

3T3-L1 지방전구세포에서 용아초 에틸아세테이트 추출물의 항비만 효과

이정아¹ · 안은경¹ · 홍성수¹ · 오좌섭^{1,2*}

¹(재) 경기과학기술진흥원 천연물신약연구소
²단국대학교 약학대학

Anti-Obesity Effect of Ethyl Acetate Extracts from *Agrimonia pilosa* Ledeb. in 3T3-L1 Preadipocytes

Jung A Lee¹, Eun-Kyung Ahn¹, Seong Su Hong¹, and Joa Sub Oh^{1,2*}

¹Natural Products Research Institute, Gyeonggi Institute of Science & Technology Promotion,
Gyeonggi-do 443-766, Korea

²College of Pharmacy, Dankook University, Chungnam 330-714, Korea

Abstract

To evaluate the anti-obesity effect of *Agrimonia pilosa* L., this study investigated that ethyl acetate extract from *A. pilosa* L. (EAAP) suppresses lipid accumulation and inhibits expression of adipogenic marker genes, such as peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ), CCAAT-enhancer-binding protein α (C/EBP α), glucose transporter 4 (GLUT4), and adiponectin in 3T3-L1 preadipocytes. We demonstrated that EAAP inhibited adipocyte differentiation and expression of PPAR γ and C/EBP α mRNA levels in a dose-dependent manner. In addition, EAAP reduced the PPAR γ transcriptional activity stimulated by rosiglitazone in HEK 293T cells and decreased the expression of GLUT4 and adiponectin in 3T3-L1 cells. These results suggest that EAAP inhibits preadipocyte differentiation and adipogenesis by blocking of PPAR γ and C/EBP α gene expression in 3T3-L1 cells.

Key words: *Agrimonia pilosa* Ledeb., adipogenesis, PPAR γ , C/EBP α , 3T3-L1 cells

서 론

비만은 에너지 섭취량과 소비량의 불균형으로 인해 체내에 지방이 과잉 축적되어 있는 상태를 말하며 그 원인으로는 서구화된 식생활, 내분비 장애, 유전적 요인 등을 들 수 있다. 또한 비만은 당뇨, 고혈압, 심혈관계 질환, 고지혈증과 같은 성인병을 일으키는 주요 인자로 밝혀지면서 전 세계적으로 심각한 질환으로 대두되고 있다(1). 지방세포는 에너지 항상성 유지 및 지질대사에 중요한 역할을 하고, 지방전구세포인 3T3-L1은 여러 호르몬과 다양한 전사인자들에 의해 지방세포로 분화되면서 세포내 지방을 축적한다. 이러한 지방세포 형성(adipogenesis) 과정에 관여하는 중요한 인자로는 peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ)와 CCAAT-enhancer-binding protein α (C/EBP α)가 있다(2,3). PPAR γ 는 nuclear hormone receptor superfamily 중 하나이며, retinoid X receptor (RXR)와 heterodimer를 형성하여 표적유전자의 발현을 조절하는 전사인자이고 C/EBP α 는 basic leucine zipper 군에 속하는 전사인자로서 제일 처음 지방세포 분화에 관여하는 인자로 밝혀졌다. 이들 두 인자는 분화 초기에 발현되는 C/EBPs에 의해 유전자 발현이 증가

하고 지방세포가 분화되는 동안 adiponectin과 glucose transporter 4 (GLUT4)와 같은 adipogenic gene의 발현을 조절한다(4,5).

용아초(*A. pilosa* L.)는 주로 북반구 온대지방에서 자생하는 여러해살이풀로 우리나라에서는 주로 야산이나 길가, 들판에서 흔히 자라며, 선화초, 짚신나물, 황화초, 탈력초 등으로 불린다. 용아초는 전통적으로 복통, 인후염, 두통 치료를 위한 의약품으로 사용되어 왔고(6) 민간에서는 지혈제 또는 설사를 멈추게 하는 약으로 더러 사용해 왔다고 알려져 있다. 특히 용아초에서 추출한 triterpenoid와 phenolic 성분은 항암이나 항산화 및 항염증에 효과가 있고 간 보호 효과가 탁월하다고 알려져 있다(7-9). 그러나 아직까지 용아초의 항비만 효과나 지방세포 분화 조절에 관여하는 유전자 발현 및 그 작용기전에 대한 연구는 보고되어 있지 않다.

이에 본 연구자들은 150여종의 약용식물 library를 Oil Red O assay에 적용하여 screening을 수행한 결과 지방분화 억제활성이 가장 우수하게 판단된 식물로 용아초를 선택했으며 이 식물을 이용 용매분획을 진행하여 핵산, 디클로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올, 물에 해당하는 분획물을 습득하였다. 이 분획물들을 이용 Oil Red O assay를 실시하여

*Corresponding author. E-mail: jsch@dankook.ac.kr
Phone: 82-31-888-6100, Fax: 82-31-888-6129

항비만 *in vitro* 효능을 평가한 결과 100 µg/mL를 처리한 농도에서 디클로메탄은 세포독성이 나타났고, 핵산 분획물은 63.6%, 에틸아세테이트 분획물은 84.3%, 부탄올 분획물은 47.8%, 물 분획물은 14.7% 억제 효과를 나타내었다. 앞선 실험의 결과를 토대로 본 연구에서 항비만 활성이 가장 우수한 에틸아세테이트 추출물을 이용하여 3T3-L1 지방전구세포의 분화 억제 활성과 PPAR γ , C/EBP α 와 adipogenic marker인 GLUT4, adiponectin의 유전자 발현 억제 작용 등을 관찰하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 추출물 제조

실험에 사용한 용아초는 2009년 4월 서울시 소재 경동시장에서 구입하였으며, 경기과학기술진흥원 천연물신약연구소 천연물신약연구팀 홍성수 박사가 동정한 후 사용하였다. 표본은 경기과학기술진흥원 천연물신약연구소 천연물신약연구팀(표본번호: G21)에 보관중이다. 용아초 추출물과 분획물의 제조로는 용아초 1 kg을 70% 에탄올 수용액 50 mL로 실온에서 24시간 동안 추출하고 여액을 감압 농축하여 에탄올 추출물 114 g을 얻었다. 수득한 용아초 추출물에 정제수 1,000 mL을 넣고 교반하여 현탁 한 후 계통분획법에 의하여 핵산(7.6 g), 디클로로메탄(6.5 g), 에틸아세테이트(9.5 g), 수화부탄올(15 g) 및 물로 분획하여 각각의 용매별 추출물을 제조하였다. 이들 용매별 추출물 중 가장 좋은 활성을 나타낸 에틸아세테이트 분획물을 이용하여 실험을 진행하였다.

재료 및 시약

Dulbecco's modified Eagle media(DMEM), fetal bovine serum(FBS), trypsin-EDTA 및 penicillin-streptomycin은 WelGene사(Deagu, Korea)에서 구입하였다. Bovine calf serum(BCS), Invitrogen사(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. Insulin, Oil Red O 염색 시약, dimethyl sulfoxide(DMSO)은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였고, isobutyl methyl xanthine (IBMX), dexamethasone은 Calbiochem사(Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였다. 또한 Real-time PCR을 위해 사용한 SYBR green은 Takara사(Shiga, Japan)에서 구입하여 실험하였다.

3T3-L1 세포배양과 분화

실험에 사용한 3T3-L1(CL-173) 세포는 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)로부터 구입하였고 마우스 지방전구세포인 3T3-L1 세포는 10% BCS DMEM 배지를 넣고 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다.

3T3-L1 지방전구세포를 24 well plate에 5×10⁴/well의 세포수로 분주한 후 100% confluency 시점이 되면 2일 동안

더 유지시켰다. 지방전구세포는 MDI(0.5 mM IBMX, 1 µM dexamethasone, 1 µg/mL insulin)를 포함하는 10% FBS DMEM 배지로 지방세포 분화를 2일 동안 유도하였고, 배양 48시간 후, 1 µg/mL insulin이 함유된 10% FBS DMEM으로 이를 동안 배양하였다. 그 후 2일마다 4일 동안 10% FBS DMEM 배양액으로 교체하였다. 지방세포 분화 유도 동안 용아초 에틸아세테이트 분획물을 50, 100 µg/mL의 농도로 각 배양액에 처리하였고, 분화가 완성되는 시점인 8일째에 지방세포 분화 정도를 관찰하였다.

MTT assay

MTT assay는 탈수소 효소작용에 의해 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색의 비수용성 MTT formazan(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법으로 3T3-L1 세포에서 용아초 에틸아세테이트 추출물에 의한 세포독성을 간접적으로 측정하였다. 3T3-L1 세포를 96 well plate에 5×10³/well의 개수로 배양하여 24시간 후 용아초 에틸아세테이트 분획물을 처리하여 5% CO₂, 37°C 조건하에서 24시간 더 배양하였다. PBS에 용해시킨 5 mg/mL MTT 시약을 첨가하여 37°C에서 2시간 배양한 후 상층액을 제거하고 DMSO를 100 µL 첨가하여 ELISA reader기(Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA)를 통해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Oil-Red O 염색

8일 동안 분화 후에 배지를 제거한 뒤 10% formaldehyde 용액으로 세포를 고정하였다. 상온에서 30분 동안 고정된 뒤 용액을 제거하고 PBS로 2번 세척하고 70% 알코올로 2번 세척한 후 Oil Red O 용액을 이용하여 염색하였다. 염색된 세포는 현미경 관찰 후 isopropyl alcohol에 4% NP-40가 첨가된 용액을 이용하여 용해한 후 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Real-time PCR

8일 동안 분화된 3T3-L1 cell을 PBS로 두 번 wash 한 후 cell pellet을 모아 chloroform(Sigma)을 넣고 13000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 상층액을 얻었다. 상층액과 isopropanol을 섞은 후 반응시켜 RNA를 침전시킨 후 에탄올로 1회 세척하여 RNA를 분리한다. 추출된 RNA를 1 µg 사용하여 cDNA를 합성한 후 SYBR Green과 Table 1에 나타낸 PPAR γ , C/EBP α , GLUT4, adiponectin primer를 이용하여 Real-time PCR을 했고 대조군 유전자로는 GAPDH를 사용하였다. PCR 조성은 RNA 1 µg으로 합성된 cDNA를 증류수로 1/50로 희석하여 5 µL를 사용하였고, 10 pmole primer를 각각 0.5 µL, 2X SYBR Green 10 µL, 4 µL의 증류수를 사용하여 total volume을 20 µL로 맞추었다. Real-time PCR cycle은 초기변성은 95°C 30초, 변성은 95°C 5초, annealing은 60°C 15초, 신장반응은 72°C 10초로 하여 40 cycle을 진행했

Table 1. The primer sequence used for real-time PCR

Target	Primer sequences	Accession No.
GAPDH	5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3' (sense) 5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3' (antisense)	BC083080
PPAR γ	5'-CGCTGATGCACTGCCTATGA-3' (sense) 5'-AGAGGTCCACAGAGCTGATTCC-3' (antisense)	NM_011146
C/EBP α	5'-AGGTGCTGGAGTTGACCAGT-3' (sense) 5'-CAGCCTAGAGATCCAGCGAC-3' (antisense)	BC058161
GLUT4	5'-CTTCTTTGAGATTGGCCCTGG-3' (sense) 5'-AGGTGAAGATGAAGAAGCCAAGC-3' (antisense)	NM_009204
Adiponectin	5'-AGCCTGGAGAAGCCGCTTAT-3' (sense) 5'-TTGCAGTAGAACTTGCCAGTGC-3' (antisense)	NM_009605

고 용해곡선은 55°C 시작해서 95°C를 끝으로 하여 0.5°C씩 상승시키며 80번을 반응하여 원하는 형광 값을 검출했다. 형광신호 정량은 Bio-Rad MyiQ program을 사용하였다. PCR에 사용한 primer sequence는 Table 1에 나타내었다.

PPAR γ transcriptional activity assay

pGL3-basic luciferase expression 벡터(promega)에 PPAR γ response element(PPRE) 유전자와 PPAR γ 유전자를 삽입하여 얻은 재조합 벡터와 control reporter로서 Renilla luciferase의 cDNA를 가지는 pRL-SV-40 플라스미드(Promega)를 HEK 293T 세포에 co-transfection 하였다. 유전자들은 하루 동안 발현시킨 후 세포에 50, 100 μ g/mL 용아초 에틸아세테이트 추출물과 시료에 PPAR γ 유도물질인 4 μ g/mL rosiglitazone를 같이 처리하여 24시간 동안 처리한 후 용아초 에틸아세테이트 추출물에 의한 PPAR γ 의 전사 활성 정도를 luciferase 발현 정도를 통해 관찰하였다.

통계처리

본 실험결과는 평균(mean)과 표준편차(SD, standard deviation)로 표시하였고, 각 실험군과의 비교는 one-way ANOVA 통계 프로그램을 이용하여 분석한 후, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

세포독성 평가

용아초 에틸아세테이트 추출물의 세포독성 평가는 MTT 방법을 이용해 측정하였다(Fig. 1). 3T3-L1 세포를 96 well plate에 5×10^3 /well 세포수로 분주하여 배양한 후 용아초 에틸아세테이트 추출물을 각각 농도별(0, 12.5, 25, 50, 100 μ g/mL)로 24시간 동안 처리하여 실험을 진행하였다. 그 결과 농도에 따른 세포독성은 유발되지 않았으며 지방세포 분화 억제 활성이 있는 100 μ g/mL 고농도에서도 세포독성이 나타나지 않았다.

3T3-L1 지방전구세포에서 지방세포로의 분화 억제 효과 용아초 에틸아세테이트 추출물이 지방전구세포에서 지방

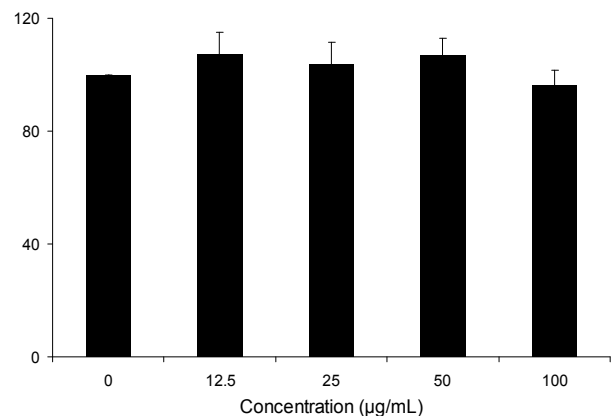


Fig. 1. Cell viability of 3T3-L1 preadipocytes cell. 3T3-L1 cells were treated with EAAP at various concentrations (12.5~100 μ g/mL) for 24 hr. Cell viability was measured by the MTT assay.

세포로의 분화를 억제시키는지 확인하기 위해 3T3-L1 지방전구세포에 dexametason, insulin, IBMX를 처리하여 지방세포로의 분화를 유도시킨 후 분화가 유도되는 동안 세포에 용아초 에틸아세테이트 추출물 50, 100 μ g/mL을 8일 동안 처리하고 Oil Red O 시약을 이용하여 염색을 실시하였다. 염색된 지방구의 염색액을 추출하여 흡광도를 이용, 510 nm에서 O.D. 값을 측정 후 지방축적 정도를 Fold값으로 나타내었다(Fig. 2A). Oil Red O 염색액을 추출한 값을 측정 한 결과 용아초 에틸아세테이트 추출물 50 μ g/mL 처리한 농도에서는 58%, 100 μ g/mL 농도에서는 80% 정도 지방세포로의 분화 억제 효과를 보였고, Fig. 2B는 염색된 지방구를 현미경으로 관찰하여 나타난 것으로, 분화가 유도된 control에 비해 염색된 지방구의 수가 크게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 용아초 에틸아세테이트 추출물이 3T3-L1 지방세포 분화유도과정에 효과를 나타내어 농도 의존적으로 지방량이 축적되는 정도를 유의하게 감소시킨다는 것을 알 수 있었다.

용아초 에틸아세테이트 추출물에 의한 PPAR γ , C/EBP α mRNA 발현과 PPAR γ 전사 활성 억제

용아초 에틸아세테이트 추출물에 의한 지방축적 감소가 어떤 분자생물학적 메커니즘에 의해 유도되는지 확인하기

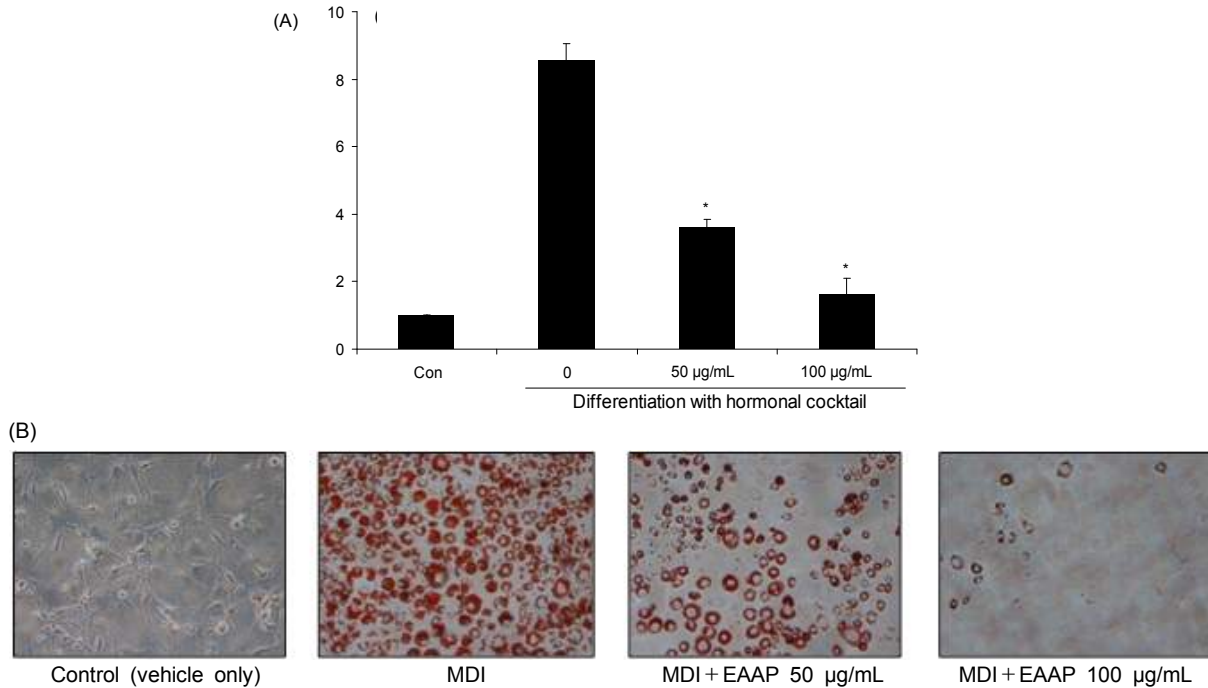


Fig. 2. The effect of EAAP on 3T3-L1 preadipocytes differentiation. (A) Post-confluent 3T3-L1 cells were differentiated in the absence or in the presence of EAAP (50, 100 µg/mL) for 8 days and then the stained triglyceride content was quantified by measuring absorbance. Data are expressed as the statistical significantly * $p < 0.05$. (B) Lipid accumulation was measured by Oil Red O staining.

위해 지방전구세포의 분화를 유도하면서 용아초 에틸아세테이트 추출물을 8일 동안 처리한 후 PPAR γ , C/EBP α 의 mRNA 발현(Fig. 3A)과 PPAR γ 전사 활성 정도를 검토하였다(Fig. 3B). Fig. 2B에서 보여주듯이 지방전구세포에서 지방세포로 분화되는 과정에는 지방 축적에 의해 지방구가 형성하게 되는 형태학적인 변화뿐만 아니라 지방세포 특이적인 단백질 marker의 발현 증가와 같은 생화학적인 변화도 나타난다. 이때 일반적으로 adipokine 분비와 transcription factor의 발현이 크게 증가하는데(10-12) 그중에서도 가장 중요한 활성인자로 PPAR γ 와 C/EBP α 를 들 수 있다(13). 이들 인자들은 분화된 지방세포에서 발현양이 증가하게 되고, 분화 초기에 발현이 유도되며 분화 후기가 되면 다양한 adipogenic 유전자들의 발현을 유도시킨다. 그러므로 용아초 에틸아세테이트 추출물에 의한 지방세포 분화 억제에 PPAR γ 와 C/EBP α 활성 억제를 통한 것인지를 확인하기 위해 용아초 에틸아세테이트 추출물을 3T3-L1 세포 분화를 유도하면서 농도별(50, 100 µg/mL)로 처리하였고 8일 후 real-time PCR를 실시하여 PPAR γ 와 C/EBP α 발현 정도를 측정하였다. Fig. 3A에서 보여주듯이 용아초 에틸아세테이트 추출물 처리에 따라 두 전사인자 모두의 mRNA 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었고, 특히 효과가 좋은 100 µg/mL에서는 분화를 유도하지 않은 control과 거의 같은 수준까지 억제 활성이 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 luciferase assay system을 이용하여 용아초 에틸아세테이트 추출물 처리에 의한 PPAR γ 전사 활성을 측정해 보았다. HEK

293T 세포에 pGL3-PPRE luciferase reporter 유전자와 PPAR γ , pRL-SV-40 플라스미드를 transfection 하여 유전자들을 하루 동안 발현시킨 후 세포에 용아초 에틸아세테이트 추출물을 50, 100 µg/mL 처리하는 실험을 진행하고 좀 더 확실한 PPAR γ 유전자의 반응을 살펴기 위하여 PPAR γ agonist로서 지방세포로의 분화를 촉진시키는 약물인 rosiglitazone(4 µg/mL)과 함께 추출물을 24시간 동안 처리하여 추출물에 의한 PPAR γ 의 전사 활성 정도를 관찰하였다. 그 결과 추출물을 단독으로 처리한 경우, 농도에 따라 PPAR γ 활성이 다소 감소하는 것으로 나타났으나 agonist인 rosiglitazone과 함께 처리했을 시에는 단독으로 처리했을 때보다 큰 활성 억제 효과를 확인할 수 있었고, 50 µg/mL과 100 µg/mL을 처리한 두 군 모두 처리를 안 한 군에 비해 30% 이상 활성이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 이 결과들은 용아초 에틸아세테이트 추출물의 지방분화 억제활성은 PPAR γ signaling pathway의 억제에 의한 것으로 추측되며 이 추출물은 PPAR γ antagonist로써 가능성을 보여주었다.

GLUT4, adiponectin mRNA 발현 억제

3T3-L1 지방전구세포의 분화과정은 앞선 실험에서 보여주듯이 PPAR γ 와 C/EBP α 를 중심으로 다양한 adipogenic marker들의 작용에 의해 조절되는데 분화 후기가 되면 GLUT4와 adiponectin과 같은 termination marker들의 발현이 크게 증가하게 된다(14). GLUT4는 지방세포와 근육세포에서 주로 발현되는 포도당 수용체로 세포질에 분포하고 있

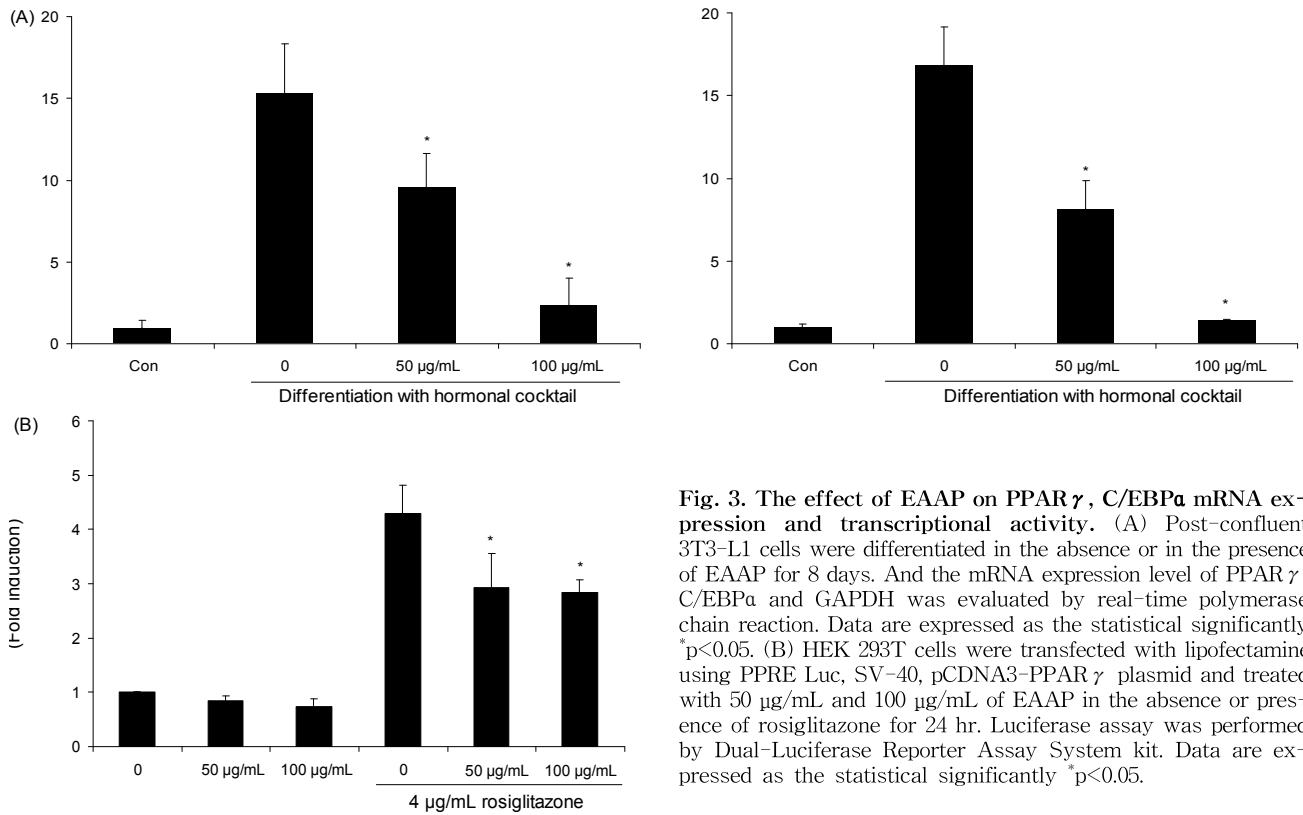


Fig. 3. The effect of EAAP on PPAR γ , C/EBP α mRNA expression and transcriptional activity. (A) Post-confluent 3T3-L1 cells were differentiated in the absence or in the presence of EAAP for 8 days. And the mRNA expression level of PPAR γ , C/EBP α and GAPDH was evaluated by real-time polymerase chain reaction. Data are expressed as the statistical significantly *p<0.05. (B) HEK 293T cells were transfected with lipofectamine using PPRE Luc, SV-40, pCDNA3-PPAR γ plasmid and treated with 50 $\mu\text{g/mL}$ and 100 $\mu\text{g/mL}$ of EAAP in the absence or presence of rosiglitazone for 24 hr. Luciferase assay was performed by Dual-Luciferase Reporter Assay System kit. Data are expressed as the statistical significantly *p<0.05.

다가 인슐린이 존재할 때 세포막으로 이동하여 glucose uptake를 원활하게 일어나도록 하는 역할을 한다(15-19). 그러므로 지방세포의 분화와 지방축적에 있어 포도당의 유입은 중요한 반응으로 이번 실험을 통해 glucose uptake에 있어 중요한 역할을 하는 GLUT4의 mRNA 발현 변화를 측정해 보았다. 또한 지방세포 특이적으로 발현되어 분비되는 adiponectin은 인슐린 민감성과 에너지 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 호르몬으로, 기존 연구 보고에 따르면 PPAR γ agonist는 3T3-L1 지방전구세포에서 adiponectin의 증가를 유도하고 이것은 PPAR response element를 통한 지방세포 분화와 관련 있다고 알려져 있다(20,21).

3T3-L1 지방전구세포의 분화를 유도하면서 용아초 에틸아세테이트 추출물을 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하여 8일 동안 분화시킨 후 GLUT4와 adiponectin의 mRNA 발현을 확인하였다. GLUT4와 adiponectin 발현을 조사한 결과 두 유전자 발현이 모두 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 특히 GLUT4는 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 약 50%, 90% 이상 감소하였고, adiponectin은 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 50% 이상 억제 효과를 나타냈다.

우리는 본 연구에서 전통적인 약재로도 사용가능한 천연물로 용아초 에틸아세테이트 추출물에 의한 항비만 활성 및 그의 작용 메커니즘에 관한 연구를 진행하였다. 비만은 지방

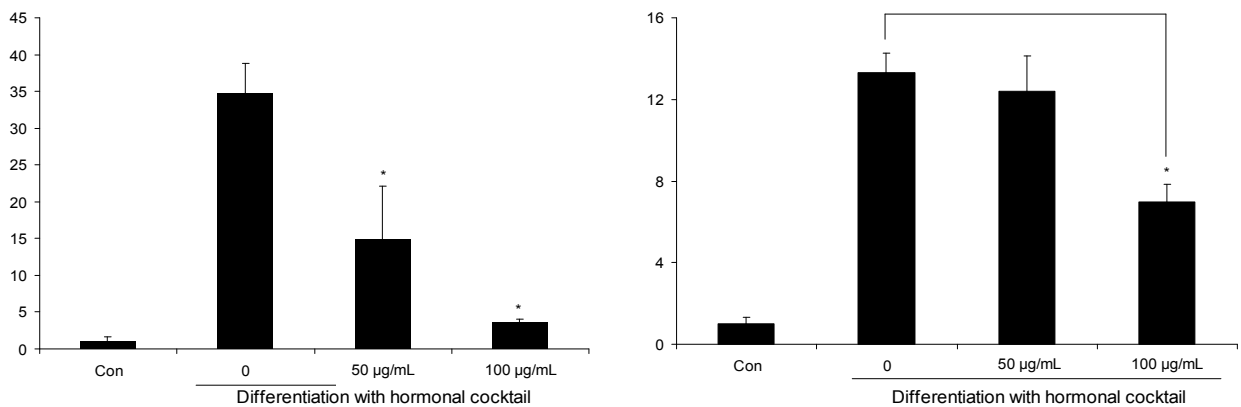


Fig. 4. The effect of EAAP on GLUT4, adiponectin expression in differentiated 3T3-L1 preadipocytes. 3T3-L1 cells were treated with EAAP for 8 days. And GLUT4 and Adiponectin mRNA expression were evaluated by the quantitative real-time polymerase chain reaction. Data are expressed as the statistical significantly *p<0.05.

세포 형성을 통한 지방질의 축적에 의해 발생한다. Adipocyte differentiation은 지방전구세포에서 지방세포로의 분화 과정을 말하며, 이 과정을 통해 지방축적이 일어나므로 지방세포 분화 억제가 비만 치료제 또는 예방제제 개발에 중요한 핵심이 될 것이라고 생각된다. 그러므로 지금까지 진행된 연구는 지방세포분화 억제 및 촉진에 관한 신호전달 체계와 관련하여 PPAR γ 와 C/EBP α 의 발현 억제를 통한 지방세포 분화저해에 관한 것이 대부분이다. 용아초를 이용한 앞선 연구들은 항바이러스, 항산화, 항염에 대한 활성 연구가 있으나(7-9), 아직까지 여러 가지 질환과 작용메커니즘 관련 문헌은 매우 부족하다. 또한 용아초를 이용한 항비만 활성이나 그와 관련된 질환에 대한 효능을 평가한 선행연구가 거의 없으므로 본 연구자들은 최근 여러 질병의 근원이 될 수 있는 비만 치료제를 천연물을 원료로 하는 연구를 진행하다 용아초를 선택하게 되었다. 우선 용아초의 에탄올 추출물을 극성에 따라 핵산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 수포화부탄올, 물 층으로 용매 분획하여 각각 추출물을 확보하였으며, 서론에 제시한 바와 같이 용아초 분획들에 대한 Oil Red O assay를 실시하여 가장 활성이 좋은 에틸아세테이트 분획 추출물을 선택하였다. 따라서 본 추출물을 이용하여 3T3-L1 지방전구세포에서 호르몬 유도를 통한 지방세포 분화 억제를 확인하였고, 지방세포 분화의 중요한 전사인자로 알려진 PPAR γ signaling pathway에 어떤 영향을 미치는지 확인하였다. 다음으로 용아초 에틸아세테이트 추출물이 PPAR γ 와 C/EBP α 의 mRNA 발현을 억제하고 PPAR γ 전사 활성을 효과적으로 감소시키는 것을 증명하였다. 또한 PPAR γ 와 더불어 지방세포 분화와 축적에 영향을 미치는 GLUT4와 adiponectin의 발현 억제를 증명하였다. 본 연구의 결과 용아초 에틸아세테이트 추출물은 3T3-L1 세포가 분화하는 동안 PPAR γ 와 그의 조절 인자를 타깃 하여 신호전달을 조절함으로써 분화억제 활성을 갖는 것을 확인하였다. 그러나 항비만 활성을 나타내는 여러 가지 반응경로가 있으므로 다른 작용기전 관련 down-stream 단백질의 활성화 및 또 다른 신호전달체계에 관한 연구는 좀 더 진행되어야 할 것으로 사료된다. 더 나아가 세포내에서의 항비만 비임상 유효성 평가뿐만 아니라 항비만 치료제 및 기능성식품으로서의 활용가치를 위한 생체 내에서의 비임상 유효성 평가도 진행하여 향후 제품화 가능성을 높이는 것이 남겨진 과제가 될 것이다.

요 약

본 연구에서는 3T3-L1 지방전구세포를 이용하여 용아초 에틸아세테이트 추출물의 항비만 활성을 확인하고자 하였다. 용아초 에틸아세테이트 추출물에 의한 지방세포 분화 및 adipogenesis 저해 활성을 확인하기 위해 추출물을 3T3-L1 지방전구세포에 분화를 유도하면서 농도별(50, 100 μ g/

mL)로 처리하였고, 그 결과 용아초 에틸아세테이트 추출물은 지방세포의 분화를 억제시켰다. 이 같은 활성에 대한 기전을 확인하기 위해 PPAR γ 전사활성과 지방세포 분화에 관여하는 유전자들의 활성을 확인해 보았다. 실험 결과 용아초 에틸아세테이트 추출물은 PPAR γ 전사 활성을 억제시켰고 PPAR γ 및 C/EBP α 의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 감소시켰으며 지방세포 분화에 관여하는 adipokine들의 발현을 조절하는 것으로 나타났다. 따라서 용아초 에틸아세테이트 추출물의 항비만 효과는 지방 생성의 주요 전사인자인 PPAR γ 와 C/EBP α 의 유전자 발현조절을 통해 지방 분화 억제 및 지방 축적을 효과적으로 감소시키는 것으로 보이며, 효과가 있는 농도가 100 μ g/mL로 천연물질로써 비교적 낮은 농도에서 효과가 나타나는 것으로 보아 항비만 소재로의 개발 가능성이 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 고부가가치 식품기술개발사업(311027-03-1-CG000)에 의해 이루어진 것이며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Visscher TL, Seidell JC. 2001. The public health impact of obesity. *Annu Rev Public Health* 22: 355-375.
2. Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA. 1998. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 273: 30057-30060.
3. Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai X, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. 2001. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR: a unified pathway. *Genes Dev* 16: 22-26.
4. Morrison RF, Farmer SR. 2000. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr* 130: 3116S-3121S.
5. Rosen ED, MacDougald OA. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 885-896.
6. An RB, Kim HC, Jeong GS, Oh SH, Oh H, Kim YC. 2005. Constituents of the aerial parts of *Agrimonia pilosa*. *J Nat Prod* 11: 196-199.
7. Kato H, Li W, Koike M, Wang Y, Koike K. 2001. Phenolic glycosides from *Agrimonia pilosa*. *Phytochemistry* 71: 1925-1929.
8. Miyamoto K, Koshiura R, Ikeya Y, Taguchi H. 1985. Isolation of agrimoniin, an antitumor constituent, from the roots of *Agrimonia pilosa* Ledeb. *Chem Pharm Bull* 33: 3977-3982.
9. Zhu L, Tan J, Wang B, He R, Liu Y, Zheng C. 2009. Antioxidant activities of aqueous extract from *Agrimonia pilosa* Ledeb and its fractions. *Chem Biodivers* 6: 1716-1726.
10. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. 2000. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes & Dev* 14: 1293-1307.
11. Jeon T, Hwang SG, Hirai S, Matsui T, Yano H, Kawada T, Lim BU, Ki D. 2004. Red yeast rice extracts suppress adipogenesis by down-regulating adipogenic transcription factors and gene expression in 3T3-L1 cells. *Life Sci* 75: 3195-3203.

12. Cowherd RM, Lyle RE, McGehee Jr RE. 1999. Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 10: 3-10.
13. Cornelius P, MacDougald OA, Lane MD. 1994. Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr* 14: 99-129.
14. MacDougald OA, Lane MD. 1995. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem* 64: 345-373.
15. Ranganathan G, Unal R, Pokrovskaya I, Yao-Borengasser A, Phanavanh B, Lecka-Czernik B, Rasouli N, Kern PA. 2006. The lipogenic enzymes DGAT1, FAS, and LPL in adipose tissue: effects of obesity, insulin resistance, and TZD treatment. *J Lipid Res* 47: 2444-2449.
16. Bogan JS, Mckee AE, Lodish HF. 2001. Insulin-responsive compartments containing GLUT4 in 3T3-L1 and CHO cells: regulation by amino acid concentrations. *Mol Cell Biol* 21: 4785-4806.
17. Czech MP, Corvera S. 1999. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol Chem* 274: 1865-1868.
18. Pessin JE, Thurmond DC, Elmendorf JS, Coker KJ, Okada S. 1999. Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking: location! location! location! *J Biol Chem* 274: 2593-2596.
19. Shepherd PR, Kahn, BB. 1999. Glucose transporters and insulin action-implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med* 341: 248-257.
20. Kadowaki T, Yamauchi T. 2005. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 26: 439-451.
21. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y. 2001. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 50: 2094-2099.

(2011년 10월 11일 접수; 2012년 1월 11일 채택)