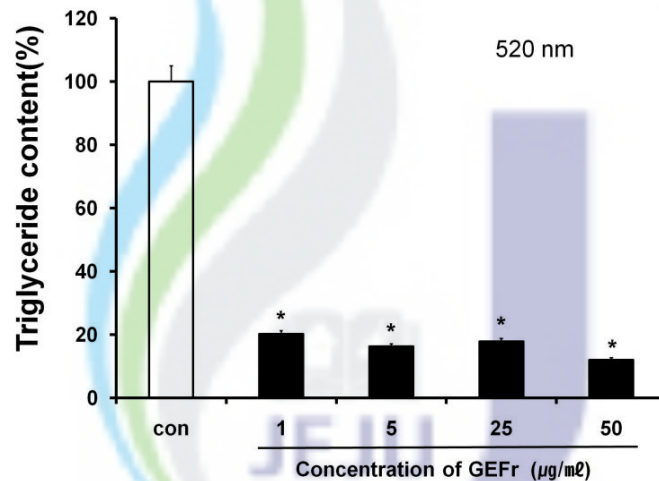
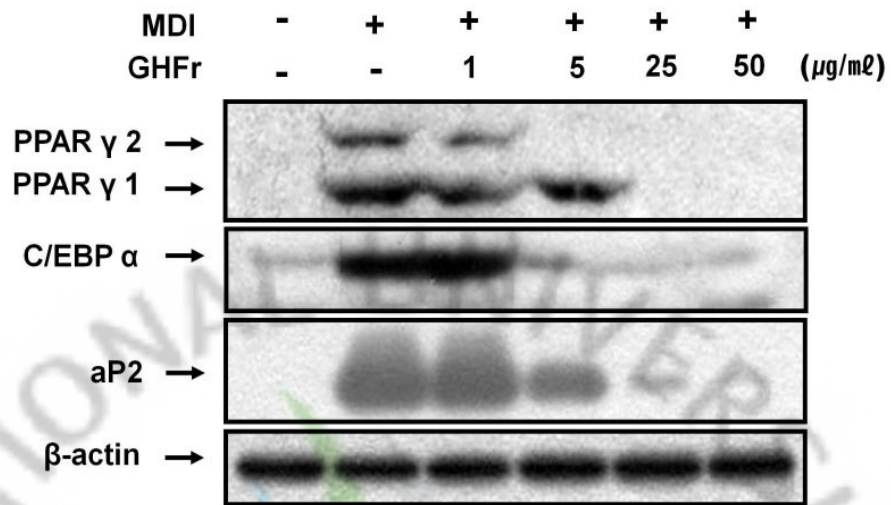


Figure 6. The effect of *G. vermiculophylla* ethyl acetate fraction (GEFr) on lipid accumulation of 3T3-L1 cells during adipogenesis. 3T3-L1 cells were differentiated in the presence of GEFr and MDI differentiation medium from day 0 to day 2. Differentiated adipocytes were stained with Oil Red O at day 8. (A) Macroscopic pictures of stained cells. (B) Triglyceride contents. Lipid accumulation was assessed by the quantification of OD_{520} as described in Materials and Method. MDI, 0.5 mM IBMX., 1 μM DEXA. and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Insulin. (* $P < 0.05$ compared to positive control)

A



B

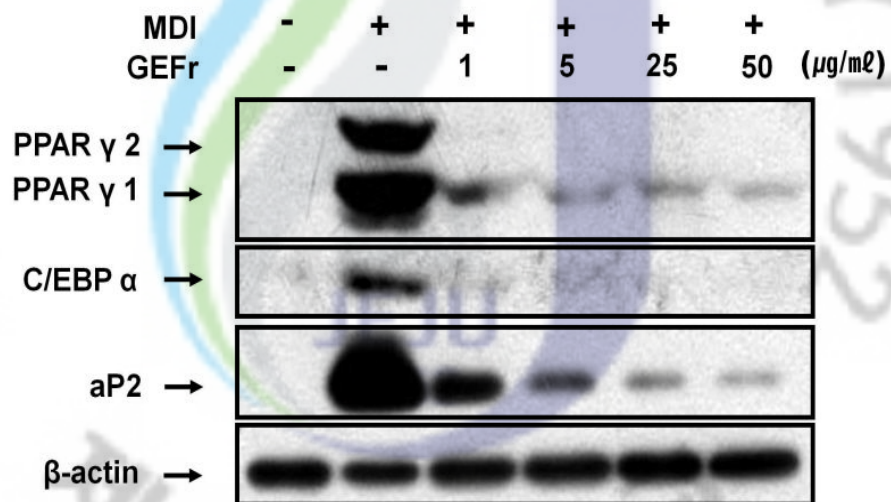


Figure 7. Western blot analysis of PPAR γ , C/EBP α and aP2 in 3T3-L1 cells treated with GHFr GEFr. 3T3-L1 cells were differentiated for 6 day in the presence of MDI differentiation medium, GHFr and GEFr. MDI; 0.5 mM IBMX., 1 μM DEXA. and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin.

3. 꼬물꼬시래기 에틸아세테이트 분획층 (GEFr)이 AMPK 신호전달에 미치는 영향

1) AMPK 인산화 유도 활성화

앞선 실험에서 꼬물꼬시래기 용매분획 중에 에틸아세테이트 분획층 (GEFr)이 지방세포 분화 억제활성이 가장 우수함을 확인하였다. 그래서 GEFr이 AMP-activated protein kinase (AMPK) 신호전달에 어떠한 영향을 미치는지 조사 하였다. 우선 충분히 분화된 지방세포에 GEFr (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리하여 시간별 (1, 3, 6, 12 및 24 시간)로 AMPK 인산화 정도를 분석하였다. 지방세포에 GEFr을 처리한 후 12시간부터 AMPK와 그 기질인 acetyl-CoA carboxylase (ACC)가 인산화 되고 있음을 확인할 수 있었다 (Figure 8A). 또한 지방세포에 GEFr을 12시간 동안 농도별 (0, 1, 5, 25 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리했을 경우도 AMPK의 인산화가 농도 의존적으로 증가하였음을 확인하였다 (Figure 8B). 그러나 AMPK의 인산화와 더불어 ACC의 인산화 역시 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군 부터 농도가 증가함에 따라 증가하였으나 그 이상의 농도 (25 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서는 더 이상 증가하지 않았다 (Figure 8B).

2) LKB1 인산화와 ROS 생성

AMPK의 활성화는 upstream AMPK-Kinase로도 알려진 LKB1에 의해 AMPK의 α -subunit의 Thr172 위치의 잔기가 인산화 됨으로써 이루어진다고 알려져 있기 때문에 (Hurley et al; 2005). LKB1의 인산화를 western blot을 통해 확인하였다. 분화 유도된 지방세포에 GEFr을 각각 0, 1, 5, 25 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 결과 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서부터 LKB1의 인산화가 유의하게 증가하는 것을 확인 할 수 있었다 (Figure 9A).

또한, Reactive Oxygen Species (ROS)는 세포 내 산화적 스트레스로 작용하여 AMPK를 활성화 시키는 인자로 알려져 있기 때문에, GEFr이 ROS 생성에 미치는 영향을 확인하였다. 분화된 지방세포에 10, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 GEFr을 처리하였을 때 생성되는 ROS를 DCFH-DA 형광염색을 통해 알아본 결과, 농도 의존적으로 ROS가 증가하였다 (Figure 9B). 그리고 ROS의 생성이 GEFr의 처리에 의한 효과인지를 확인하기 위해 항산화제로 알려진 *N*-acetylcysteine (NAC)을 함께 처리한 결과 ROS의 생성이 감소하는 결과를

나타내었다.

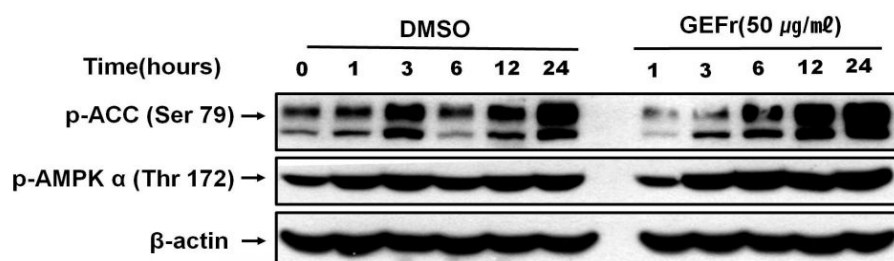
3) 지방산 β -산화 관련 유전자 발현 효과

AMPK 활성화는 지방산의 β -산화를 촉진한다고 알려져 있기 때문에, GEFr 처리에 따른 지방산 β -산화 관련 유전자 (*CPT-1a*, *UCP2*, *PGC-1a*)의 발현을 real-time PCR 기법으로 분석하였다. *CPT-1a*과 *UCP2*의 경우 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 GEFr을 처리한 군에서 대조군으로 DMSO를 처리한 군에 비해 mRNA의 발현이 증가하였음을 확인할 수 있었지만 (Figure 10 A, B), 미토콘드리아의 생성에 관여하는 *PGC-1a* mRNA의 경우에는 오히려 발현이 감소함을 확인할 수 있었다 (Figure 10C).

4) 당 흡수 (glucose uptake)와 지방분해 (lipolysis) 효과

지방세포에서 ^3H 로 표지된 2-deoxy-D-glucose를 이용한 glucose uptake 실험을 통해 GEFr이 당 흡수 (glucose uptake)에 미치는 영향을 확인하였다. 분화된 지방세포에 GEFr을 각각 2, 10 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 결과 인슐린 없이 시료를 처리한 군, 인슐린과 함께 시료를 처리한 군 모두에서 유의한 영향을 나타내지 않아 GEFr은 지방세포의 당 흡수에는 아무런 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다 (Figure 11A). 그러나 GEFr은 지방세포에서 배지로 glycerol 방출을 농도 의존적으로 증가시키는 지방분해 활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다 (Figure 11B).

A



B

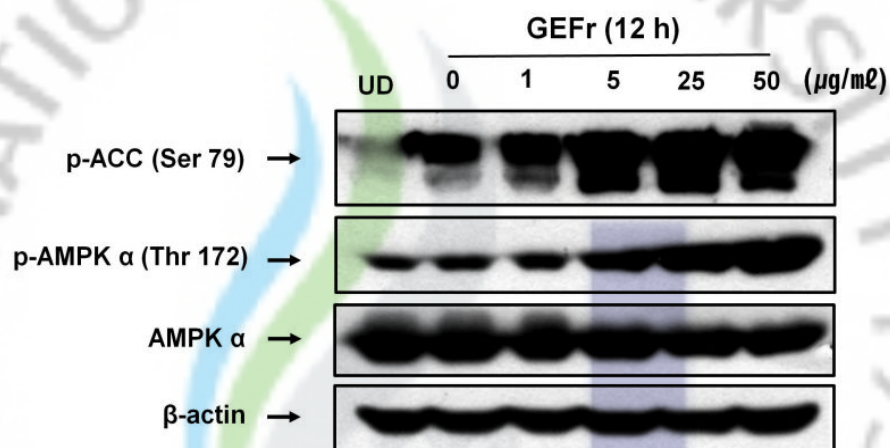
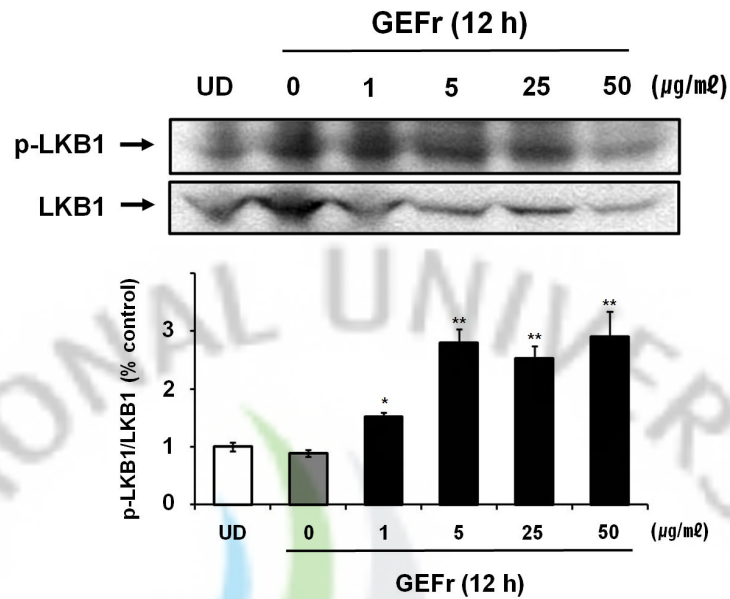


Figure 8. The effect of GEFr on AMPK and ACC activation in differentiated 3T3-L1 adipocytes. The 3T3-L1 adipocytes were treated with GEFr 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for indicated time period (0, 1, 3, 6, 12 and 24 hours) (A) or for 12 hours in indicated concentration (B). UD, undifferentiated control.

A



B

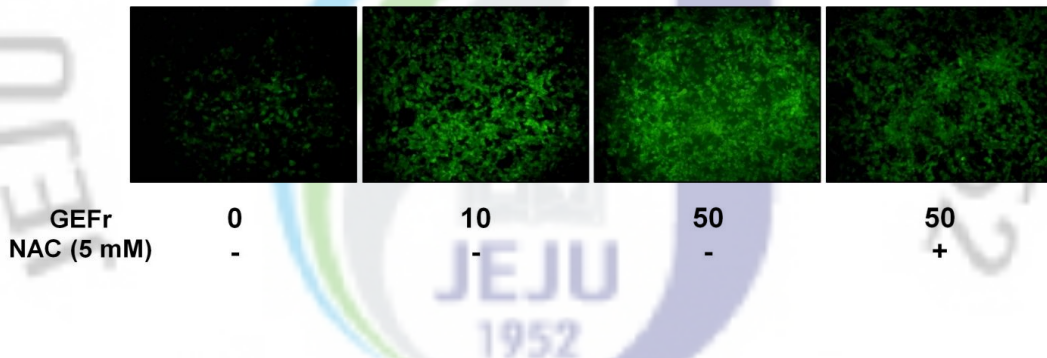
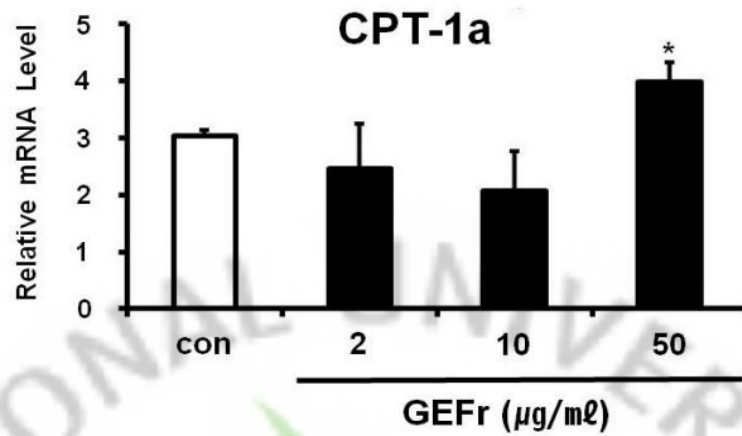
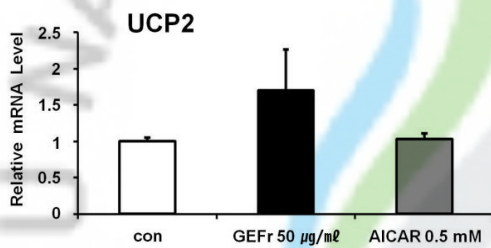


Figure 9. The effects of GEFr on LKB1 phosphorylation and ROS generation in 3T3-L1 adipocyte. 3T3-L1 adipocytes were treated with GEFr for the indicated concentration during 12 hours. (A) The phosphorylation level of LKB1 was examined by western blotting. (B) Cells were exposed to GEFr for 12 h and then cells were incubated with 10 µM DCFH-DA and in the presence or absence of NAC (5 mM). The changing of fluorescence intensity was measured by microscope (100X). UD, undifferentiated. The mean values of the results are shown with the SD (n=3). (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ compared to undifferentiated control).

A



B



C

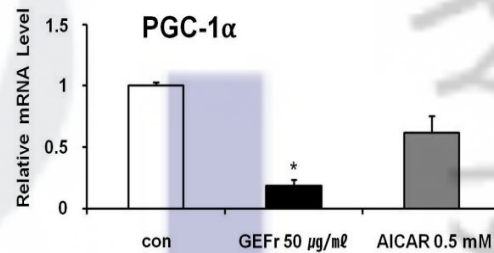
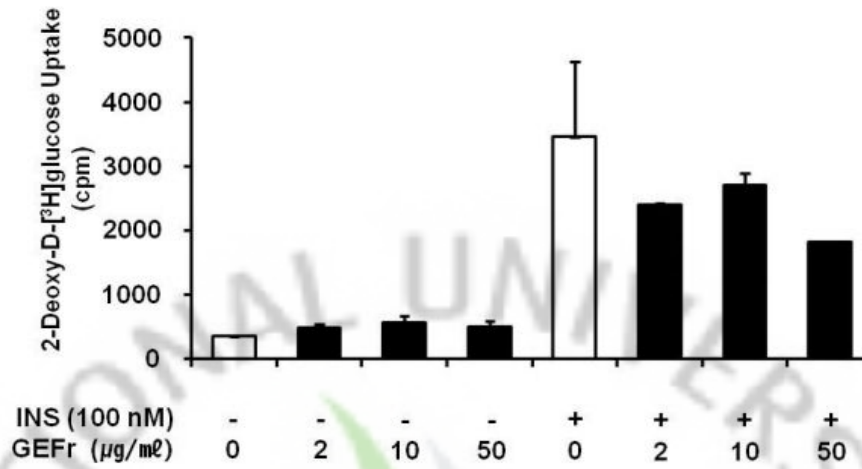


Figure 10. The effect of GEFr on mRNA expression of fatty acid β -oxidation related gene. Total RNAs were prepared from 3T3-L1 cells at day 8. Mature adipocytes were treated with GEFr for 48 hours. The mean values of the results are shown with the SD ($n = 3$). The data are shown representative of three experiments. (* $P < 0.05$ compared to control)

A



B

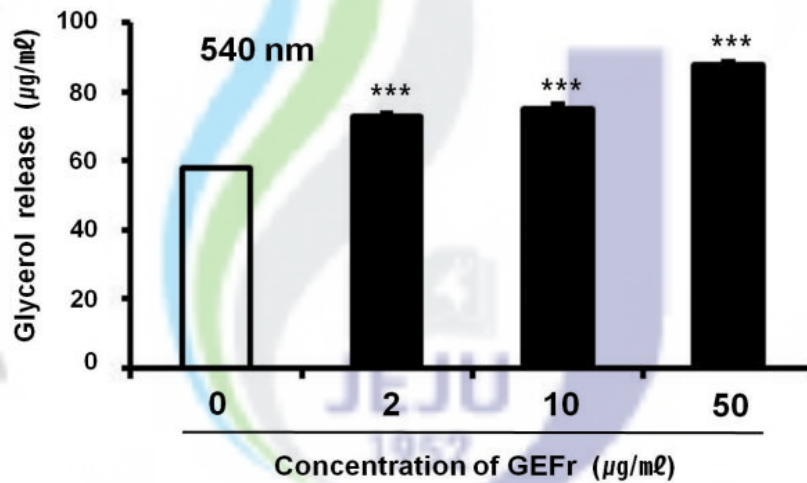


Figure 11. The effects of GEFr on 2-Deoxy-D-[³H]glucose uptake and glycerol release in 3T3-L1 adipocytes. Mature adipocytes were incubated in 12-well plate for 1 hour with GEFr, and then added 100 nM insulin. After 30 min, cells were assayed for 2-Deoxy-D-[³H]glucose uptake (A). Mature adipocyte were treated with GEFr at indicated concentrations for 48 hours (B). The mean values of the results are shown with the SD (n=3).

(**P* < 0.05 compared to negative control or positive control)

IV. 고찰

본 연구는 제주도에서 자생하는 해조류를 대상으로 항비만 소재를 탐색하는 과정에서 선발된 꼬물꼬시래기의 에탄올 추출물과 그 분획층이 지방세포의 분화에 미치는 영향과 그 기작을 밝히고자 하였다.

3T3-L1 전구지방세포 분화의 과정에는 PPAR γ , C/EBP α , aP2 등의 지방세포 특이 전사인자와 단백질이 관여하고 이에 따른 표현형으로서 세포의 형태변화와 함께 지방축적의 결과를 가져오게 된다 (Sams and sul, 1995, Gregoire *et al.*, 1998). 꼬물꼬시래기 에탄올 추출물 (GVE)은 분화유도물질 (IBMX., DEXA., Insulin)과 동시에 처리하였을 때 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서부터 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화를 효과적으로 저해하였으며, 지방세포 분화의 지표 단백질들의 발현 역시 현저하게 감소시켰다. 이 결과는 꼬물꼬시래기 추출물이 지방세포 분화과정에 핵심적으로 작용하는 전사인자인 PPAR γ 와 C/EBP α 의 발현을 감소시킴으로서 지방세포 지표 단백질인 aP2의 발현 역시 감소시킴으로서 지방세포의 분화 억제가 분자적 수준에서부터 영향을 받는 것으로 해석된다.

GVE의 전구지방세포 분화억제 작용을 바탕으로 하여 GVE의 활성성분이 함유된 유기용매 분획을 결정하기 위하여 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올, 물의 분화억제 활성을 조사하였다. 부탄올 층과 물 층에서는 지방세포분화 억제 활성의 거의 나타나지 않았고 (data not shown), 헥산층 (GHFr)과 에틸아세테이트층 (GEFr)에서 강한 지방세포분화 억제 활성이 관찰되었다. 특히 GEFr은 저농도 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서부터 지방소적의 생성과 PPAR γ , C/EBP α 및 aP2의 발현을 효과적으로 감소시켰으며, 헥산 분획층 (GHFr)보다 더 뛰어난 활성을 나타내었다. 이는 지방세포 분화억제 활성과 관련되어 있는 성분들이 GHFr 보다 GEFr에 더 많이 함유되어 있음을 말해주는 결과로 사료된다.

한편 AMPK (AMP-activated protein kinase)는 세포 내의 에너지 항상성 유지에 센서 역할을 하는 효소로서 포도당의 결핍, 혈중산소감소, ROS 등의 산화적 스트레스에 의해 AMP:ATP 비율이 증가하게 되면 α -subunit의 threonine 172 잔기가 인산화되어 활성화 된다고 보고되었다 (Hardie D. G., 2007). AMPK의

활성화는 대사조절과 밀접하게 연관되어 있는 장기 (간, 근육, 지방, 췌장)들에 밀접하게 관련되어 있고 (Zhang *et al.*, 2009), 이러한 관련성에 근거하여 여러 가지 대사성 질환의 치료제를 개발하기 위한 표적분자로 인식되고 있다. 따라서 앞선 데이터로부터 지방세포 분화억제 활성이 가장 뛰어나다고 판단되는 GEFr을 이용하여 AMPK signaling에 미치는 GEFr의 영향을 확인하였다. GEFr은 분화된 지방세포에서 AMPK의 인산화를 유도하였고, 이에 따른 AMPK의 표적 단백질인 acetyl-CoA carboxylase (ACC)의 인산화도 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 GEFr이 AMPK 신호전달 경로에 관련되는 에너지 대사과정에 영향을 미친다는 결과로 사료된다. 따라서 GEFr이 어떠한 상위신호전달 경로를 통해 AMPK의 인산화를 활성화 시키는지 알아보기 위한 실험을 수행하였다.

AMPK의 상위조절 인산화효소로는 중앙 억제인자로도 알려진 LKB1과, 세포내 Ca^{2+} 농도와 관련된 Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase kinase (CaMKK)가 알려져 있다 (Woods *et al.*, 2005, Woods *et al.*, 2003). 또한, 일부 천연물 (genistein, curcumin, ginsenoside Rh2, epigallocatechin gallate)들은 ROS를 생성하여 세포내에 지방 축적을 억제하고, AMPK 신호전달 경로에서 AMPK의 활성화에 관여한다고 알려져 있다 (Hwang *et al.*, 2005; Hwang *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009). 따라서 GEFr이 LKB1 인산화 및 ROS의 생성에 어떠한 영향을 미치는지 western blot 분석과 DCFH-CA 형광염색을 통해 확인하였다. GEFr은 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서부터 유의적으로 LKB1의 인산화를 증가시켰을뿐만 아니라 고농도 (10 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 ROS의 생성 촉진 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 앞서 Hwang 등 (2005, 2007)과 Lee 등 (2009)의 보고와 유사한 결과를 나타내어 genistein, ginsenoside Rh2, curcumin 등의 효과처럼 GEFr 역시 유사한 활성을 가지고 있을 것으로 추측된다.

AMPK가 활성화 되면 그 기질인 ACC가 인산화 되어 불활성화 되기 때문에 지질합성과 관련된 과정으로 Malonyl-CoA의 농도가 감소되고 carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1)의 활성이 증가된다 (Merrill *et al.*, 1997). 지방산 산화를 조절하는 효소인 CPT-1은 acyl Co-A를 acylcarnitine으로 전환함으로써 long-chain fatty acid가 미토콘드리아 막을 통해 운반되는 것을 매개한다 (Hao *et al.*, 2010). 이에 GEFr이 CPT-1 mRNA에 어떠한 영향을 미치는지 확

인한 결과, GEFr은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 CPT-1 mRNA 발현을 증가시켰다. 이는 GEFr이 AMPK의 활성화와 함께 지방산의 β -산화를 촉진하는 작용을 할 것으로 사료되는 결과이다.

미토콘드리아의 호흡작용은 당대사에 매우 중요한 역할을 하며, 미토콘드리아의 기능 손상은 당뇨와 비만에 밀접하게 관련되어 있다 (Hao *et al.*, 2010). Uncoupling proteins (UCPs)는 미토콘드리아의 내막에 존재하며 thermogenesis을 통해 에너지 소비에 관여하는 단백질로 갈색지방조직에 많은 UCP1과는 달리 백색지방조직에서는 UCP2가 그 역할을 대신한다 (Fleury *et al.*, 1997). GEFr을 처리하여 UCP2의 mRNA 발현을 확인한 결과 시료를 처리한 군에서 유의적이지는 않았으나 UCP2 mRNA 발현을 증가시키는 것으로 보아 GEFr은 세포 내의 에너지 소비에 관여할 것으로 사료된다.

또한 미토콘드리아의 기능과 밀접하게 관련된 전사인자 coactivator인 PGC-1 α 는 갈색지방조직, 골격근, 심장, 간 등의 조직에서 mitochondrial biogenesis와 oxidative metabolism를 조절한다고 알려져 있다. PGC-1 α 에 의한 미토콘드리아의 생성에는 AMPK의 활성화뿐만 아니라 CaMKK), Nitric Oxide (NO) 및 cAMP-responsive element binding protein (CREB)이 관여하는 복잡한 과정이다 (Wu *et al.*, 2002; Nisoli *et al.*, 2003; Renznick *et al.*, 2006). 본 연구에서 GEFr은 PGC-1 α mRNA의 발현을 감소시키는 결과를 나타냈다. 이것은 AMPK의 인산화 이외에도, 세포 내에서 다른 신호전달에 관여하는 복합적 활성화에 기인하는 것으로 사료된다. 특히 세포 내 NO의 증가는 PGC-1 α 의 발현을 촉진한다고 보고되어 있고 (Nisoli *et al.*, 2003), Dang 등(2008)의 보고에서는 포물꼬시래기는 추출물이 NO 소거능을 통해서 항염활성을 가진다고 하였다. 이러한 사실에 비추어 볼 때 PGC-1 α 의 발현 감소는 GEFr에 의한 NO의 생성저해 활성화에 기인한다고 사료되나 PGC-1 α 의 발현에 관해서는 더 연구가 필요하다고 생각된다.

AMPK의 활성화는 인슐린 비의존적인 당 흡수를 증가시키고 (Kahn *et al.*, 2004; Merrill *et al.*, 1997; Yamaguchi *et al.*, 2005), 지방분해를 감소시킨다 (Daval *et al.* 2005). 그러나 GEFr은 세포내로의 당 흡수에는 뚜렷한 영향을 미치지 않았으며, 지방분해는 농도 의존적으로 유의적으로 증가시키는 상반적인 결

과를 나타내었다. 이것은 AMPK에 의한 HSL의 Ser565 잔기 인산화와 protein kinase A (PKA)에 의한 Ser660잔기 인산화 사이의 경쟁적 관계에 의한 결과로 해석할 수 있지만, 이에 대한 자세한 연구가 필요하다. biguanide 계열의 당뇨병 치료제인 metformin은 지방세포에서 지방분해를 증가시키고 중성지방의 저장을 억제하며, AMPK의 활성화를 통해 인슐린 민감성을 증가시킨다고 알려져 있다 (Lenhard *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2001; Ciaraldi *et al.*, 2002). 따라서 GEFr로부터 metformin과 유사한 활성을 보일 것으로 기대되는 천연물의 분리 및 작용 기전에 대한 후속적인 연구가 필요하다고 사료된다.



V. 참고 문헌

- Carling, D., 2004. The AMP-activated protein kinase cascade—a unifying system for energy control. *Trends Biochem. Sci.*, 29: 18–24
- Cho, K. J., Moon, H. E., Moini, H. L., Packer, D. Y. Yoon and A. S. Chung. 2003. α -Lipoic acid inhibits adipocyte differentiation by regulating pro-adipogenic transcription factors via mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Biol. Chem.*, 278: 34823–34833
- Ciaraldi, T. P., Kong, A. P. S., Chu, N. V., Kim, D. D., Baxi, S., Loviscach, M., Plodkowski, R., Reitz, R., Caulfield, M., Mudaliar, S. and Henry, R. R. 2002. Regulation of glucose transport and insulin signaling by troglitazone or metformin in adipose tissue of type 2 diabetic subjects. *Diabetes*, 51: 30–36
- Cowherd, R. M., Lyle, R. E. and McGehee, R. E. Jr. 1999. Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 10: 3–10
- Dagon, Y., Avraham, Y. and Berry, E. M. 2006. AMPK activation regulates apoptosis, adipogenesis, and lipolysis by eIF2 α in adipocyte. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 340: 43–47
- Dang, H. T., Lee, H. J., Yoo, E. S., Shinde, P. B. Lee, Y. M. Hong, J. K., Kim, D. K. and Jung, J. H. 2008. Anti-inflammatory constituents of the red alga *Gracilaria verrucosa* and their synthetic analogues. *J. Nat. Prod.*, 71: 232–240

- Daval, M., Diot-Dupuy, F., Bazin, R., Hainault, I., Viollet, B., Vaulont, S., Hainault, E., Ferre, P. and Foufelle, F. 2005. Anty-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in redent adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 280: 25250-25257
- Davies, S. P., Sim, A. T. R. and Hardie, D. G. 1990. Location and function of three sites phosphorylated on rat acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase. *Eur. J. Biochem.*, 187: 183-190
- Ejaz, A., Wu, D., Kwan, P. and Meydani, M. 2009. Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocyte and angiogenesis and obesity in C57/BL Mice. *J. Nutr.*, 139: 919-925
- Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbalt, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M. F., Surwit, R. S., Ricquier, D. and Warden, C. H. 1997. Uncoupling protein 2: A novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat. Genet.*, 15: 269-272
- Gregoire, F. M., Sams, C. M. and Sul, H. S. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.*, 78: 783-809
- Habinowski, S. A. and Witters, L. A. 2001. The effects of AICAR on adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 312: 734-737
- Ha, J. H., Daniel, S., Broyles, S. S. and Kim, K. H. 1994. Critical phosphorylation sites for acetyl-CoA carboxylase activity. *J. Biol. Chem.*, 269: 22162-22168

- Hao, J., Shen, W., Yu, G., Jia H., Li, X., Feng, Z., Wang, Y., Weber, P., Wertz, K., Sharman, E. and Liu, J. 2010. Hydroxytyrosol promotes mitochondrial biogenesis and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocyte. *J. Nutr. Chem.*, 21: 634-644
- Hardie, D. G., 2007 AMP-activated/SNR1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 8: 774-785
- 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
- Hawley, S. A., Davison, M., Woods, A., Davies, S. P., Beri, R. K., Carling, D. and Hardie, D. G., 1996. Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 271: 27879-27887
- Hurley, R. L., Anderson, K. A., Franzone, J. M., Kemp, B. E., Means, A. R., and Witters, L. A. 2005. The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J. Biol. Chem.*, 280: 29060-29069
- Hwang, J. T., Kim, S. H., Lee, M. S., Kim S. H., Yang. H. J., Kim, M. J., Kim, H. S., Ha. J. H., Kim. M. S. and Kwon D. Y. 2007. Anti-obesity effects of ginsenoside Rh2 and associated with the activation of AMPK signaling pathway in 3T3-L1 adipocyte. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364: 1002-1008

- Hwang, J. T., Lee, M. S., Kim, H. J., Sung, M. J., Kim, H. Y., Kim, M. S. and Kwon, D. Y. 2008. Antiobesity effect of ginsenoside Rg3 involves the AMPK and PPAR- γ signal pathways. *Phytother. Res.* 23: 262-266
- Hwang, J. T., Park, I. J., Shin, J. I., Lee, Y. K., Lee, S. K., Baik, H. W., Ha, J. and Park, O. J. 2005. Genistein, EGCG, capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338: 694-699
- Imbs, A. B., Bologodskaya, A. A., Nevshupova, N. V., Khotimchenko, S. V. and Titlyanov, E. A. 2001. Response of prostaglandin content in the red alga *Gracilaria verrucosa* to season and solar irradiance. *Phytochemistry.* 58: 1067-1072
- Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D. and Hardie, D. G. 2004. AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* 1: 15-25
- Kim, J. B. , H. J. Cho, W. S. Kim and S. Y. Park. 2002. PPARs and UCPs: Two major regulator in Energy homeostasis. *Biochemistry News*, 22: 256-265
- Kubota, N., Terauchi, Y., Kubota, T., Kumagai, H., Itoh, S., Satoh, H., Yano, W., Ogata, H., Tokuyama, K., Takamoto, I., Mineyama, T., Ishikkawa, M., Moroi, M., Sugi, K., Yamauchi, T., Ueki, K., Tobe, K., Noda, T., Nagai, R. and Kadowaki, T. 2006. Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectin-dependent and -independent pathways. *J. Biol. Chem.* 281: 8748-8755

- Lee, H. J., Dang, H. T., Kang, G. J., Yang, E. J., Park, S. S., Yoon, W. J., Jung, J. H., Kang, H. K. and Yoo, E. S. 2009. Two enone fatty acids isolated from *Gracilaria verrucosa* suppress the production of inflammatory mediators by down-regulating NF- κ B and stat1 activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Arch. Pharm. Res.*, 32: 453-462
- Lee, Y. K., Lee, W. S., Hwang, J. T., Kwon, D. Y., Surh, Y. J. and Park, O. J. 2006. Curcumin exerts antidifferentiation effect through AMPK α -PPAR γ in 3T3-L1 adipocytes and antiproliferatory effect through AMPK α -COX-2 in cancer cells. 2009. *J. Agric. Food Chem.* 57: 305-310
- Lenhard, J. M., Klierer, S. A., Paulik, M. A., Plunket, K. D., Lehmann, J. M. and Weiel, J. E. 1997. Effects of troglitazone and metformin on glucose and lipid metabolism. *Biochem. Pharmacol.*, 54: 801-808
- MacDougald, O. A. and Lane, M. D. 1995. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu. Rev. Biochem.*, 34: 645-673
- Merrill, G. F., Kurch, E. J., Hardie, D. G. and Winder, W. W. 1997. AICARiposide increased AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 273: E1107-E1112
- Miao, C. H., Du, J., Dang, H. T., Jeong, I. H., You, S., Park, J. S., Jung, J. H. and Kim, D. K. 2008. Apoptotic activity of fatty acid derivatives may correlate with their inhibition of DNA replication. *Int. J. Oncol.* 33: 1291-1298

- Nisoli, E., Clementi, E., Paolucci, C., Cozzi, V., Tonello, C., Sciorati, C., Bracale, R., Valerio, A., Francolini, M., Moncada, S. and Carruba, M. O. 2003. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 299: 896-899
- Orci, L., Cook, W. S., Ravazzola, M., Wang, M. Y., Park, B. H., Montesano, R. and Unger, R. H., 2004. Rapid transformation of white adipocytes into fat-oxidizing machines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 2058-2063
- Park, H., Kaushik, V. K., Constant, S., Prentki, M., Przybytkowski, E., Ruderman, N. B. and Saha, A. K. 2002. Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. *J. Biol. Chem.* 277: 32571-32577
- Reznick, R. M. and Shlman, G. I. 2006. The role of AMP-activated protein kinase in mitochondrial biogenesis. *J. Physiol.*, 574: 33-39
- Rossmesl, M., Barbatelli, G., Flachs, P., Brauner, P., Zingaretti, M. C. Marelli, M., Petra, J., Milada, H., Ivo, S., Saverio, C. and Jan, K. 2002. Expression of the uncoupling protein 1 from the α 2 gene promoter stimulated mitochondrial biogenesis in unilocular adipocytes in vivo. *Eur J Biochem.* 269: 19-28
- Ruderman, N. and Prentki, M., 2004. AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 3: 340-351
- Sams, C. M. and Sul, H. S. 1995. Control of adipocyte differentiation. *Biochem. J.* 309: 697-710

- Shin, J. H., Choi, D. J., Lim, H. C., Seo, J. K., Lee, S. J., Choi, S. Y. and Sung, N. J. 2006. Nutrients and Antioxidant Activity of Red Seaweeds. *J. Life Science*. 16: 400-408
- Sim, A. T. and Hardie, D. G. 1988. The low activity of acetyl-CoA carboxylase in basal and glucagon-stimulated hepatocytes is due to phosphorylation by the AMP-activated protein kinase and not cyclic AMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* 233: 294-298
- Smith, P. J., Wise, L. S., Berkowitz, R., Wan, C. and Rubin, C. S. 1988. Insulin-like growth factor-1 is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocyte. *J. Biol. Chem.*, 263: 9402-9408
- Stein, S. C., Woods, A., Jones, N. A., Davison, M. D. and Carling, D. 2000. The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem. J.*, 345: 437-443
- Stephane, G., Tseng, Y-H., Kahn, C. R. 2007. Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell*, 131: 242-256
- Tang, Q. Q., Otto, T. C. and Lane, M. D. 2003. Mitotic clonal expansion : A synchronous process required for adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 44-49
- Towler, M. C. and Hardie, D. G. 2007. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res*, 100: 328-341
- Winder, W. W. and Hardie, D. G. 1999. AMP-activated protein kinase, a

metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am. J. Physiol.* 277: 1-10

Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S. P., Momcilovic, M., Johnstone, S. R., Carlson, M. and Carling, D., 2005. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase- β acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab.* 2: 21-33

Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M. and Carling, D. 2003. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol.* 13: 2004-2008

Wu, X., Motoshima, H., Mhadez, K., Stalker, T. J., Scalia, R. and Goldstein, B. J. 2003. Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes*, 52: 1355-1363

Yamaguchi, S., Katahira, H., Ozawa, S., Nakamichi, Y., Tanaka, T., Shimoyama, T., Takahashi, K., Yoshimoto, K., Imaizumi, M. O., Nagamatsu, S. and Ishida, H. 2005. Activators of AMP-activated protein kinase enhance GLUT4 translocation and its glucose transport activity in 3T3-L1 adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289: E643-E649

Ye, J. M., Dzamko, N., Hoy, A. J., Iglesias, M. A., Kemp, B. and Kraegen, E. 2006. Rosiglitazone treatment enhances acute AMP-activated protein kinase-mediated muscle and adipose tissue glucose uptake in high-fat-fed rats. *Diabetes*. : 2797-2804

Zhang, B. B., Zhou, G. and Li, C. 2009. AMPK: and everging drug target for diabetes and the metabolic syndrom. *Cell Metab.* 9: 407-416

Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Vertre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M. F. Goodyear, L. J. and Moller, D. E., 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* 108: 1167-1174



VI. 요 약

본 연구에서는 제주도에 자생하는 식용해조류인 꼬물꼬시래기 (*Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss) 에탄올 추출물과 그 분획물이 3T3-L1 전구 지방세포의 지방세포형성과정에 미치는 영향을 확인하였다. 꼬물꼬시래기의 에탄올 추출물과 용매분획층 (헥산, 에틸아세테이트)은 3T3-L1 전구지방세포에서 분화유도 물질 (IBMX, DEXA., Insulin)과 함께 처리했을 때 지방소적의 형성을 농도-의존적으로 감소시켰다. 또한 이들은 분화의 표적 전사인자인 PPAR γ , C/EBP α 과 지방세포 특이적 단백질인 aP2의 발현을 효과적으로 감소시켜 분자적인 수준에서 전구지방세포에서 지방세포로의 분화를 억제하였다. AMP-activated protein kinase (AMPK)는 세포 내 에너지 항상성과 밀접하게 관련된 효소로서, 최근 항비만과 관련된 분자적 표적으로 많은 연구가 진행되고 있다. 꼬물꼬시래기 에틸아세테이트 분획층 (GEFr)은 농도의존적으로 AMPK의 인산화와 acetyl CoA carboxylase (ACC)의 인산화를 증가시켰다. GEFr에 의한 AMPK의 활성화는 AMPK 상위 인산화효소인 LKB1의 인산화와 세포 내 ROS의 생성촉진에 의한다고 사료되었다. GEFr은 지방산 산화관련 유전자인 CPT-1, UCP2 유전자의 발현은 증가시켰으나 PGC-1 α 의 발현은 감소시켰다. 또한 AMPK와 관련하여 인슐린 비의존적 당 흡수에는 영향을 미치지 않았고, 지방분해를 농도 의존적으로 증가시켰다. 본 연구 결과를 바탕으로 꼬물꼬시래기 에탄올 추출물 및 그 분획층은 항비만 소재로서 개발 가능성을 제시하며, 활성성분들의 분리·동정 및 이들의 작용기전에 대한 추가적인 연구가 필요하다.