



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 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 세포에서 제주조릿대
(*Sasa quelpaertensis* Nakai)
추출물과 *p*-coumaric acid의
지질대사 개선 작용

제주대학교 대학원

생물학과

강 승 우

2013년 2월

3T3-L1 세포에서 제주조릿대
(*Sasa quelpaertensis* Nakai)
추출물과 *p*-coumaric acid의
지질대사 개선 작용

지도교수 김 세 재

강 승 우

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2013년 2월

강승우의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ ①

위 원 _____ ①

위 원 _____ ①

제주대학교 대학원

2013년 2월

Lipid metabolism modulating properties of *Sasa
quelpaertensis* extract and *p*-coumaric acid
in 3T3-L1 cells

Seung-Woo Kang

(Supervised by professor Se-Jae Kim)

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

2013. 2.

This dissertation has been examined and approved by

Chairperson of the Committee

(Name and signature)

DEPARTMENT OF BIOLOGY
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

ABSTRACT

This study was performed to investigate the effects of *Sasa quelpaertensis* extract and *p*-coumaric acid on lipid metabolism in 3T3-L1 cells. First of all, the effects of hot water extract from *Sasa quelpaertensis* leaf (JBE) on the adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes were investigated. JBE suppressed dose-dependently triglyceride accumulation in 3T3-L1 preadipocytes. At molecular level, it reduced the expression of adipogenic transcriptional factors, CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α), peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), and fatty acid binding protein (aP2). JBE suppressed the expression of sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) which is expressed during early differentiation stage, as well as its down stream target genes fatty acid synthase (FAS) and adiponectin in a dose-dependent manner. Also, JBE increased phosphorylation of AMP-activated protein kinase (AMPK) which regulates the expression of SREBP-1c, and acetyl-CoA carboxylase (ACC) in 3T3-L1 preadipocytes. Next, the effects of *p*-coumaric acid (CA) which is a major compound contained in JBE, on lipid metabolism in 3T3-L1 cells were investigated. CA was able to suppress triglyceride accumulation only from intermediate stage (4 days after differentiation induction) by reducing expression of C/EBP α and SREBP-1c. In matured 3T3-L1 adipocytes, CA activated AMPK and its substrate, ACC, and increased the gene expression of carnitine palmitoyl transferase-1 (CPT-1). However, CA did not affect glucose uptake and lipolysis in mature adipocytes. Taken together, these results suggest that JBE and CA inhibit adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes and promote fatty acid β -oxidation via AMPK signaling pathway.

Key word : *Sasa quelpaertensis* Nakai, *p*-coumaric acid, 3T3-L1 preadipocytes, fatty acid β -oxidation, anti-adipogenesis, lipid metabolism

목 차

A B S T R A C T	-----	i
목 차	-----	iii
LIST OF TABLE	-----	v
LIST OF FIGURES	-----	vi
I. 서 론	-----	1
II. 재 료 및 방 법	-----	4
1. 시료 및 추출	-----	4
2. 세포 배양	-----	4
3. 세포 독성 측정	-----	4
1) LDH 분석	-----	4
2) MTT 분석	-----	5
4. 분화유도	-----	6
5. Oil Red O 염색	-----	6
6. Western blot	-----	7
7. RNA분리 및 Real-time PCR	-----	8
8. Glycerol release 분석	-----	10

9. Glucose uptake 분석	-----	10
10. 통계처리	-----	11
III. 결	과 -----	12
1. 제주조릿대 추출물의 전구지방세포 분화억제 효과	-----	12
1) JBE의 전구지방세포 분화억제 활성	-----	12
2) 분화 초기 유전자 ERK, C/EBP α , SREBP-1c 발현에 미치는 영향	--	13
3) Fatty acid synthesis (FAS)와 adiponectin의 mRNA 발현에 미치는 영향	-----	13
4) Insulin receptor substrate 1 (IRS-1)와 AMPK 활성화에 미치는 영향	-----	13
2. <i>p</i> -coumaric acid (CA)가 지질대사에 미치는 영향	-----	21
1) 전구지방세포 분화억제 활성	-----	21
2) 분화된 지방세포에서 CA가 지방산 β -산화, 포도당 흡수 및 지방 분해에 미치는 영향	-----	22
IV. 고	찰 -----	30
V. 참	고 문 헌 -----	33
VI. 요	약 -----	39

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. Viability and cytotoxicity of the <i>Sasa quelepaertensis</i> extract (JBE) on 3T3-L1 preadipocytes -----	15
Figure 2. Effect of <i>Sasa quelepaertensis</i> extract (JBE) on lipid accumulation of 3T3-L1 cells during adipogenesis -----	16
Figure 3. Western blot analysis of PPAR γ , C/EBP α and aP2 in 3T3-L1 cells treated with JBE -----	17
Figure 4. Western blot analysis of phospho-ERK, C/EBP β and SREBP-1c in 3T3-L1 cells treated with JBE -----	18
Figure 5. Effects of JBE on mRNA expression of adiponectin and FAS in 3T3-L1 cells -----	19
Figure 6. Western blot analysis of phospho-AMPK, phospho-ACC and phospho-IRS 1 in 3T3-L1 cells treated with JBE ---	20
Figure 7. Viability and cytotoxicity of the <i>p</i> -coumaric acid on 3T3-L1 preadipocytes and mature adipocytes -----	23
Figure 8. Effect of <i>p</i> -coumaric acid on lipid accumulation during differentiation stages of 3T3-L1 cells -----	24
Figure 9. Western blot analysis of PPAR γ , C/EBP α and SREBP-1c during differentiation stages of 3T3-L1 cells -----	25

Figure 10. Effect of <i>p</i> -coumaric acid on lipid accumulation of 3T3-L1 cells during adipogenesis -----	26
Figure 11. Western blot analysis of PPAR γ , C/EBP α and SREBP-1c in 3T3-L1 cells treated with <i>p</i> -coumaric acid -----	27
Figure 12. Effects of <i>p</i> -coumaric acid on AMPK signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes -----	28
Figure 13. Effects of <i>p</i> -coumaric acid on 2-NBDG uptake and glycerol release in 3T3-L1 adipocytes -----	29

I. 서 론

세계보건기구 (WHO)는 1980년 이후부터 세계적으로 비만 인구가 두 배 이상 증가하였고, 매년 약 2.8억 명 이상의 성인들이 과체중 혹은 비만에 의해 사망하고 있으며, 2015년에는 15억 이상의 성인이 과체중이 될 것이라고 전망하였다 (WHO, 2012).

비만은 에너지의 섭취가 에너지의 소비보다 과다 시 발생하고, 지방조직 내의 지방세포에서 지질 소적의 크기와 수가 증가하는 특징을 가지고 있으며, 고혈압, 고지혈증, 고콜레스테롤증, 동맥경화, 당뇨병 등과 같은 대사질환 발병의 주요원인으로 인식되고 있다 (Stephan *et al.*, 2007, Shimomura *et al.*, 1996, Medina-Gomez *et al.*, 2005). 최근에는 다양한 대사질환을 야기하는 비만을 예방하고자 하는 차원에서 3T3-L1 세포의 분화를 조절하는 천연물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다 (Kim *et al.*, 2002, Spiegelman *et al.*, 1996, Raylana *et al.*, 2008, Hsu *et al.*, 2008).

3T3-L1 전구지방세포는 증식단계를 거쳐 confluence 상태에 이르면 세포 분열을 정지하고 호르몬에 의한 자극을 통해서 mitotic clonal expansion 상태를 거친 후 지방조직으로 분화될 수 있다 (Robert *et al.*, 1999). 전구지방세포가 지방세포로 분화해 나가는 과정에는 세포의 형태적 변화와 유전자 발현양상의 변화 등이 함께 일어나며 (Filer *et al.*, 1998), 약 5~7일 간에 지방세포의 표현형을 획득하게 된다. 지방세포의 분화과정 (adipogenesis)에는 CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP α), peroxisome proliferator activated receptors gamma (PPAR γ) 그리고 sterol regulatory element binding protein - 1c (SREBP-1c)라고 불리는 세 가지 전사인자가 중추적인 역할을 담당하고 있다 (Brown *et al.*, 1997). SREBP-1c는 지방산 대사와 지질 생합성에 관여하는 유전자들의 발현을 조절하는 전사인자이다 (Filer *et al.*, 1998). 분화 초기에 발현되는 SREBP-1c는 PPAR γ 의 전사활성을 증가시킴으로서 지방세포의 분화를 촉진시키고 지방산대사를 조절한다 (Kim *et al.*, 1999). PPAR γ 는 retinoid X receptor α

(RXRa) 와 heterodimer을 형성하여 표적유전자의 프로모터 또는 인핸서에 존재하는 PPRE (peroxisome proliferator response element)에 결합함으로써 표적유전자의 발현을 조절한다 (Brun *et al.*, 1997). 특히 PPAR γ 2는 지방세포에서만 선택적으로 발현되며 지방세포의 분화와 지방산대사를 조절한다 (Barak *et al.*, 1999). PPAR γ 발현의 증가는 이어 C/EBP α 의 발현을 증가시키고, C/EBP α 의 발현의 증가는 지방세포 분화와 관련된 유전자들의 발현을 조절한다 (Cao *et al.*, 1991).

AMP-activated protein kinase (AMPK)는 세포 내의 항상성 유지에 센서 역할을 하는 효소로서 지방조직에서 지질 및 포도당 대사의 조절을 통해 지방 분해, 당 흡수, 지방세포의 분화 및 증식 그리고 지방산의 β -산화 작용을 조절한다 (Hardie *et al.*, 2003, Ceddia *et al.*, 2012). AMPK는 스트레스나 운동에 의한 AMP/ATP 비율이 증가하는 경우에 활성화되어 지방산합성과 콜레스테롤 합성 등과 같은 ATP를 소비하는 과정을 억제하고 지방산 산화와 해당과정에 의한 ATP의 생산을 촉진한다 (Hardie *et al.*, 2007). AMPK는 serine/threonine kinase로서 α , β , γ 3개의 소단위로 구성된 heterotrimeric complex로 이루어져 있고 (Hardie *et al.*, 2003), 이중 α 소단위의 N-말단 (N-terminal)에 catalytic site가 있으며, 이중 threonine 172 잔기 (Thr-172)가 인산화 됨으로서 활성화 된다 (Hawley *et al.*, 1996). 현재까지 AMPK α 소단위 Thr-172를 인산화 시키는 상위 인산화효소로는 liver kinase B1 (LKB1), Ca $^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase kinase β (CaMKK β), TGF β -activated kinase (TAK-1)등이 알려져 있다 (Hardie *et al.*, 2011). AMPK의 활성화는 지방산 합성과 콜레스테롤 합성을 조절하는 acetyl-CoA carboxylase (ACC)를 인산화시킴으로서 그 효소활성을 불활성화 시킨다 (Kahn *et al.*, 2005). 이로 인해 malonyl-CoA의 생성이 감소하고 지방산을 미토콘드리아 내로 운반하는 carnitine palmitoyl transferase-1 (CPT-1)의 활성이 증가한다. 결과적으로 미토콘드리아 내로 유입되는 지방산의 양이 증가하게 되어 지방산의 β -산화가 촉진된다 (Munday *et al.*, 2002, McGarry *et al.*, 2002).

제주조릿대 (*Sasa quelpaertensis* Nakai)는 벼과에 속하는 식용 대나무로

서 오직 제주도에만 서식하는 한국 특산종이다. 제주조릿대의 잎은 예로부터 당뇨와 위장에 좋다고 하여 민간요법으로 사용되어 왔으며, 제주조릿대의 잎에는 *p*-coumaric acid, *N*-feruloylserotonin 과 건강에 유익한 폴리페놀류가 다량 함유되어 있다 (Sultana and Lee *et al.*, 2010). 제주조릿대의 생리활성에 대한 연구로는 항염증 효과 (Hwang *et al.*, 2007), 항암 효과 (Jang *et al.*, 2008), 항비만 효과 (Kang *et al.*, 2012) 등이 보고된 바 있다. 한편 제주조릿대에 함유된 대표적인 폴리페놀류인 *p*-coumaric acid는 항암 효과 (Hudson *et al.*, 2000, Janicke B *et al.*, 2005), 심장보호 효과 (Abdel-Wahab *et al.*, 2003), 항균 효과 (Cho *et al.*, 1998), 항궤양 효과 (Barros MP *et al.*, 2008) 등의 생리활성을 가진다고 보고되어 있다. 하지만 제주조릿대 추출물과 *p*-coumaric acid의 지질대사와 관련된 연구는 아직까지 미진한 상태이다. 따라서 본 연구는 3T3-L1 세포에서 제주조릿대 추출물과 *p*-coumaric acid의 지질대사에 미치는 영향을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료 및 추출

본 연구에 사용된 제주조릿대(*Sasa quelpaertensis* Nakai)는 2011년 4월에 제주도 한라산에서 채집하였다. 채집된 시료는 수돗물로 수세하여 음지에서 건조한 후, 분쇄하여 분말을 획득하였다. 시료의 열수추출물을 얻기 위해서 1Kg의 제주조릿대 분말을 13L의 물과 혼합하여 30분 동안 반응시켰고, 30분 후 혼합물을 90℃ 에서 4시간 동안 추출하고 감압여과 하였다. 여과된 추출물은 감압회전농축기 (Bunchi, R-200, Switzerland)로 농축하였고, 농축액을 동결건조 하여 phosphate buffered saline (PBS) 에 녹여 세포실험에 사용하였다. 또한 본 연구에 사용된 *p*-coumaric acid는 Sigma (USA)에서 구입하였고 DMSO에 녹여 세포실험에 사용하였다.

2. 세포 배양

Mouse 유래 3T3-L1 전구지방세포는 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℃, 5% CO₂ 조건하에서 수행하였다. 세포는 T-75 Cell culture flask 바닥에 세포가 70% 정도 찼을 때 계대 배양하여 유지하였다.

3. 세포 독성 측정

1) LDH 분석

시료가 세포독성을 가지고 있는지 측정하기 위한 LDH 분석은 LDH Cytotoxicity Detection Kit (Takara, Japan)를 사용하여 수행하였다. 3T3-L1 전구지방세포를 96 well cell culture plate (1×10⁴ cells/well)에

24시간 동안 배양한 후 10% bovine calf serum (BCS)에 희석한 각 시료를 처리하여 48시간 동안 더 배양하였다. 배양이 끝난 후 시료를 처리한 배양액을 50 μ l씩 수거한 후 여기에 50 μ l의 LDH 측정 혼합액을 넣고 반응시킨 후 microplate reader로 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군은 세포에 Triton X-100 (Sigma, USA)용액을 최종 1%가 되도록 처리한 세포 배양액을 사용하였다. 각 시료의 독성 분석은 3회 반복 실험하였으며 다음 식에 의해 산출된 평균값으로 나타내었다.

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

A_{sample} = 시료를 첨가한 배지의 흡광도

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

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

2) MTT 분석

시료가 세포의 성장에 미치는 영향을 측정하기 위하여 Zhang 등 (2002)의 방법을 수정하여 MTT 분석을 수행하였다. 3T3-L1 전구지방세포를 96well cell culture plate (1×10^4 cells/well)에 24시간 동안 배양한 후 10% bovine calf serum (BCS)에 희석한 각 시료를 농도별 (제주조릿대 추출물 : 125, 250, 500 및 1000 μ g/ml, *p*-coumaric acid: 6.25, 12.5, 25, 50 및 100 μ M)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 μ g/ml의 농도가 되게 첨가하여 4시간 동안 배양한 후 배지를 제거하였다. 세포내에 생성된 formazan의 양은 150 μ l의 dimethylsulfoxide (DMSO)를 가하여 용해시킨 후 microplate reader (Bio-tek, USA)로 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 증식률은 시료를 처리하지 않은 대조군의 흡광도 값과 비교하여 다음의 식으로 산출 하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = 100 - [(control OD_{540} - Sample OD_{540}) / Control OD_{540} \times 100]$$

4. 분화유도

3T3-L1 전구지방세포의 분화유도는 Harmon and Harp (2001)의 방법을 변형하여 수행하였다. 전구지방세포는 10% BCS와 1% P/S가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 6 well cell culture plate (2×10^5 cells/well)에 접종하였고 48시간 동안 배양하여 pre-confluent 상태가 되도록 하였으며 pre-confluent 상태에서 배지를 한 번 더 교환하여 48시간 더 배양하였다. Confluent 상태 (분화유도 0일째)에서 배양액을 분화유도 배지 [10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO, USA), 1% Penicillin / Streptomycin (P/S, GIBCO, USA), 1 μ M dexamethasone (DEXA, Sigma, USA), 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, Sigma, USA) 및 1 μ g/ml 인슐린 (Sigma, USA)이 함유된 DMEM 배지]로 교환하여 2일간 분화유도 하였다. 분화유도 2일 후에 세포 배양액을 10% FBS, 1% P/S 및 1 μ g/ml 인슐린이 포함된 DMEM 배지로 교환하였고, 분화유도 4일째부터는 10% FBS, 1% P/S 가 포함된 DMEM 배지로 2일 마다 교환하였다. 그리고 성숙한 지방세포를 이용한 실험에서는 분화유도 후 8-10일째에 배양용기에서 배지를 제거하여 무혈청 DMEM 배지로 2번 세척하였고, 0.2% BSA (Amresco, USA)가 포함된 무혈청 DMEM 배지로 교환하여 6시간 배양 후 시료를 24시간 동안 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 2회 세척하고 PBS에 희석된 3.7% formalin [37% formaldehyde solution (Sigma, USA) 1/10으로 희석]으로 1시간 동안 고정한 후, 증류수로 2회 세척하였다. 그리고 Oil Red O 염색액은 isopropanol 로 희석된 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 microplate reader 로 520nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Western blot

Western blot 분석을 위해 시료 처리 및 배양이 끝난 지방세포를 PBS로 2회 세척 후 RIPA lysis buffer [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)]에서 1시간 동안 lysis 시킨 후 원심분리 (15000 rpm, 4°C, 20분)하여 상층액을 획득하였다. 단백질의 농도는 Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 microplate reader로 595nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 단백질 (30 μg)은 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리한 후 poly vinylidene difluoride (PVDF) membrane (Milipore, USA)에 전이시켰다. 단백질이 전이된 PVDF membrane은 상온에서 1시간 동안 5% skim milk (BD, USA) 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 (1:1000, Santa Cruz, USA), p-AMPK antibody (1:2000, Cell Signaling, USA), AMPK α antibody (1:5000, Cell Signaling, USA), p-ACC antibody (1:1000, Cell Signaling, USA), sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) antibody (1:1000, BD, USA)는 4°C에서 하루 밤 동안, A-FABP (aP2) antibody (1:5000, Santa Cruz, USA), β -actin antibody clone AC-74 (1:10000, Sigma, USA)는 상온에서 1시간 동안 수행하였다. 1차 항체 반응이 끝난 PVDF membrane은 0.1% Tween 20이 포함된 Tris buffered saline (TTBS) 용액으로 5-7회 세척한 후 peroxidase-conjugated 된 2차 항체 (Jackson ImmunoResearch, USA)를 각각 1:2,000, 1:5,000 혹은 1:10,000으로 희석하여 1시간 동안 반응한 후 TTBS 용액으로 5-7회 세척하였다. 각 단백질의 발현양은 WEST-ZOL western blot detection system (iNtRON Biotechnology, Korea)로 반응시켜 X-ray 필름 (Agfa Gevaert N.V., Belgium)으로 검출하였다.

7. RNA 분리 및 Real-time PCR

Real-time PCR을 위한 total RNA를 분리하기 위해서 세포를 키운 cell culture plate의 well 마다 RNAiso plus (Takara, Japan) 500 μ l를 첨가하여 상온에서 5-10분간 세포를 균질화 하였고, 이를 각각 microtube로 옮긴 후 chloroform 100 μ l를 첨가하여 상온에서 15분 동안 반응시켜, 원심분리 (12,000g, 4 $^{\circ}$ C, 15분)하였다. 이후 상층액을 수거하여 이를 다시 microtube로 옮기고 동량의 isopropanol을 첨가하여 ice에서 5분 동안 반응시킨 후 원심분리 (12,000g, 4 $^{\circ}$ C, 5분)를 통해 RNA를 침전시켰다. 침전된 RNA는 75% 에탄올로 3회 세척하여 건조시킨 후 Nuclease Free Water (NF D.W)에 용해시켰다. 용해된 RNA는 nanodrop 2000 spectrometer (Nanodrop, USA)를 이용하여 260nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였으며, A260 / A280nm의 비율이 1.8-2.1 범위 내의 값을 갖는 RNA를 실험에 사용하였다.

cDNA는 Maxime RT PreMix Kit (iNtRON Biotechnology, Korea)를 이용하여 합성하였다. 1 μ g total RNA와 NF D.W를 총 20 μ l가 되게 cDNA 합성 tube에 넣고 45 $^{\circ}$ C 60분, 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응하여 cDNA를 합성하였고 여기에 30 μ l의 NF D.W를 첨가하여 희석한 후 PCR에 사용하였다.

Real-time PCR은 Peltier thermal cycler (Bio-Rad, USA) Real-time PCR 기기를 이용하여 수행하였으며, PCR의 조건은 primer에 따른 T_m 값에 따라 그 조건을 달리하여 수행하였다. 결과는 1회 증폭할 때 마다 형광량을 측정하여 그 결과를 얻었으며, 모든 cycle이 완료된 후 65 $^{\circ}$ C에서 95 $^{\circ}$ C 까지 반응시켜 primer의 melting curve를 분석하였다. 결과 분석은 Chromo 4 Real-Time PCR Detection System v1.10 (Bio-rad, USA)을 이용하여 β -actin 대비 상대적 값으로 정량하였다. Real time-PCR에서 사용된 primer 염기서열을 Table 1.에 나타내었다.

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

Gene		Primer sequence	Product size(bp)
CPT-1a	Forward	5'-TGT CCA AGT ATC TGG CAG TCG-3'	163 bp
	Reverse	5'-CAT AGC CGT CAT CAG CAA CC-3'	
FAS	Forward	5'-CCC TTG ATG AAG AGG GAT CA-3'	114 bp
	Reverse	5'-ACT CCA CAG GTG GGA ACA AG-3'	
Adiponectin	Forward	5'-GAC CTG GCC ACT TTC TCC TC-3'	122 bp
	Reverse	5'-GTC ATC TTC GGC ATG ACT GG-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. Glycerol release 분석

배양액에 방출된 glycerol 함량은 free glycerol reagent kit (Sigma, USA)를 사용하여 측정하였다. 시료의 활성을 측정하기 위해서 3T3-L1 전구 지방세포를 분화유도 방법에 따라서 8일간 배양하여 분화시켰다. 분화된 3T3-L1 지방세포에 시료를 48시간 동안 처리하고, 24시간 후 시료가 처리된 배양액을 수거하여 Free glycerol 측정 시약 0.4 ml 에 배양액 5 μ l를 넣고 10분간 37 $^{\circ}$ C 에서 반응시켜 micro reader로 540nm에서 흡광도를 측정하였다. Free glycerol 정량을 위해서 Standard glycerol solution (Sigma, USA) 을 0, 16.25, 32.5, 65, 130, 260 μ g glycerol/ml 의 농도로 만들어 위와 동일하게 반응시켜 정량하였고, 3회 반복 실험하였다.

9. Glucose uptake 분석

시료가 세포내로 당 흡수 (glucose uptake)에 미치는 영향을 알아보기 위하여 형광으로 표지된 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4 -yl)Amino)-2-Deoxyglucose (2-NBDG) (Invitrogen, California)를 사용하여 glucose uptake 분석을 시행하였다. 실험에 사용된 3T3-L1 세포는 위에서 설명한 방법과 같이 12 well culture plate에서 분화유도 시킨 후 8-10일된 세포를 실험에 사용하였다. 분화된 지방세포는 혈청이 미첨가된 serum-free low-glucose DMEM 배지로 2회 세척한 후 0.2% BSA가 포함된 동일한 배지를 1 ml 첨가하여 37 $^{\circ}$ C 에서 4시간 동안 절식 배양하였다. 이렇게 배양된 세포는 Krebs-Ringer-Hepes (KRH) buffer [20 mM Hepes, 136 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.25 mM MgSO₄, 1.25 mM CaCl₂, 2 mg/ml BSA (pH 7.4)]로 2회 세척하여 배지를 제거하고 동일한 buffer에 녹인 시료 100 μ l를 농도별 (25, 50 및 100 μ M)로 첨가하여 30분 배양한 후, 100 μ l의 KRH buffer에 희석한 인슐린 100 nM을 처리하여 20분간 배양하고, 100 mM 2-NBDG와 10 mM 2-Deoxy-D-glucose (Sigma, USA)의 혼합물을 100 μ l에 최종 농도가 0.1 mM이 되도록 첨가하여 2시간 동안 배양하였다. 2시간 후 배양액을 제거하고 차가운 PBS로 2회 세척한 후, 세포내로 흡수된 2-NBDG의 양을 측정하기 위해 1% Triton X-100 lysis buffer를 1 ml 첨가하였다. 이후 각각

의 well에서 100 μ l의 lysis buffer를 black polystyrene 96 well assay plate (CoStar, USA)에 옮긴 후 세포 내의 형광 값을 FLUOstar Optima (BMG Labtechm Offenburg, Germany)을 이용하여 측정하였다.

10. 통계처리

실험결과는 $\text{mean} \pm \text{S.D}$ 으로 나타냈으며 student's *t*-test로 통계학적 유의성을 검증하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 제주조릿대 추출물의 전구지방세포 분화억제 효과

우선 제주조릿대 추출물 (JBE)이 3T3-L1 전구지방세포에서 세포생장과 세포독성이 있는지 여부를 확인하기 위해서 MTT와 LDH 분석을 수행하였다. 3T3-L1 전구지방세포에 JBE를 농도별 (0, 62.5, 125, 250, 500 및 1,000 $\mu\text{g/ml}$)로 처리한 결과, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 세포생장에는 영향력이 나타났지만 세포독성은 나타나지 않았다 (Figure 1). 이러한 결과를 바탕으로 하여 세포독성이 없는 JBE 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 을 최고 농도로 하여 세포실험을 수행하였다.

1) JBE의 전구지방세포 분화억제 활성

3T3-L1 전구지방세포의 분화에 JBE가 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 분화유도 시에 분화유도물질 (MDI)과 JBE (0, 125, 250, 500 및 1,000 $\mu\text{g/ml}$)를 동시 처리하여 분화유도 하였다. 분화유도 8일 후에 Oil Red O 염색으로 지방소적을 관찰한 결과, JBE가 처리된 실험군에서 지방소적 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 2A). 이를 정량화한 결과 125, 250, 500 및 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 JBE를 처리한 실험군은 시료를 처리하지 않은 양성대조군 ($100\pm 12.5\%$)에 비해 $99.9\pm 22.7\%$, $84.8\pm 22.2\%$, $47.7\pm 10.4\%$, $17.2\pm 14.5\%$ 의 값을 나타내었다 (Figure 2B). JBE에 의한 지방소적의 억제효과를 분자적인 수준에서 확인하기 위해 지방세포 분화와 관련된 단백질들의 발현을 Western blot을 통하여 분석하였다. 그 결과 JBE를 처리한 실험군에서 지방세포의 분화를 조절하는 핵심인자인 peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ), CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α), 그리고 지방세포 분화 표지 유전자인 fatty acid binding protein (aP2)의 발현이 농도 의존적으로 감소됨을 확인할 수 있었다 (Figure 3).

2) 분화 초기 유전자 ERK, C/EBP α , SREBP-1c 발현에 미치는 영향

앞의 결과들은 JBE가 PPAR γ , C/EBP α , 그리고 aP2의 발현 감소를 통해서 지방소적 축적억제 활성을 가지고 있음을 보여주었다. 따라서 JBE가 분화유도 초기에 발현된다고 알려진 C/EBP β , SREBP-1c의 발현 및 ERK의 인산화에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다. 전구지방세포에서 분화유도 시에 JBE (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 분화유도 물질 (MDI)을 동시 처리하여 시간 경과에 따른 이들 단백질의 발현을 조사하였다. 그 결과 JBE는 C/EBP β 의 발현과 ERK의 인산화에는 영향을 주지 않았지만 (Figure 4A, B), SREBP-1c의 발현은 감소시켰다 (Figure 4B). SREBP-1c의 발현 감소는 JBE 처리 후 12시간 이후부터 관찰되었으며, 이러한 결과를 바탕으로 분화유도물질과 JBE를 농도별로 동시 처리하여 분화 유도한 결과 SREBP-1c의 발현이 농도 의존적으로 감소됨을 확인할 수 있었다 (Figure 4C).

3) Fatty acid synthesis (FAS)와 adiponectin의 mRNA 발현에 미치는 영향

앞선 결과에서 JBE는 SREBP-1c의 발현을 감소시켰다. 따라서 JBE가 SREBP-1c의 하위 표적유전자인 FAS와 지방세포 특이적으로 분비되는 adipokine인 adiponectin의 mRNA 발현에 어떠한 영향을 미치는지 Real-time PCR을 통해서 확인하였다. 그 결과 JBE는 FAS와 adiponectin의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 감소시켰다 (Figure 5).

4) Insulin receptor substrate 1 (IRS-1)와 AMPK 활성화에 미치는 영향

JBE의 영향으로 발현이 감소된 SREBP-1c는 주로 인슐린과 AMPK 신호전달 체계에 의해 조절된다고 알려져 있다 (Gaochao Zhou *et al.*, 2001, Kim SY *et al.*, 2004). 따라서 JBE가 SREBP-1c의 상위 조절인자인 IRS-1과 AMP-activated protein kinase (AMPK)의 활성화에 미치는 영향을 확인하였다. 분화유도 시에 분화유도 물질 (MDI)과 JBE (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 동시에 처리한 후 시간 경과에 따른 이들의 활성화 정도를 조사하였다. 그 결과 JBE는 IRS-1의 인산화에는 영향을 주지 않았지만, AMPK와 그 기질인 acetyl-CoA carboxylase (ACC)의 인산화를 분화유도 후 15분부터 2시간 전까지 증가시

켰다 (Figure 6A). 이 결과를 바탕으로 분화유도 물질 (MDI)과 함께 JBE를 1시간 동안 농도별로 처리한 결과, AMPK와 그 기질인 ACC의 인산화가 농도 의존적으로 증가하고 있음을 확인 할 수 있었다 (Figure 6B).

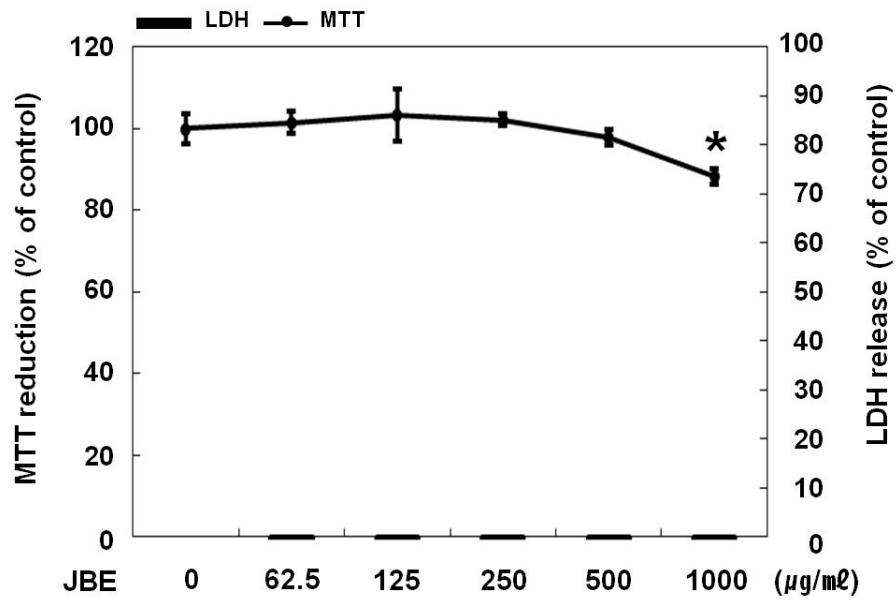
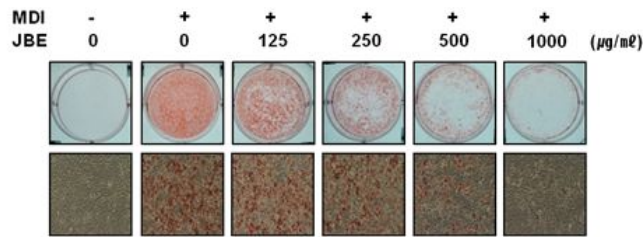


Figure 1. Viability and cytotoxicity of the *Sasa quepaertensis* extract (JBE) on 3T3-L1 preadipocytes. Preconfluent preadipocytes were treated with various concentration of JBE for 48 hours. Cytotoxicity was determined by MTT and LDH assay. The data expressed as mean \pm S.E of three experiments. 0 $\mu\text{g/ml}$, positive control (vehicle).

* $p < 0.05$ compared to positive control

A



B

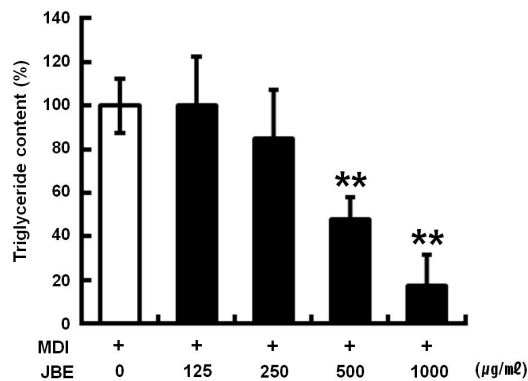


Figure 2. Effect of *Sasa quelpaertensis* extract (JBE) on lipid accumulation of 3T3-L1 cells during adipogenesis. 3T3-L1 cells were differentiated in the MDI differentiation medium with different concentration of JBE for 2 days. The cells were then cultured for a further 2 days in the medium containing 1 $\mu\text{g/ml}$ insulin. Then, the cells were cultured in post-differentiation medium, which was replaced every 2 days. After 8 days, cells were stained with Oil Red O. (A) Macroscopic and microscopic (magnitude $\times 200$) picture of stained cells. (B) Triglyceride contents. Lipid accumulation is assessed by the quantification of OD_{520} as described in Materials and Method. (-), negative control ; $0\mu\text{g/ml}$, positive control ; MDI, 0.5 mM IBMX, 1 μM DEXA, 1 $\mu\text{g/ml}$ insulin. ** $p < 0.01$ compared to positive control.

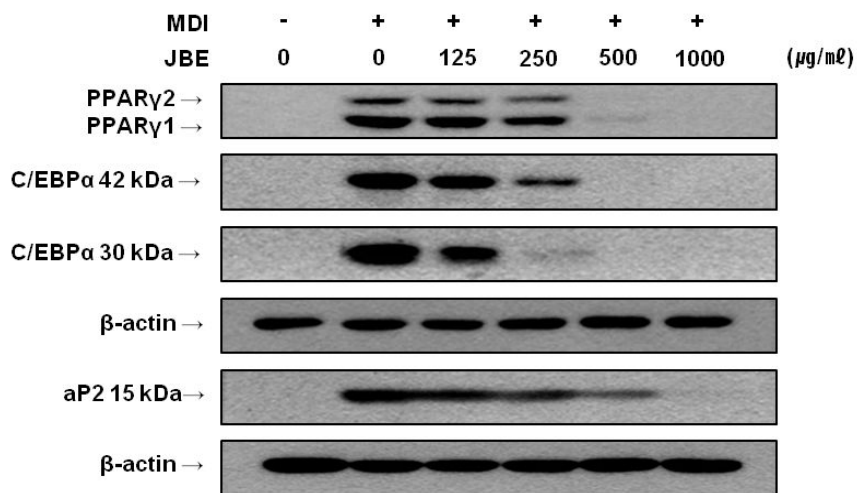
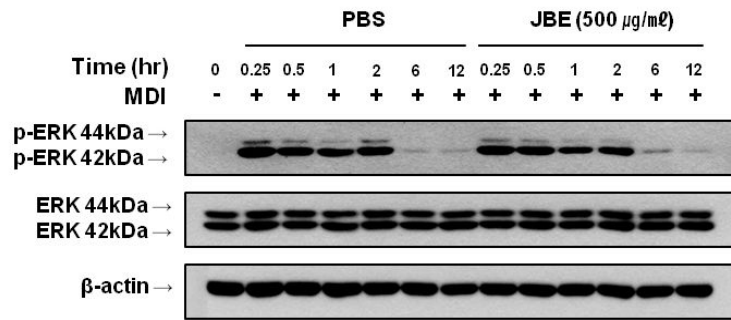
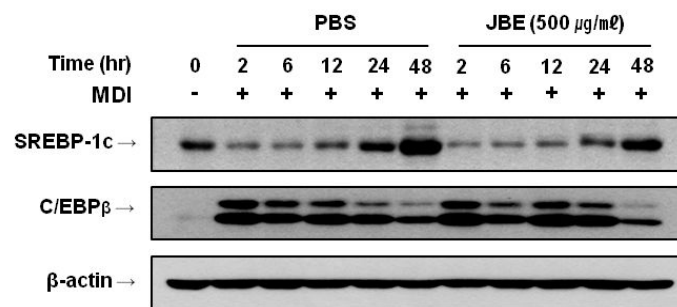


Figure 3. Western blot analysis of PPAR γ , C/EBP α and aP2 in 3T3-L1 cells treated with JBE. 3T3-L1 cells were differentiated in the MDI differentiation medium with different concentration of JBE for 2 days. The cells were then cultured for a further 2 days in the medium containing 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin. Then, the cells were cultured in post-differentiation medium, which was replaced every 2 days. Total protein was harvested to analyze by Western blot at day 6. MDI; 0.5 mM IBMX, 1 μM DEXA, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin.

A



B



C

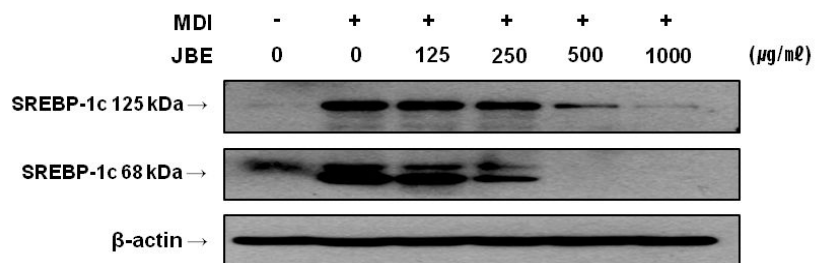
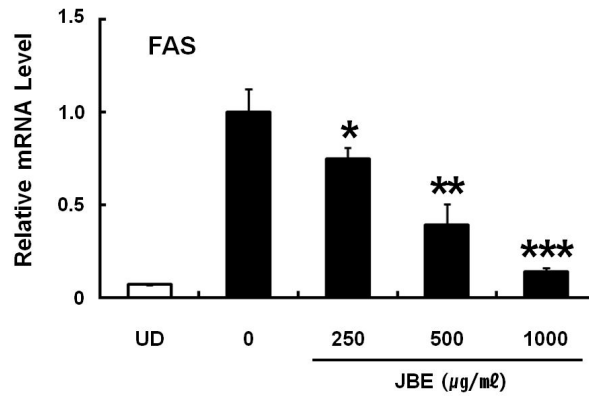


Figure 4. Western blot analysis of phospho-ERK, C/EBP β and SREBP-1c in 3T3-L1 cells treated with JBE. 3T3-L1 Cells were cultured in MDI differentiation medium with JBE 500 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ for (A, B) indicated time period or (C) for 6 days in indicated concentration.

A



B

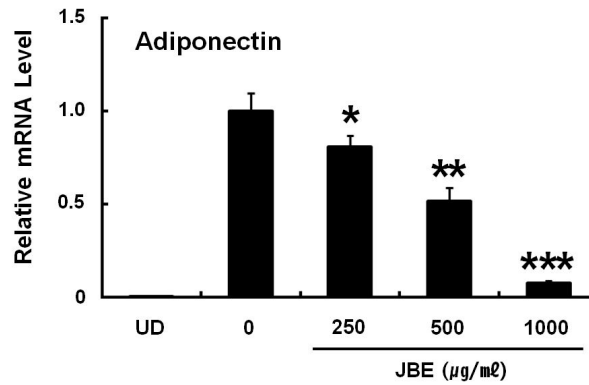
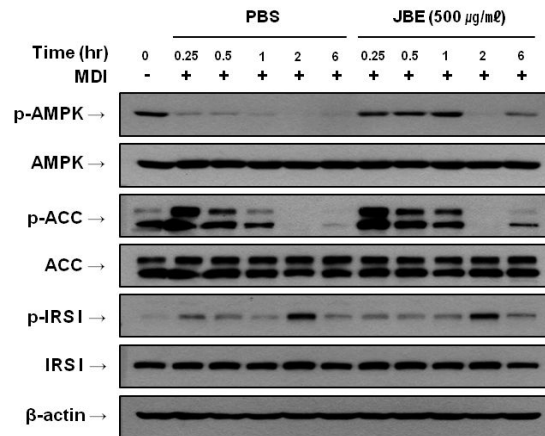


Figure 5. Effects of JBE on mRNA expression of adiponectin and FAS in 3T3-L1 cells. Total RNAs were prepared from 3T3-L1 cells at day 6. 3T3-L1 cells were differentiated in the MDI differentiation medium with different concentration of JBE for 2 days. The cells were then cultured for a further 2 days in the medium containing 1 µg/ml insulin. Then, the cells were cultured in post-differentiation medium, which was replaced every 2 days. UD, undifferentiated. The data expressed as mean ± S.E of three experiments.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to positive control

A



B

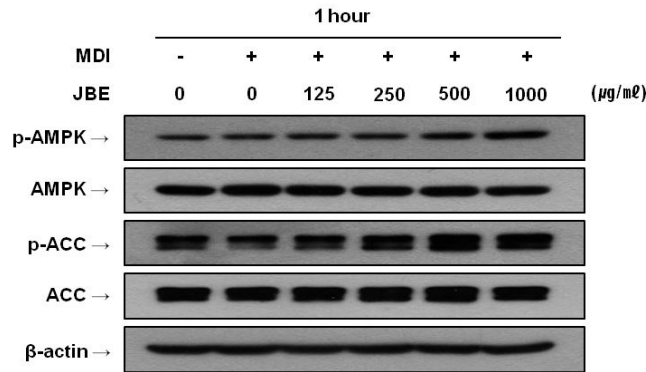


Figure 6. Western blot analysis of phospho-AMPK, phospho-ACC and phospho-IRS 1 in 3T3-L1 cells treated with JBE. Cells were cultured in MDI differentiation medium in presence of absence of JBE at the indicated times. (A) Western blot analysis of phospho-AMPK, phospho-ACC and phospho-IRS 1 in post-confluent differentiated 3T3-L1 cells. Total protein was harvested at indicated times. (B) Western blot analysis of phospho-AMPK and phospho-ACC in post-confluent differentiated 3T3-L1 cells. Total proteins were harvested in 1 hours after differentiation induction. The data shown are representative of three independent experiments.

2. *p*-coumaric acid (CA)가 지질대사에 미치는 영향

JBE에 함유된 활성물질을 동정하기 위한 일환으로 JBE에 다량 함유되어 있는 *p*-coumaric acid (CA)가 지질대사에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. 우선 CA가 3T3-L1 세포에서 세포생장과 세포독성이 있는지 여부를 확인하기 위해서 MTT와 LDH 분석을 수행하였다. CA를 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 및 100 μ M의 농도로 처리하였을 때, CA를 처리한 모든 농도에서 세포독성이 없는 것을 확인 할 수 있었다 (Figure 7A, B). 이를 바탕으로 CA 100 μ M의 농도를 최고 처리 농도로 하여 세포실험을 진행하였다.

1) 전구지방세포 분화억제 활성

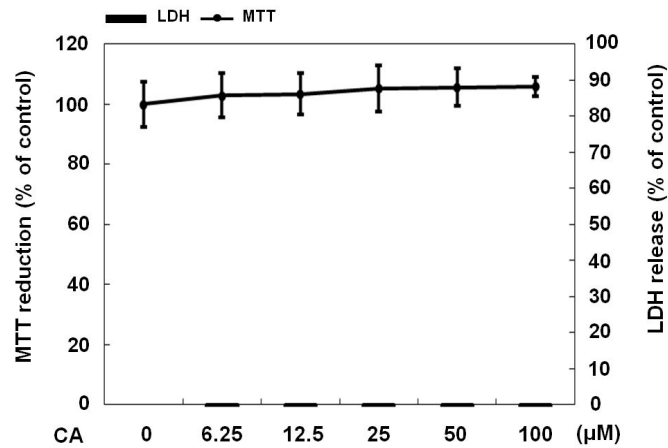
3T3-L1 전구지방세포의 분화에 CA가 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 분화유도와 함께 CA (100 μ M)를 분화 시기별로 처리하였다. 분화유도 8일 후에 세포를 Oil Red O 염색하여 지방소적을 관찰한 결과, CA를 0-8, 2-8, 그리고 4-8 일 기간 동안 처리한 실험군에서만 지질축적이 억제되었다 (Figure 8A). 지방소적을 정량적으로 분석한 결과, CA를 0-8, 2-8, 그리고 4-8 일 기간 동안에 처리한 군에서만 유의적인 감소 양상을 나타내었다 (Figure 8B). 또한 CA는 분화유도 4일 이후부터 지방세포의 분화를 조절하는 핵심인자인 C/EBP α 와 지방세포 분화 초기에 발현되는 SREBP-1c의 활성화 상태인 68 kDa의 발현을 감소시켰다. 하지만 SREBP-1c의 전구체 상태인 125 kDa의 발현에는 영향이 없었다 (Figure 9). 이는 CA의 지질축적 억제 작용이 분화유도 4일 이후부터 나타나고 있음을 제시하고 있어, 분화유도 4일 부터 8일 까지 CA를 농도별 (0, 12.5, 25, 50, 및 100 μ M)로 처리하여 Oil Red O 염색 후 지방축적 정도를 측정하였다. 그 결과 CA가 지방축적을 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 10A). 또한 지방소적을 정량적으로 분석한 결과 CA를 처리한 군은 시료를 처리하지 않은 양성대조군 ($100 \pm 3.1\%$)에 비해서 $97.06 \pm 4.1\%$, $97.49 \pm 4.6\%$, $90.68 \pm 4.7\%$, $82.82 \pm 2.5\%$ 의 값을 나타내었고, 50 μ M 농도의 CA를 처리한 군부터 유의적인 감소경향을 보였다 (Figure 10B). 또한 분화유도 후 4일부터 8일까지 CA를 농도별로 처리한 군의 C/EBP α 및 SREBP-1c의 발현양은 양성대조군

에 비해서 농도 의존적으로 감소하였다 (Figure 11).

2) 분화된 지방세포에서 CA가 지방산 β -산화, 포도당 흡수 및 지방분해에 미치는 영향

CA가 지방산 β -산화, 포도당 흡수 및 지방분해 작용에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. 우선 CA가 AMP-activated protein kinase (AMPK) 경로를 활성화 시키는지 여부를 조사하였다. CA를 분화된 지방세포에 24시간 동안 농도별 (6.25, 12.5, 25, 50 및 100 μ M)로 처리한 결과, AMPK와 그 기질인 acetyl-CoA carboxylase (ACC)의 인산화가 농도 의존적으로 증가하였다 (Figure 12A). 또한 지방산 β -산화와 관련된 유전자인 CPT-1a의 mRNA 발현을 Real-time PCR 기법으로 분석한 결과, CA는 CPT-1a의 mRNA 발현을 50 μ M 부터 유의적으로 증가시켰다. 포도당 흡수에 미치는 CA의 영향을 형광으로 표지된 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose (2-NBDG)를 이용하여 분석하였다. 분화된 지방세포에 인슐린과 2-NBDG 그리고 CA를 각각 25, 50 및 100 μ M의 농도로 처리한 결과, 인슐린을 처리하지 않은 군, 인슐린을 처리한 군 모두에서 유의적인 차이를 발견할 수 없었다 (Figure 13A). 마찬가지로 지방세포에서 방출된 glycerol의 양을 측정 한 결과, CA는 지방분해에 영향을 나타나지 않았다 (Figure 13B).

A



B

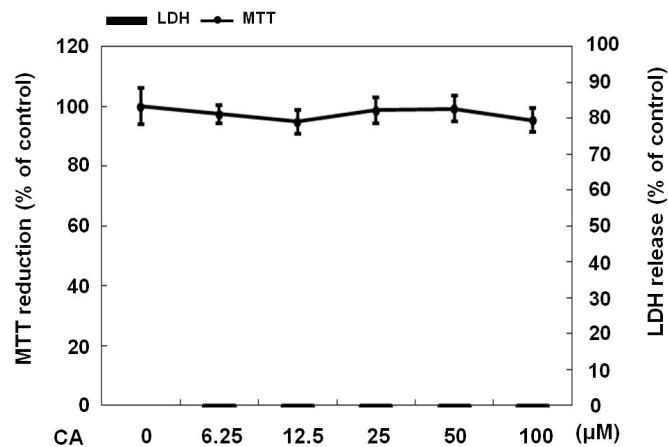
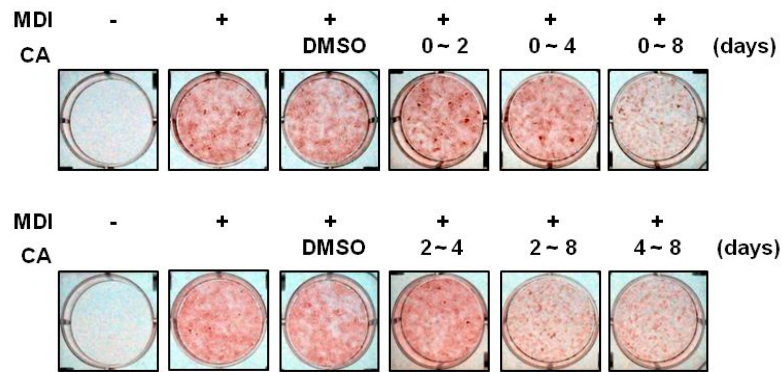


Figure 7. Viability and cytotoxicity of the *p*-coumaric acid on 3T3-L1 preadipocytes and mature adipocytes. (A) Preconfluent preadipocytes and (B) mature adipocytes were treated with various concentration of *p*-coumaric acid (CA) for 48 hours. Cytotoxicity was determined by MTT and LDH assay. The data expressed as mean \pm S.E of three experiments. 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, positive control (vehicle).

A



B

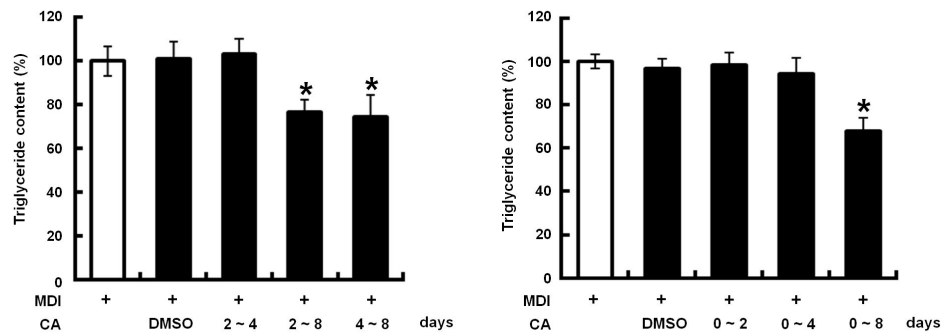


Figure 8. Effect of *p*-coumaric acid on lipid accumulation during differentiation stages of 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were differentiated in the MDI differentiation medium for 2 days. The cells were then cultured for a further 2 days in the medium containing 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin. Then, the cells were cultured in post-differentiation medium, which was replaced every 2 days. CA (*p*-coumaric acid, 100 μM) was treated for indicated periods of time. (A) After 8 days, cells were stained with Oil Red O. (B) Triglyceride contents. (-), negative control; 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, positive control; MDI, 0.5 mM IBMX, 1 μM DEXA, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin.

* $p < 0.05$ compared to positive control

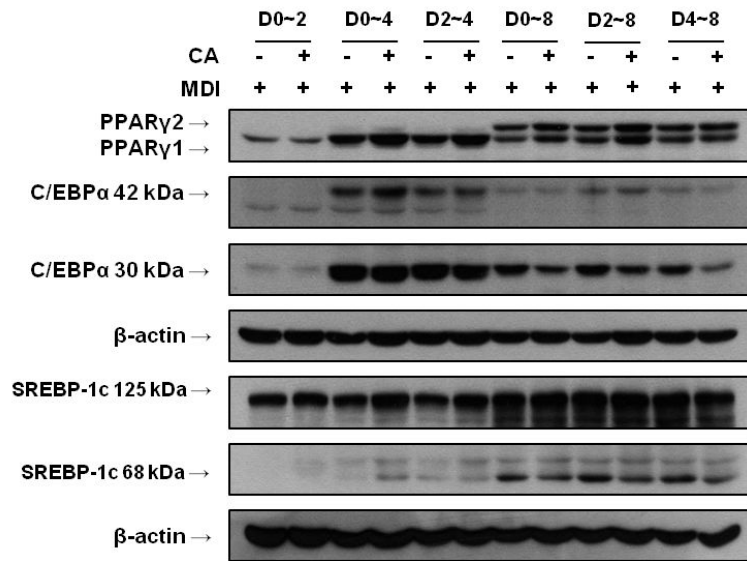
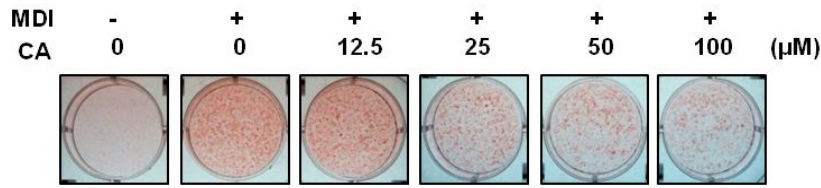


Figure 9. Western blot analysis of PPAR γ , C/EBP α and SREBP-1c during differentiation stages of 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were differentiated in the MDI differentiation medium for 2 days. The cells were then cultured for a further 2 days in the medium containing 1 μ g/ml insulin. Then, the cells were cultured in post-differentiation medium, which was replaced every 2 days. CA (*p*-coumaric acid, 100 μ M) was treated for indicated periods of time. Total protein was harvested at indicated periods of time. The data shown are representative of three independent experiments. MDI; 0.5 mM IBMX, 1 μ M DEXA, 1 μ g/ml insulin.

A



B

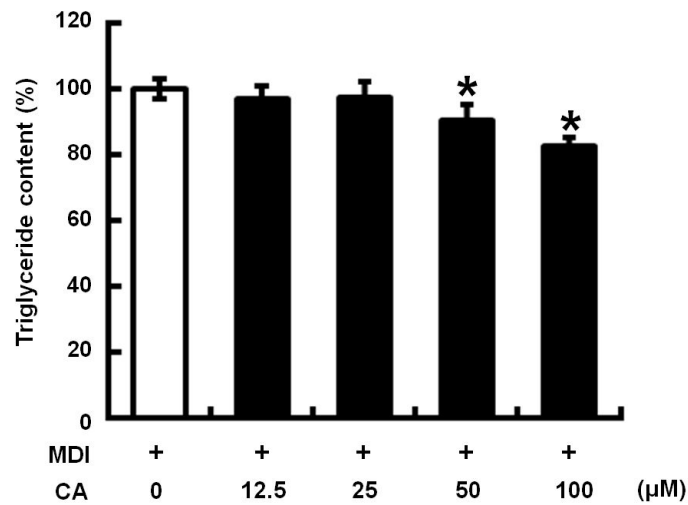


Figure 10. Effect of *p*-coumaric acid on lipid accumulation of 3T3-L1 cells during adipogenesis. 3T3-L1 cells were differentiated in the MDI differentiation medium for 2 days. The cells were then cultured for a further 2 days in the medium containing 1 μg/ml insulin. Then, the cells were cultured in post-differentiation medium, which was replaced every 2 days. CA was treated from day 4 to day 8. (A) After 8 days, cells were stained with Oil Red O. (B) Triglyceride contents. (-), negative control; 0 μg/ml, positive control; MDI, 0.5 mM IBMX, 1 μM DEXA, 1 μg/ml insulin. **p* < 0.05 compared to positive control

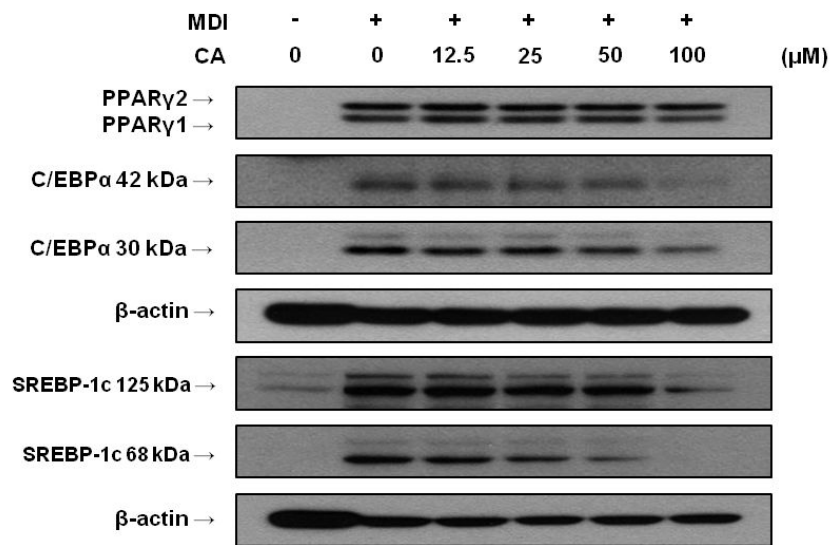
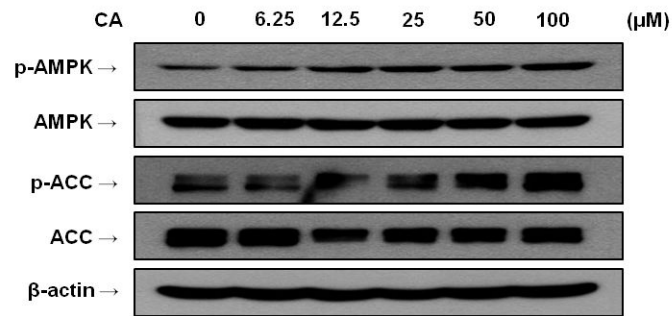


Figure 11. Western blot analysis of PPAR γ , C/EBP α and SREBP-1c in 3T3-L1 cells treated with *p*-coumaric acid. 3T3-L1 cells were differentiated in the MDI differentiation medium for 2 days. The cells were then cultured for a further 2 days in the medium containing 1 μ g/ml insulin. Then, the cells were cultured in post-differentiation medium, which was replaced every 2 days. CA was treated from day 4 to day 8. Total protein was harvested to analyze by western blot at day 8. The data shown are representative of three independent experiments. MDI; 0.5 mM IBMX, 1 μ M DEXA, 1 μ g/ml insulin.

A



B

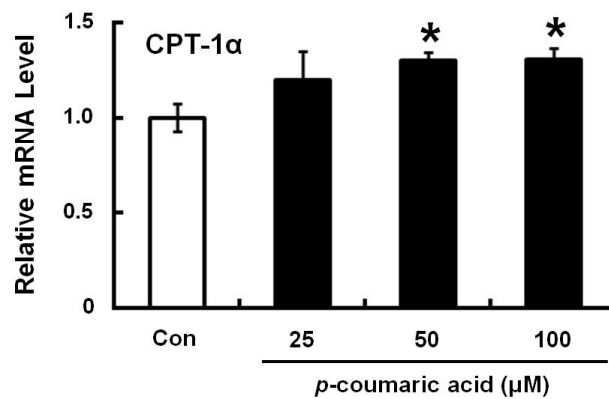
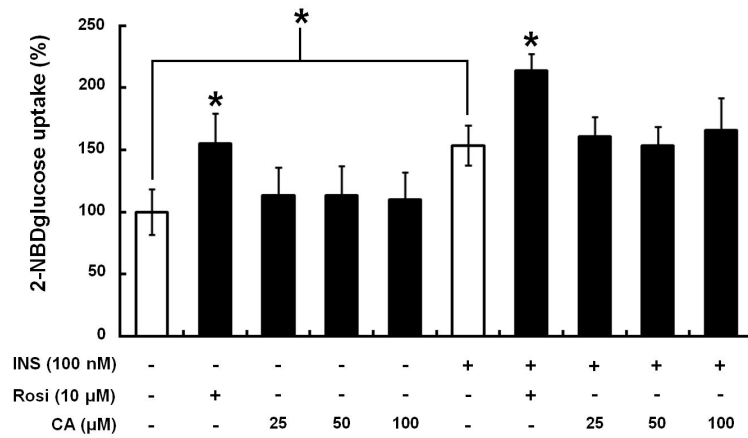


Figure 12. Effects of *p*-coumaric acid on AMPK signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. Mature adipocytes were treated with *p*-coumaric acid (CA) for 24 hours. (A) The phosphorylation level of AMPK and ACC were examined by Western blot. (B) The mRNA expression of CPT-1a was examined by Real-time PCR analysis. The mean values of the results are shown with the SD (n = 3). **p* < 0.05 compared to positive control

A



B

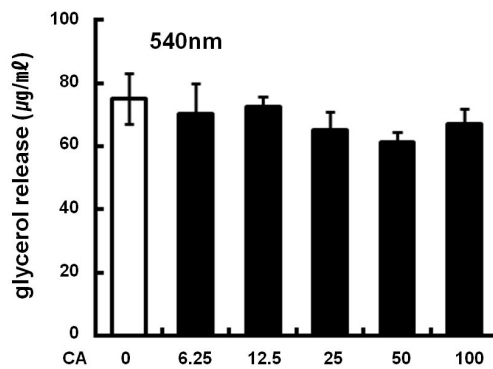


Figure 13. Effects of *p*-coumaric acid on 2-NBDG uptake and glycerol release in 3T3-L1 adipocytes. (A) Mature adipocytes were cultured in 12 well plate for 30min with *p*-coumaric acid (CA) or rosiglitazone (Rosi, 10 μM), and then added 100 nM insulin. After 20 min, cells were treated 100 μM 2-NBDG with 2-Deoxy-D-glucose for 2 hours. (B) Mature adipocytes were treated with *p*-coumaric acid at indicated concentrations for 48 hours. 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 제주도에만 자생하는 제주조릿대 추출물 (JBE)과 *p*-coumaric acid (CA)가 지방세포의 분화 및 지질대사에 미치는 영향과 그 기전을 밝히기 위하여 수행하였다.

3T3-L1 전구지방세포의 분화는 PPAR γ , C/EBP α , SREBP-1c 와 같은 지방세포 특이 전사인자들이 관여하고, 이 과정에서 세포의 형태적 변화와 유전자 발현양상의 변화 등이 함께 일어나게 된다 (Robert *et al.*, 1999, Filer *et al.*, 1998). 본 연구에서 제주조릿대 추출물 (JBE)은 분화유도물질 (MDI)과 동시에 처리하였을 때 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서부터 지방세포의 분화를 효율적으로 억제시켰으며, 지방세포 분화 지표 단백질들의 발현을 현저하게 감소시켰다. 이러한 JBE의 분화억제 활성은 PPAR γ , C/EBP α 그리고 aP2의 발현감소를 통해 나타나는 것으로 사료된다.

ERK는 세포의 증식과 분화에 중요한 역할을 한다. 지방세포에서 ERK는 분화초기에 증식단계를 자극하고, 분화 후기에는 PPAR γ 의 인산화를 차단함으로써 세포의 과분화를 차단한다 (F. Bost *et al.*, 2005). CCAAT/ enhancer binding protein β (C/EBP β)는 지방세포 분화초기에 발현되고 C/EBP α 의 조절인자로서 지방세포의 분화를 조절한다 (M. Daniel Lane *et al.*, 1999). Sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c)는 PPAR γ 의 전사활성을 증가시키고 분화를 촉진하며, SREBP-1c의 억제는 지방산대사의 감소와 PPAR γ 의 활성화를 억제시킨다 (Kim *et al.*, 1996). JBE는 C/EBP β 의 발현과 ERK의 인산화에는 영향을 주지 않았다. 하지만 SREBP-1c의 발현을 감소시켰고, 하위 표적유전자인 FAS와 지방세포 특이적으로 발현되는 adipokine인 adiponectin의 mRNA 발현을 감소시켰다. 이러한 결과는 JBE가 SREBP-1c의 발현을 감소시킴으로서 지방세포 분화 지표단백질들의 발현에 영향을 미친다는 결과로 사료된다.

지방산 합성 및 대사에 중추적인 역할을 하는 SREBP-1c는 주로 인슐린과 AMPK 신호전달체계에 의해 조절된다고 보고된 바 있다 (Gaochao Zhou *et*

al., 2001, Kim *et al.*, 2004). 따라서 JBE가 AMPK signaling 및 IRS-1의 인산화에 미치는 영향을 확인하였다. JBE는 IRS-1의 인산화에는 영향을 주지 않았다. 하지만 AMPK와 그 기질인 acetyl-CoA carboxylase (ACC)의 인산화를 증가시켰다. 이러한 결과는 JBE가 지방세포 분화초기에 AMPK signaling을 활성화시킴으로서 SREBP-1c의 발현을 억제한다고 사료되는 결과이다.

제주조릿대는 다양한 폴리페놀류를 포함하고 있으며, Kang 등 (2012)의 연구는 제주조릿대 추출물의 고지방식으로 유도된 쥐에서 항비만 효과를 보여주었다. 또한 *p*-coumaric acid가 제주조릿대 추출물의 주요물질이라고 제시하였다. C/EBP α 는 지방세포 분화 후기에 발현되어 중성지방의 합성을 조절하는 DGAT와 adiponectin의 발현을 조절한다 (Yen *et al.*, 2008, Payne *et al.*, 2007). SREBP-1c는 지방산 및 콜레스테롤대사를 조절하는 핵심인자이다 (Kim., 2000). 따라서 JBE에 함유된 활성물질을 동정하기 위한 일환으로 *p*-coumaric acid (CA)를 이용하여 지질대사에 미치는 영향에 대해 조사하였다. CA는 분화유도 4일 이후부터 지방세포의 지질축적을 효율적으로 억제시켰다. 또한 C/EBP α 와 SREBP-1c의 발현을 감소시켰다. 이러한 결과는 CA가 지방세포 분화 후기에 C/EBP α 및 SREBP-1c의 발현을 감소시킴으로서 지질축적 억제활성을 나타낸다는 결과로 사료된다. 하지만 CA가 C/EBP α 및 SREBP-1c의 발현감소를 통해 중성지방 합성 및 지방산 대사에 어떠한 영향을 미치는지, 어떠한 신호전달 경로를 통해 분화후기에 지질축적을 억제시키는지에 관해서는 더 연구가 필요하다고 생각된다.

AMP-activated protein kinase (AMPK)의 활성화는 그 기질인 ACC를 불활성화 시키고, 이는 malonyl-CoA를 감소시켜 지방산을 미토콘드리아 내로 운반하는 carnitine palmitoyl transferase-1 (CPT-1)의 활성화를 증가시킨다 (Kahn *et al.*, 2005, Munday *et al.*, 2002, McGarry *et al.*, 2002). 본 연구에서 CA는 AMPK와 ACC의 인산화 및 CPT-1a의 mRNA 발현을 증가시켰다. 이러한 결과는 성숙한 지방세포에서 CA가 AMPK signaling의 활성화를 통해 지방산의 β -산화를 촉진하는 작용을 할 것으로 사료되는 결과이다.

지방조직에서 중성지방의 과도한 축적은 비만과 관련된 제2형 당뇨, 동맥경

화와 같은 질병을 유발하는 원인으로서 중성지방의 분해와 산화를 촉진시키는 작용은 비만을 치료할 수 있는 기전 중 하나 이다 (Ahmadian *et al.*, 2010). 당 흡수 작용은 비만에 의한 제2형 당뇨병을 치료하는 중요한 기전으로 인슐린에 의한 포도당 흡수는 지방조직에 중성지방을 축적시킨다 (Khan *et al.*, 2002). CA는 포도당 흡수와 지방분해에는 특이적인 활성을 나타내지 않았다.

본 연구의 결과를 종합해 보았을 때 JBE는 지방세포 분화 초기에 AMPK signaling의 활성화를 통해 지방세포의 분화를 억제하는 것으로 사료된다. 또한 CA는 지방세포 분화 4일 이후부터 C/EBP α 와 SREBP-1c의 발현 감소를 통해 지질축적 억제활성을 나타내고, 성숙한 지방세포에서 AMPK signaling의 활성화를 통해 지방산 β -산화를 촉진시킬 것으로 사료된다. 하지만 JBE에 다량 함유되어 있는 CA의 활성은 JBE의 작용기전과 동일하지 않은 것으로 판단된다. 따라서 JBE의 지방세포 분화억제 활성을 나타내는 물질을 동정하기 위한 후속적인 연구가 필요하다고 사료된다.

V. 참고 문헌

- Abdel-Wahab MH, El-Mahdy MA, Abd-Ellah MF, Helal GK, Khalifa F, Hamada FM. Influence of p-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart. *Pharmacol Res.* 2003, 48, 461 - 465
- Ahmadian M, Wang Y, Sul HS. Lipolysis in adipocytes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010, 42, 555 - 559
- Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell.* 1999, 4, 585 - 595.
- Barros MP, Lemos M, Maistro EL, Leite MF, Sousa JP, Bastos JK, Andrade SF. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. *J Ethnopharmacol.* 2008, 120, 372 - 377
- Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.* 1997, 89, 331 - 340
- Brun RP, Spiegelman BM. PPAR gamma and the molecular control of adipogenesis. *J Endocrinol.* 1997, 155, 217 - 218
- Cao Z, Umek RM, McKnight SL. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev.* 1991, 5, 1538 - 1552

Cho, K. J., H. E. Moon, H. Moini, L. Packer, D. Y. Yoon and A. S. Chung. α -Lipoic acid inhibits adipocyte differentiation by regulating pro-adipogenic transcription factors via mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem.* 2003, 278, 34823 - 34833

Cho JY, Moon JH, Seong KY, Park KH. Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid and trans 4-hydroxycinnamic acid isolated and identified from rice hull. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1998, 62, 2273 - 2276

Filer JS, Clinical Review 94: what's in a name? In search of leptin's physiologic role. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998, 83: 1407 - 1413

Harmon, A. W. and J. B. Harp. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001, 280, C807 - C813.

Hardie DG. Mini review, The AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinol.* 2003, 144, 5179 - 5183.

Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinase: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007, 8, 774 - 785

Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett.* 2003, 546, 113 - 120

Hardie DG. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that

- regulates all aspects of cell function. *Genes Dev.* 2011, 25, 1895 – 1908
- Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, Beri RK, Carling D, Hardie DG. 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.* 1996, 271, 27879 – 27887
- Hwang J. H, Choi S. Y, Ko H. Ch, Jang M. G, Jin Y. J, Kang S. I, Park J. G, Chung W. S, and Kim S. J. Anti-inflammatory Effect of the Hot Water Extract from *Sasa quelpaertensis* Leaves. *Food Sci Biotechnol.* 2007, 16, 728~733
- Hsu CL, Yen GC. Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mol Nutr Food Res.* 2008, 52, 53 – 61.
- Hudson EA, Dinh EA, Kokubun T, Simmonds MS, Gescher A. Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000, 9, 1163 – 1170
- Janicke B, Onning G, Oredsson M. Differential effects of ferulic acid and p-coumaric acid on S phase distribution and length of S phase in the human colonic cell line Caco-2. *J Agric Food Chem.* 2005, 53, 6658 – 6665
- Jang M. G, Park S. Y, Lee S. R, Choi S. Y, Hwang J. H, Ko H. Ch, Park

- J. G, Chung W. S, and Kim S. J. *Sasa quelpaertensis* Leaf Extracts Induce Apoptosis in Human Leukemia HL-60 Cells. Food Sci Biotechnol. 2008, 17, 188 - 190
- Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. Cell Metab. 2005, 1, 15 - 25
- Kang S. I, Shin H. S, Kim H. M, Hong Y. S, Yoon S. A, Kang S. W, Kim J. H, Ko H. C, and Kim S. J. Anti-Obesity Properties of a *Sasa quelpaertensis* Extract in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. Biosci Biotechnol Biochem. 2012, 76, 755 - 761
- Khan AH, Pessin JE. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. Diabetologia. 2002, 45, 1475 - 1483
- Kim JB, Wright HM, Wright M, Spiegelman BM. ADD1/SREBP1 activates PPAR through the production of endogenous ligand. Proc Natl Acad Sci USA. 1999, 95, 4333 - 4337
- Kim JB. Review: Insights into Fat Cell Differentiation and Insulin Action with ADD1/SREBP1 and PPAR γ . Diabetes and Metabolism Journal (DMJ). 2000, 24, 507 - 511
- Kim JB, Park JY. Molecular insights into fat cell differentiation and functional roles of adipocytokines. 대한내분비학회지. 2002, 17, 1 - 9
- Kim J. B, Cho H. J, Kim W. S and Park. S. Y. PPARs and UCPs: Two

- major regulator in Energy homeostasis. *Biochemistry News*. 2002, 22: 256 - 265
- McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002, 51, 7 - 18
- Medina-Gomez, G.; Vidal-Puing, A. Gateway to the metabolic syndrome. *Nat. Med*. 2005, 11, 602 - 603
- Munday MR. Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans*. 2002, 30, 1059 - 1064
- Nasim Sultana, N. H Lee. A New Alkene Glycoside from the Leaves of *Sasa quelpaertensis* Nakai. *Bull Korean Chem Soc*. 2010, 1088-1090.
- Payne VA, Au WS, Gray SL, Nora ED, Rahman SM, Sanders R, Hadaschik D, Friedman JE, O'rahilly S, Rochford JJ. Sequential regulation of diacylglycerol acyltransferase 2 expression by CAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) and C/EBPalpha during adipogenesis. *J Biol Chem*. 2007, 282, 21005 - 21014
- Raylana S, Della-Fera MA, Baile CA. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. *J Nutr Biochem*. 2008, 19, 717 - 726
- Ceddia R. B. Review, The role of AMP-activated protein kinase in regulating white adipose tissue metabolism. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012.
- Robert M. Cowherd, Robert E. Lyle and Robert E. McGehee Jr. *Molecular*

regulation of adipocyte differentiation. *Semin Cell Dev Biol.* 1999, 10, 3
- 10

Shimomura, I.; Funahashi, T.; Takahashi, M.; Maeda, K.; Kotani, K.; Nakamura, T.; Yamashita, S.; Miura, M.; Fukuda, Y.; Takemura, K.; Tokunaga, K.; Matsuzawa, Y. Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nat. Med.* 1996, 2, 800 - 803.

Spiegelman BM, Filter S. Adipogenesis and Obesity ; rounding out the big picture. *Cell.* 1996, 87, 377 - 389.

Stephan, G., Tseng, Y-H., Kahn, C. R. Developmental Origin of Fat; Tracking Obesity to Its Source. *Cell.* 2007, 131; 242 - 256

Sul HS, Latasa MJ, Moon Y, Kim KH. Regulation of the fatty acid synthase promoter by insulin. *J Nutr.* 2000, 130, 315S - 320S

World Health Organization factsheet 311. Obesity and overweight. available from www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/

Yen CL, Stone SJ, Koliwad S, Harris C, Farese RV Jr. Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J Lipid Res.* 2008, 49, 2283 - 2301

Zhang, C., L. Teng, Y. Shi, J. Jin, Y. Xue, K. Shang and J. Gu. Effect of emodin on proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocyte and FAS activity. *Chin Med J.* 2002, 115, 1035-1038.

VI. 요약

본 연구에서는 제주조릿대 추출물과 *p*-coumaric acid가 지방세포의 분화 및 지질대사에 미치는 영향을 확인하였다. 제주조릿대 추출물 (JBE)은 3T3-L1 전구지방세포에서 분화유도 물질 (IBXM, DEXA, Insulin)과 함께 처리했을 때 지방세포의 분화 및 지질의 축적을 농도 의존적으로 감소시켰다. 또한 이들은 분화의 표적 전사인자인 PPAR γ , C/EBP α 그리고 aP2의 발현을 효과적으로 감소시켰다. 뿐만 아니라 JBE는 분화유도 초기에 발현되는 SREBP-1c의 단백질 발현과 그 하위 표적인자인 FAS 및 지방세포 특이적으로 분비되는 adiponectin의 mRNA 발현을 억제하였다. 그리고 JBE는 분화유도 초기에 SREBP-1c의 발현을 조절하는 AMPK와 그 기질인 ACC의 인산화를 농도 의존적으로 증가시켰다. *p*-coumaric acid (CA)는 3T3-L1 전구지방세포 분화유도 4일 후부터 지질의 축적을 농도 의존적으로 감소시켰고, 분화의 표적 전사인자인 C/EBP α 와 SREBP-1c의 단백질 발현을 효과적으로 감소시켰다. 또한 CA는 성숙한 지방세포에서 AMPK와 ACC의 인산화를 증가시켰으며, 지방산 β -산화와 관련된 유전자인 CPT-1a의 발현을 증가시켰다. 하지만 CA는 인슐린 비의존적 혹은 의존적 당 흡수와 지방분해 작용에는 유의적인 영향을 미치지 않았다. 본 연구 결과를 정리해보면 JBE는 지방세포 분화 초기에 AMPK signaling의 활성화를 통해 분화를 억제하는 것으로 판단된다. CA는 지방세포 분화 4일 후부터 C/EBP α 와 SREBP-1c 발현의 감소를 통해서 지방축적을 억제하고, 성숙한 지방세포에서 AMPK signaling의 활성화를 통해 지방산의 β -산화를 촉진하는 것으로 판단된다.