

참산부추(*Allium sacculiferum* Max.) 메탄올 추출물의 지방세포 내 ROS 생성 및 지질 축적 억제 효능

최혜영 · 김건희[†]

덕성여자대학교 식물자원연구소

Inhibitory Effects of *Allium sacculiferum* Max. Methanol Extracts on ROS Production and Lipid Accumulation during Differentiation of 3T3-L1 Cells

Hye-Young Choi and Gun-Hee Kim[†]

Plant Resources Research Institute, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

ABSTRACT *Allium sacculiferum* Max. (ASM) is a perennial plant of the *Liliaceae* family and grows over the entire regions of Korea. Obesity is a serious health problem worldwide and has currently become a prevalent chronic disease. Adipocytes produced by preadipocyte differentiation during adipogenesis and adipocytes combined with abnormal accumulation cause obesity. Recently, intracellular reactive oxygen species (ROS) were shown to accelerate lipid accumulation in 3T3-L1 cells. In this study, we investigated the effects of ASM methanol extracts on ROS production and lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. Our results indicate that the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity of ASM methanol extracts increased in a dose-dependent manner. ASM methanol extracts suppressed ROS production and lipid accumulation during adipogenesis. In addition, ASM methanol extracts inhibited the mRNA expression of both pro-oxidant enzymes such as glucose-6-phosphate dehydrogenase as well as the transcription factors, including sterol regulatory element-binding proteins 1c, peroxisome proliferator-activated receptor γ , and CCAAT/enhancer-binding protein α . Our results suggest that ASM methanol extracts inhibit ROS production and lipid accumulation by controlling ROS regulatory genes and adipogenic transcription factors. Thus, ASM has potent natural antioxidant, anti-adipogenic properties and have potential in the development of a potent anti-obesity agent.

Key words: *Allium sacculiferum* Max., adipocyte differentiation, ROS, lipid accumulation

서 론

Allium 속은 백합과에 속하는 식물로서 세계적으로 500여종이 분포되어 있다(1). *Allium* 속 식물의 주성분인 함황 화합물은 암 예방 작용을 하며 그 외에도 여러 가지 생리적 유용성을 나타내는 것으로 알려져 있다(2). *Allium* 속 식물은 독특한 향미를 부여할 뿐 아니라 다양한 생리적 기능을 함유하기 때문에 식품산업에서의 활용가치가 높다. *Allium* 속에 속하는 참산부추(*Allium sacculiferum* Max.)는 백합과의 다년생 식물로 일반부추에 비하여 잎이 두껍고 긴 특성을 지니고 있다(3). *Allium* 속 식물의 부추류는 비늘줄기와 잎의 진통, 이뇨, 구충, 해독, 소화 등의 효능으로 한방이나 민간요법에 사용되어 왔다(4). 국내에서는 *Allium* 속 추출물의 향미생물(5), 항산화 효과(6), 항혈전 활성(7) 및 항염증 효과(8) 등이 연구되어 왔지만 비만 및 당뇨병을 비롯한 만성질환 예방과 관련된 연구가 미흡한 실정이다.

오늘날 한국은 식습관 및 생활습관의 서구화로 인한 에너지 과잉 공급으로 비만 인구가 현저히 증가하고 있는 추세이다(9). 비만은 신체 에너지 섭취와 소비의 불균형으로 인해 체내 지방이 과잉 축적되어 생기는 질환으로 지방세포의 비대(hypertrophy)와 과형성(hyperplasia)으로 초래되며, 심혈관계 질환, 고혈압, 당뇨병, 고지혈증 및 암과 같은 다양한 성인병의 원인으로 밝혀지면서 전 세계적으로 심각한 질환으로 대두되고 있다(10,11). 지방세포는 에너지 항상성 유지 및 지질대사에 중요한 역할을 하며, 3T3-L1 지방전구세포는 다양한 호르몬 및 전사인자인 sterol regulatory element binding proteins 1c(SREBP1c), peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR) γ , CCAAT/enhancer-binding proteins(C/EBP) α 에 의해 성숙한 지방세포로 분화되어 세포 내 중성지질을 축적한다. 따라서 지방세포 형성(adipogenesis) 과정에서 세포 내 중성지질 축적에 관여하는 다양한 adipogenic gene과 효소 활성이 증가된다(12,13). 최근 여러 연구를 통해 지방세포 형성에 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)이 밀접한 연관을 갖는다는 연구가 보고되었다(14,15). 지방세포는 분화 과정에서

Received 14 February 2014; Accepted 7 April 2014

[†]Corresponding author.

E-mail: ghkim@duksung.ac.kr, Phone: +82-2-901-8496

세포 내로 유입되는 포도당을 저장하기 위하여 지방합성과 연관된 에너지 대사 경로를 거치게 된다. 이들 대사 경로 중 hexose monophosphate(HMP) shunt는 G6PDH에 의하여 지방합성에 반드시 필요로 하는 NADPH(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)를 생성하게 된다. 이렇게 생성된 NADPH는 NADPH oxidase(NOX)에 의하여 NADP^+ 로 전환되며, 이때 세포 내 superoxide와 같은 ROS가 발생한다(16). 체내 각종 세포에서 생성되는 ROS는 여러 대사과정에서 끊임없이 생성되고, ROS와 항산화 효소와의 항상성이 깨지면 산화적 스트레스로 인한 노화, 당뇨, 비만과 같은 각종 질병들을 야기하게 된다(17). 지방세포에서 과도하게 생성된 ROS는 3T3-L1 지방전구세포의 분화를 촉진시키거나 지방세포 주변에 위치한 macrophage를 자극하여 또 다른 ROS를 생성하기 때문에 비만의 주요 원인 중 하나라고 보고된 바 있다(18). 따라서 본 연구에서는 *Allium* 속에 속하는 참산부추 메탄올 추출물의 3T3-L1 지방세포 내 ROS 생성 저해 및 중성지질 축적 억제 효능을 연구하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에서 사용된 3T3-L1 preadipocyte는 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 분양받았다. 한국식물추출물은행에서 참산부추 전초 메탄올 추출물을 분양받아서 사용하였고, 추출물은 DMSO에 녹여서 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), phosphate buffered saline(PBS), fetal bovine serum(FBS), 0.25% trypsin-EDTA 및 penicillin-streptomycin은 WellGENE(Daegu, Korea)에서 구입하였다. Insulin, 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMX), dexamethasone(DEX), Oil Red O, nitroblue tetrazolium (NBT), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), dimethyl sulfoxide(DMSO) 및 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. RNA 분리에 사용되는 RNeasy mini kit, Taq-man 중합효소는 Qiagen (Valencia, CA, USA)에서 구입하였으며, real-time PCR을 위해 사용한 SYBR green은 Biorline(London, UK)에서 구입하여 사용하였다.

항산화 활성 측정

시료의 항산화 활성은 DPPH radical 소거능을 이용하여 측정하였다. 농도별로 희석한 추출물에 에탄올로 녹인 0.1 mM DPPH 용액을 첨가하고 30분 동안 반응시킨 후 525 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 이때 전자공여능은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{전자공여능}(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료 흡광도}}{\text{대조구 흡광도}}\right) \times 100$$

3T3-L1 세포 배양 및 분화

3T3-L1 preadipocyte를 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM을 이용하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 3T3-L1 지방전구세포를 분화 유도하기 위해서 100% confluency 2일 후, DMEM에 분화 유도 호르몬(0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 0.5 μM dexamethasone, 10 μg/mL insulin, MDD)을 혼합한 mixture로 분화 유도를 시작하였다. 분화 유도 2일과 5일 후, insulin(10 μg/mL)이 포함된 DMEM 배지로 교환하였고, 분화 유도 8일까지 분화시켰다.

세포 독성 실험

세포 독성 실험에 사용한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) solution(5 mg/mL)은 PBS에 녹인 뒤 여과하여 사용하였다. 3T3-L1 preadipocyte를 1×10^4 cell/200 μL의 농도로 48 well plate에 분주하여 24시간 배양 후 배지를 제거하고 새로운 DMEM 200 μL에 추출물 농도별(10, 25, 50 및 100 μg/mL)로 처리하여 72시간 동안 배양하였다. MTT 용액을 각 well에 첨가하고 2시간 동안 배양한 후, 상등액을 제거하고 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Oil Red O 염색

3T3-L1의 세포분화 후 배지를 제거한 뒤 세포를 PBS로 2번 세척하고 10% formalin 용액으로 상온에서 10분간 고정된 다음 PBS로 세척하였다. 세척된 세포는 생성된 lipid droplet과 특이적으로 반응하는 Oil Red O 용액(0.2% Oil Red O-isopropanol solution : water=3:2)을 이용하여 1시간 동안 염색하고, PBS로 세척 후 지방세포의 염색 정도를 현미경을 통해 관찰한 다음 100% isopropanol을 이용하여 세포 내 염색된 Oil Red O를 모두 용해한 뒤 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

NBT assay

3T3-L1의 세포분화 후 각 well에 0.2% NBT를 첨가하여 90분간 반응시켜 생성된 dark blue formazan을 50% acetic acid를 이용하여 모두 용출시킨 다음 570 nm에서 흡광도를 측정한 후 대조구의 흡광도 값에 대한 백분율로 나타내었다.

RNA isolation 및 real-time polymerase chain reaction

세포 내 총 RNA는 RNeasy mini kit를 이용하여 분리한 후 1 μg의 총 RNA를 oligo(dT) primer와 superscript II 역전사효소와 함께 반응시켜 1차 cDNA를 합성하였다.

Table 1. Primer sequences used in real time PCR

Primers	Sequences	
	Forward	Reverse
PPAR γ	5'-CTCCTGTTGACCCAGAGCAT-3'	5'-AGCCTTGCATCCTTCACAAG-3'
C/EBP α	5'-GCACAAGAACAGCAACGAGTA-3'	5'-GGCGGTCATTGTCACCTGGTC-3'
SREBP1c	5'-CCAGCAGGTCCCAGTTGTAT-3'	5'-AGGTACTGTGGCCAAGATGG-3'
NOX4	5'-GAAGCCCATTGAGGAGTCA-3'	5'-GGGTCCACAGCAGAAAACTC-3'
G6PDH	5'-CGATGGCAGAGCAGGT-3'	5'-GATCTGGTCCTCACG-3'
β -Actin	5'-CCGTCTTCCCCTCCATCGT-3'	5'-ATCGTCCCAGTTGGTTACAATGC-3'

PCR 반응은 1 μ g의 cDNA를 SYBR Green과 Table 1에 나타낸 primer에 첨가하여 최종반응 용량을 20 μ L로 하여 95°C에서 10분간 denature 시킨 후, 95°C에서 15초간, 61°C에서 1분간, 72°C에서 30초간 40 cycle 실시하였고, 최종적으로 72°C에서 5분간 extension 반응하여 원하는 형광 값을 검출했다. PCR에 사용된 주요 유전자의 primer 및 sequence는 Table 1과 같다.

통계분석

본 실험결과는 SPSS(Statistical Package for Social Science, ver. 19, Chicago, IL, USA)를 이용하여 분석하였다. 모든 측정 항목의 결과는 평균 \pm 표준편차로 표시하였고, 실험군간 평균의 차이는 one-way ANOVA로 유의성을 확인한 후 $P < 0.05$ 수준에서 유의성의 여부를 검증하였다.

결과 및 고찰

참산부추 메탄올 추출물의 항산화 활성평가

체내에서 free radical은 지질, 단백질 등과 결합하여 생체의 노화를 일으키는 물질이며, 암을 비롯한 뇌 질환, 피부 및 소화기 질환, 염증, 류마티스, 면역 질환 등 각종 질병의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. DPPH radical 소거법은 항산화 물질의 전자공여능으로 인해 자색이 탈색되는 원리를 이용한 것으로 비교적 방법이 간단하여 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다(19). 참산부추(ASM) 메탄올 추출물의 DPPH radical 소거능은 100~2,000 μ g/mL에서 유의적으로 증가하였으며, 특히 ASM 메탄올 추출물 2,000 μ g/mL의 농도에서는 41.48%의 가장 높은 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다(Fig. 1). *Allium* 속 식물의 하나인 흑마늘 및 생양파의 메탄올 추출물 1,000 μ g/mL 농도에서 각각 30.84%, 26.56%의 DPPH radical 소거능을 나타낸 Yang과 Park(20)의 연구 결과와 비교해 볼 때, ASM 메탄올 추출물은 이와 비슷한 radical 소거 활성을 나타내었다.

지방전구세포 내 참산부추 메탄올 추출물의 세포독성 평가

3T3-L1 preadipocytes에 추출물을 10~100 μ g/mL로 72시간 동안 처리했을 때 세포 생존율을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. ASM 메탄올 추출물을 처리한 모든 농도에서 대조

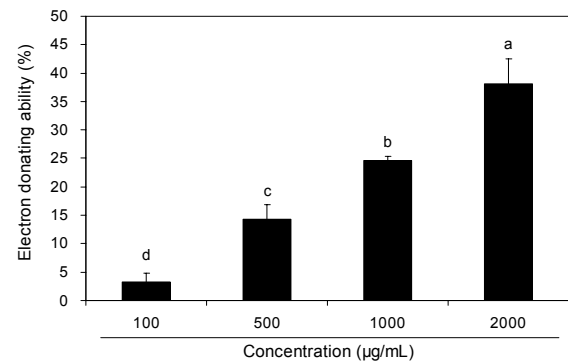


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of *Allium sacculiferum* Max. (ASM). The activity was evaluated by measuring DPPH radical scavenging detected at 525 nm. Data are expressed as mean \pm SD of triplicate experiments. Bars with different letters indicate statistically significant differences by Turkey-HSD multiple comparison test at $P < 0.05$.

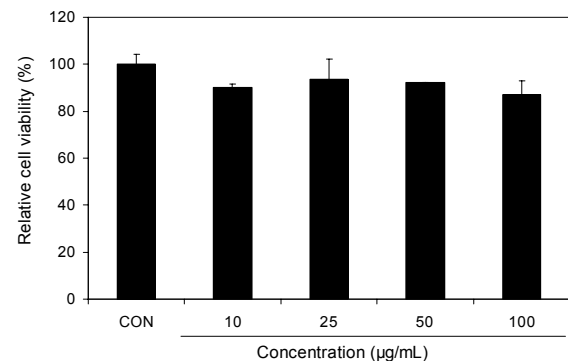


Fig. 2. Effect of *Allium sacculiferum* Max. (ASM) on the cell viability of 3T3-L1 preadipocytes. 3T3-L1 cells were treated with ASM methanol extracts (10, 25, 50, and 100 μ g/mL) for 72 hr. Cell viability was determined by the MTT assay. Data are expressed as mean \pm SD of triplicate experiments.

군과 유의적인 차이를 나타내지 않았으므로 본 연구에서는 유의적으로 세포독성을 나타내지 않는 10, 50 및 100 μ g/mL 농도에서 실험을 진행하였다.

지방세포 내 ROS 생성에 대한 참산부추 메탄올 추출물의 효과

최근 연구를 통해 지방전구세포에서 지방세포로 분화하는 과정에서 과량으로 생성되는 활성산소들은 지방세포의

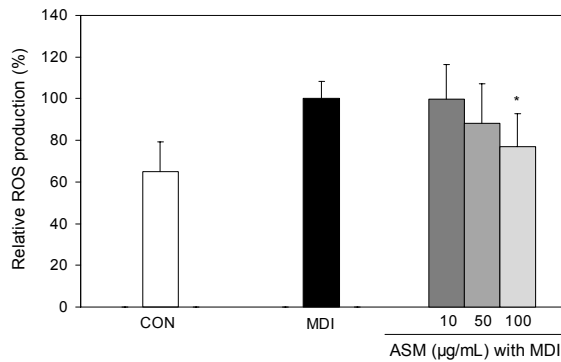


Fig. 3. Effect of *Allium sacculiferum* Max. (ASM) on ROS production during adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes. 3T3-L1 adipocytes were treated with ASM methanol extracts (10, 50, and 100 µg/mL) during adipogenesis. ROS production was assessed by the formation of dark-blue formazan and determined by the NBT assay at 570 nm. Data are expressed as mean±SD of triplicate experiments. **P*<0.05 indicates statistically significant difference.

인슐린 기능을 저하시켜 지방축적을 촉진하기 때문에 비만을 야기하는 원인으로 보고되었다(8). 따라서 3T3-L1 지방세포 형성(adipogenesis) 과정 중에 생성되는 ROS의 양을 확인하기 위해 ASM 메탄올 추출물에 의한 ROS 생성 변화를 NBT assay를 이용하여 측정하였고 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 3T3-L1 지방전구세포의 분화 유도과 함께 추출물을 농도별(10, 50 및 100 µg/mL)로 처리하였고 지방세포 내 생성되는 ROS를 NBT로 염색한 뒤 흡광도를 측정하여 ASM 메탄올 추출물의 효과를 확인하였다. 지방세포 내 ROS 생성은 ASM 메탄올 추출물을 처리했을 때 모두 농도의존적으로 감소하였으며, 특히 100 µg/mL 처리하였을 때 분화된 대조군(MDI) 그룹에 비해 23.06%까지 유의적으로 ROS 생성이 감소하였다. 최근 연구에 따르면 지방세포 내 ROS 생성 저해는 ROS 관련 효소의 발현 감소에 의한 것이라고 보고되었다(14,15). 따라서 ASM 메탄올 추출물에 의한 지방세포 내 ROS 생성 기전을 연구하기 위하여 ROS 생성과 연관된 주요 효소들의 유전자 발현 양상을 비교하였다.

지방세포 내 ROS 생성 유전자 발현에 대한 참산부추 메탄올 추출물의 효과

Glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PDH) 효소는 모든 세포 내에서 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH)의 생산에 반드시 필요한 효소로서 HMP shunt의 첫 번째 반응에서 glucose-6-phosphate가 6-phosphogluconolactone으로 분해될 때 NADP⁺를 NADPH로 전환시켜 주는 역할을 한다. NADPH는 HMP shunt를 통한 포도당 대사는 물론 지방산 합성 및 glutathione 반응을 조절할 뿐만 아니라 NOX4의 반응에도 관여하여 ROS 생성을 유도한다. 이때 생성되는 ROS는 세포 생존과 사멸, redox 시스템 유지에 중요한 역할을 하고 있다(21,22). 따라서 지방세포 내에서 G6PDH, NOX4의 mRNA 발현을 통

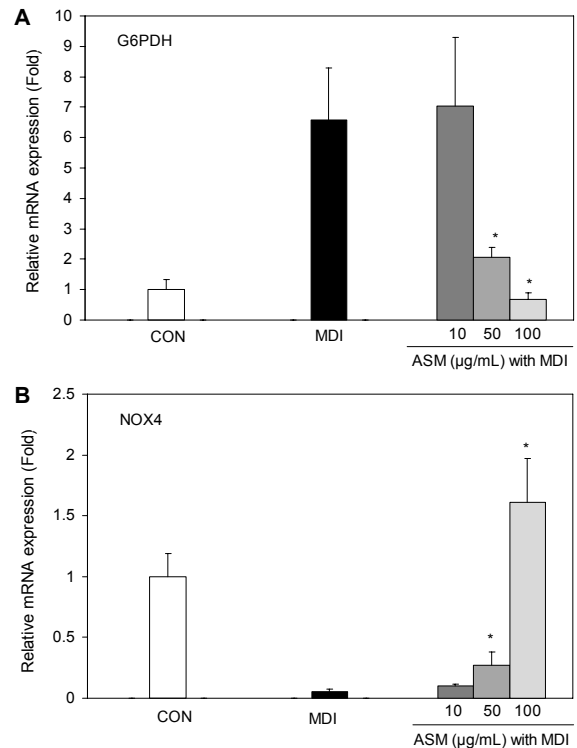


Fig. 4. Effect of *Allium sacculiferum* Max. (ASM) on G6PDH and NOX4 mRNA expression during adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes. 3T3-L1 adipocytes were treated with ASM methanol extracts (10, 50, and 100 µg/mL) during adipogenesis. Total RNA was extracted on day 8 and G6PDH and NOX4 mRNA was measured by quantitative real time PCR. Each mRNA was quantified and normalized to β-actin. Data are expressed as mean±SD of triplicate experiments. **P*<0.05 indicates statistically significant difference.

해 ROS 생성을 조절할 수 있다. Fig. 4에서 나타난 것과 같이 ROS 생성과 관련된 G6PDH의 유전자 발현 양상은 ASM 메탄올 추출물 처리 시 감소하는 경향을 보였으며 특히 추출물 농도 50, 100 µg/mL에서 대조군인 MDI 그룹에 비해 유의적으로 발현을 억제하였다. G6PDH mRNA의 발현 양상은 NBT assay를 통한 ROS의 생성량 감소 효과와 유사한 경향으로, ROS 생성 유전자의 발현 억제가 지방세포 내 ROS 생성을 감소시킨 것으로 사료된다. 그러나 ROS 생성을 유도하는 주요 효소인 NOX4는 분화를 유도하지 않은 CON 그룹에 비해 분화가 유도된 MDI 그룹에서 발현이 현저하게 감소했고, ASM 메탄올 추출물 농도 50, 100 µg/mL에서 대조군인 MDI 그룹에 비해 유의적으로 발현이 증가하였다. 많은 연구에서 NOX4는 분화 유도와 함께 발현이 증가하였으며 추출물을 처리한 그룹은 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였다(14,15). 그러나 ASM 메탄올 추출물을 처리했을 때 지방세포 내 NOX4의 mRNA 발현은 여러 연구와 반대의 경향을 나타내었다. Mouche 등(23)의 연구를 보면 NOX4 mRNA는 지방전구세포에서 높은 수준으로 발현되었으나 지방세포 분화가 이루어지면서 발현이 현저한 감소를 하였고, NOX4의 mRNA와 단백질 발현은 지방세포 형성 동안 여

러 경로의 조절을 통하여 이루어진다고 보고되었다. 또한 NOX의 발현은 지방세포에서 insulin receptor signaling을 조절하며, insulin receptor의 발현 수준이 낮을 때 지방세포 분화 동안에 인슐린의 효과를 매개하는 중요한 조절 구성 요소가 될 수 있다. Hwang 등(24)의 연구에서는 지방세포 분화과정에서 중요한 역할을 하는 PPAR γ ligands에 대한 반응으로 NOX4 mRNA의 발현이 감소하였다. 따라서 본 연구의 NOX mRNA 발현은 지방세포 분화 과정 중의 ASM 메탄올 추출물 처리가 insulin receptor signaling 경로에 영향을 주었을 것이라 사료되며 insulin으로 유도된 ROS와 NOX4의 신호 전달 경로에 대한 구체적인 기전연구가 필요하다고 생각된다. 또한 향후 연구에서는 보다 명확한 지방세포 내 ROS 저감 효과를 확인하기 위해 ROS 소거에 관여하는 Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, catalase 등과 같은 항산화 효소의 발현 양상을 비교하는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

지방세포 내 중성지방 생성에 대한 참산부추 메탄올 추출물의 효과

일반적으로 체내에서 중성지방은 포도당과 함께 세포의 중요한 에너지원으로 사용되고 여분의 중성지방은 지방세포에 흡수되고 저장되어 비만의 원인으로 작용하여 다양한 만성질환의 원인이 된다(25,26). 따라서 ASM 메탄올 추출물에 의한 3T3-L1 지방세포의 분화 억제 효능을 확인하기 위해 지방전구세포 분화 유도과 함께 추출물을 농도별(10, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리하였다. ASM 메탄올 추출물을 처리했을 때 지방세포 내의 중성지방 생성은 대조군인 MDI 그룹에 비해 농도 의존적인 감소를 보였다(Fig. 5). 특히 ASM 메탄올 추출물 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 각각 37.0, 61.5%까지 유의적으로 세포 내 중성지방이 감소하였다. 이는 3T3-L1 지방전구세포의 분화 유도과정에서 생성된 ROS의 양과 지방세포 내 중성지방 축적 감소가 유사한 경향을 보였다. 이 결과는 지방세포에서 축적된 중성지방이 산화적 스트레스의 증가와 연관이 있음을 나타낸다.

지방세포 분화 조절인자들의 발현에 대한 참산부추 메탄올 추출물의 효과

3T3-L1 지방전구세포는 지방세포로 분화되는 과정에서 지질 축적에 의해 지방구가 생성되는 형태학적인 변화뿐만 아니라 지방세포에 나타나는 특이적인 단백질 marker의 발현 증가와 같은 생화학적인 변화도 나타난다. 이 과정에서 transcription factor인 SREBP1c, PPAR γ 및 C/EBP α 의 유전자 발현이 증가하고 전사인자들은 상호 전사를 유도하여 지방세포를 분화시킨다(3,27). SREBP1c는 지방산이나 콜레스테롤 합성에 필수 전사인자인 SREBP의 하나이며 지방세포 분화과정 초기에 발현이 유도되며 PPAR γ 의 전사활성을 증가시킨다(28). PPAR γ 는 호르몬에 의해 adipogenesis와 lipogenesis를 조절하는 역할을 하며, 지방세포 분화에 필수적인 전사인자이다. 또한 C/EBP β 는 PPAR γ 의 발현을

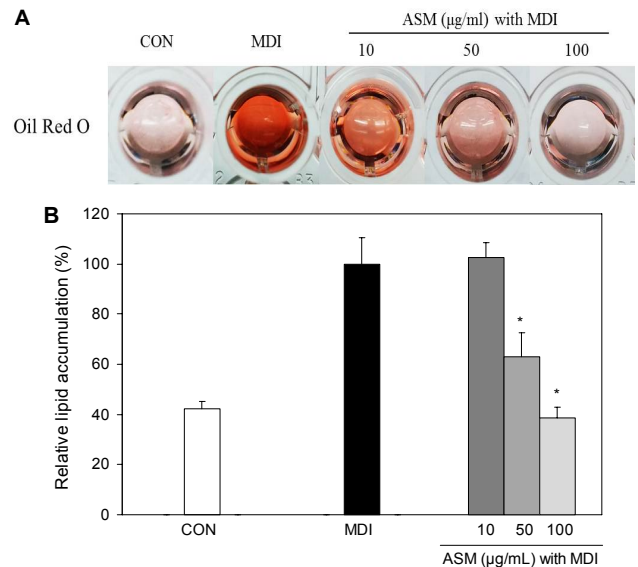


Fig. 5. Effect of *Allium sacculiferum* Max. (ASM) on lipid accumulation during adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes. 3T3-L1 adipocytes were treated with ASM methanol extracts (10, 50, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) during adipogenesis. Lipid accumulation was evaluated by Oil Red O staining. Data are expressed as mean \pm SD of triplicate experiments. * P <0.05 indicates statistically significant difference.

유도하여 지방전구세포의 초기 분화과정에서 중요한 역할을 하며 C/EBP α 는 PPAR γ 와의 강한 상승 작용을 통해 지방전구세포의 분화 후기 과정을 촉진한다(29-31). 따라서 본 연구에서는 ASM 메탄올 추출물 처리에 따른 세포 내 중성지방합성 저해 활성을 확인하기 위해 SREBP1c, PPAR γ 및 C/EBP α 의 유전자 발현을 측정하였다. ASM 메탄올 추출물을 3T3-L1 preadipocyte에 농도별(10, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리하면서 분화를 유도하였고 분화된 대조군(MDI)과 비교하였다. 그 결과 분화를 유도한 대조군인 MDI 그룹에서는 SREBP1c, PPAR γ 및 C/EBP α 의 mRNA 발현이 증가하였으나, 분화과정에서 ASM 메탄올 추출물을 처리하여 분화를 유도한 경우 SREBP1c, PPAR γ 및 C/EBP α 의 mRNA 발현이 농도 의존적으로 감소하였음을 확인하였다(Fig. 6). ASM 메탄올 추출물 처리 농도의 증가에 따른 SREBP1c, PPAR γ 및 C/EBP α 의 농도 의존적인 발현 감소는 Oil Red O 염색을 통한 중성지방 생성 감소 결과와 일치하는 경향을 보였다. 따라서 ASM 메탄올 추출물은 3T3-L1 지방전구세포에서 SREBP1c, PPAR γ 및 C/EBP α 의 유전자 발현을 억제함으로써 중성지방 생성을 감소시켜 지방세포로의 분화를 억제시킬 수 있는 것으로 생각된다. 최근 연구에 의하면 ROS는 PPAR γ 의 발현을 증가시킴으로써 지질 생성의 중요 단계인 mitotic clonal expansion phase를 촉진시키지만 항산화제는 mitotic clonal expansion phase를 정지시켜 PPAR γ 의 발현을 억제하는 것으로 보고되었다(32). 따라서 ASM 메탄올 추출물의 처리는 지방세포 내의 ROS 생성을 감소시켜 PPAR γ 발현을 억제시킴으로써, 이로 인하여 중성

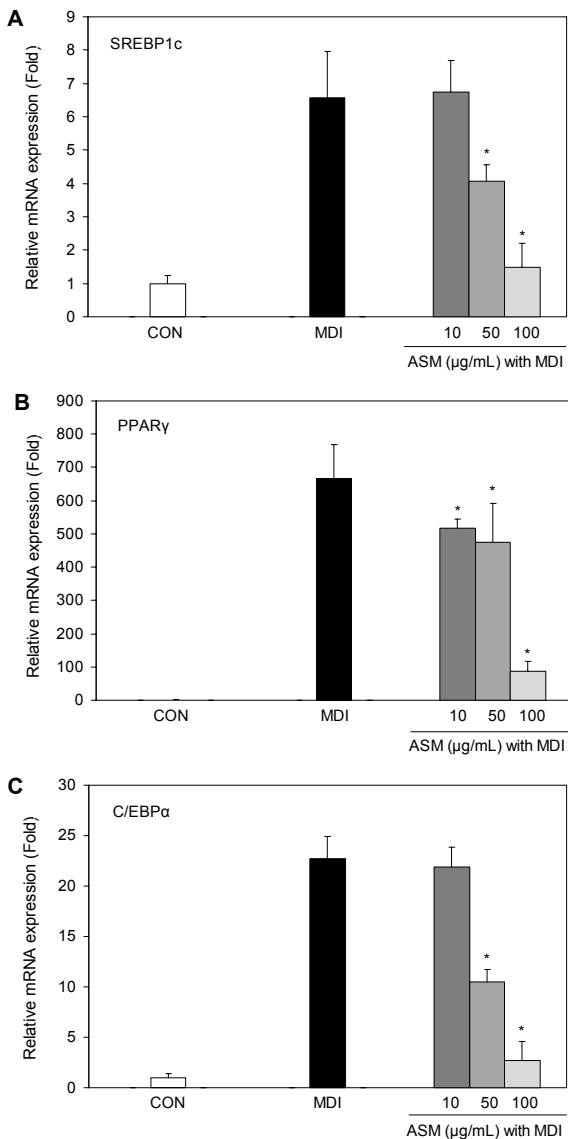


Fig. 6. Effect of *Allium sacculiferum* Max. (ASM) on SREBP1c, PPAR γ and C/EBP α mRNA expression during adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes. 3T3-L1 adipocytes were treated with ASM methanol extracts (10, 50, and 100 $\mu\text{g/mL}$) during adipogenesis. Total RNA was extracted on day 8 and SREBP1c, PPAR γ and C/EBP α mRNA was measured by quantitative real time PCR. Each mRNA was quantified and normalized to β -actin. Data are expressed as mean \pm SD of triplicate experiments. * P <0.05 indicates statistically significant difference.

지방 생성이 저해되었을 것이라 사료된다.

본 연구에서는 3T3-L1 지방세포 내 ROS 생성과 지질 축적에 대한 ASM 메탄올 추출물의 효과를 확인하고자 하였다. 그 결과 지방전구세포에 ASM 메탄올 추출물을 처리하였을 때 지방세포 내 ROS 관련 유전자의 감소는 ROS 생성을 저해시켰다. 생성이 저해된 ROS는 adipogenic 유전자 발현을 감소시켰으므로써 결과적으로 중성지질 축적을 억제하여 ASM이 비만과 관련된 만성질환 개선을 위한 기능성 소재로서 가능성이 있음을 보여주었다.

요 약

본 연구에서는 3T3-L1 지방전구세포를 이용하여 *Allium* 속 식물의 하나인 참산부추(ASM) 메탄올 추출물의 ROS 생성 저해 및 지질 축적 억제 효과를 확인하고자 하였다. 먼저 ASM 메탄올 추출물 100~2,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 모든 농도에서 유의적인 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었으며, 지방전구세포에 ASM 메탄올 추출물 10~100 $\mu\text{g/mL}$ 를 처리하였을 때 세포 독성을 나타내지 않았다. 지방세포 내 ROS 관련 효소와 분화 관련 전사인자의 조절로 인한 중성지방 축적 저해 활성을 확인하기 위하여 지방전구세포를 분화 유도하면서 추출물을 농도별(10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하였다. 그 결과 ASM 메탄올 추출물은 대조군에 비해 ROS 생성량과 ROS 관련 효소인 G6PDH mRNA 발현을 농도 의존적으로 감소시켰다. 또한 ASM 메탄올 추출물에 의하여 지방세포 내 중성지방 축적량이 유의적으로 감소하였으며, 지방세포 분화에 관련된 전사인자인 SREBP1c, PPAR γ 및 C/EBP α mRNA 발현도 유의적으로 감소하였다. 이상의 결과들로 볼 때 ASM 메탄올 추출물로 인한 ROS 생성 저해와 지질 축적 억제는 ROS 생성 및 ROS 관련 유전자의 발현 감소로 인한 지방 생성 주요 전사인자의 유전자 발현 억제로 인한 것으로 보이며, ASM이 항비만 효과가 있는 천연물 소재로 개발 가능성이 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 덕성여자대학교 2013년도 교내 연구비(3000 001949)의 지원에 의해 연구되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Steiner RP. 1986. *Folk medicine: the art and the science*. American Chemical Society, Washington, DC, USA. p 125-137.
- Scharfenberg K, Wagner R, Wagner KG. 1990. The cytotoxic effect of ajoene, a natural product from garlic, investigated with different cell lines. *Cancer Lett* 53: 103-108.
- Korea National Arboretum. 1997. *Illustrated rare and endangered species in Korea*. Korea National Arboretum, Seoul, Korea. p 37.
- Kim TJ. 1998. *Korea plants V*. Seoul University Press, Seoul, Korea. p 150.
- Kim OM, Kim MK, Lee SO, Kee KR, Kim SD. 1998. Antimicrobial effect of ethanol extracts from spices against *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* isolated from kimchi. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 455-460.
- Hopia A, Heinonen M. 1999. Antioxidant activity of flavonol aglycones and their glycosides in methyl linoleate. *J Am Oil Chem Soc* 76: 139-144.
- Kim MJ, Song YS, Song YO. 1998. The fibrinolytic activity of kimchi and its ingredients *in vivo* and *in vitro*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 169-182.
- Kim HP, Mani I, Iversen L, Ziboh VA. 1998. Effects of

- naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 58: 17-24.
9. Visscher TL, Seidell JC. 2001. The public health impact of obesity. *Annu Rev Public Health* 22: 355-375.
 10. Spiegelman BM, Flier JS. 2001. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104: 531-453.
 11. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. 2000. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 14: 1293-1307.
 12. Morrison RF, Farmer SR. 2000. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr* 130: 3116S-3121S.
 13. Ntambi JM, Kim YC. 2000. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 130: 3122S-3126S.
 14. Lee OH, Seo MJ, Choi HS, Lee BY. 2012. Pycnogenol® inhibits lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes with the modulation of reactive oxygen species (ROS) production associated with antioxidant enzyme responses. *Phytother Res* 26: 403-411.
 15. Seo MJ, Choi HS, Lee OH, Lee BY. 2013. *Grateloupia lanceolata* (Okamura) Kawaguchi, the edible red seaweed, inhibits lipid accumulation and reactive oxygen species production during differentiation in 3T3-L1 cells. *Phytother Res* 27: 655-663.
 16. Lee OH, Kwon YI, Hong HD, Park CS, Lee BY, Kim YC. 2009. Production of reactive oxygen species and changes in antioxidant enzyme activities during differentiation of 3T3-L1 adipocyte. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 52: 70-75.
 17. Halliwell B. 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 16: 33-50.
 18. Yamashita A, Soga Y, Iwamoto Y, Asano T, Li Y, Abiko Y, Nishimura F. 2008. DNA microarray analyses of genes expressed differentially in 3T3-L1 adipocytes co-cultured with murine macrophage cell line RAW264.7 in the presence of the toll-like receptor 4 ligand bacterial endotoxin. *Int J Obes (Lond)* 32: 1725-1729.
 19. Kwon GH, Choi DS, Wang MH. 2007. Biological activities of hot water extracts from *Enoymus alatus* leaf. *Korean J Food Sci Technol* 39: 569-574.
 20. Yang YR, Park YK. 2011. Comparison of antioxidant activities of black onion extracts. *Korean J Food Preserv* 18: 954-960.
 21. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114: 1752-1761.
 22. Park J, Rho HK, Kim KH, Choe SS, Lee YS, Kim JB. 2005. Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase is associated with lipid dysregulation and insulin resistance in obesity. *Mol Cell Biol* 25: 5146-5157.
 23. Mouche S, Mkaddem SB, Wang W, Katic M, Tseng YH, Carnesecchi S, Steger K, Foti M, Meier CA, Muzzin P, Kahn CR, Ogier-Denis E, Szanto I. 2007. Reduced expression of the NADPH oxidase NOX4 is a hallmark of adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1015-1027.
 24. Hwang J, Kleinhenz DJ, Lassègue B, Griendling KK, Dikalov S, Hart CM. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands regulate endothelial membrane superoxide production. *Am J Physiol Cell Physiol* 288: C899-905.
 25. Hafiz MS, Arslan MI, Banarjee S, Obaidullah M. 2004. Studies on serum triglyceride level in patients with myocardial infarction. *Mymensingh Med J* 13: 185-187.
 26. Labreuche J, Touboul PJ, Amarengo P. 2009. Plasma triglyceride levels and risk of stroke and carotid atherosclerosis: a systematic review of the epidemiological studies. *Atherosclerosis* 203: 331-345.
 27. Cowherd RM, Lyle RE, McGehee RE Jr. 1999. Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 10: 3-10.
 28. Park MJ. 2005. Recent advances in regulating energy homeostasis and obesity. *Korean J Pediatr* 48: 126-137.
 29. Hauser S, Adelmant G, Sarraf P, Wright HM, Mueller E, Spiegelman BM. 2000. Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation. *J Biol Chem* 275: 18527-18533.
 30. Ohshima T, Koga H, Shimotohno K. 2004. Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 279: 29551-29557.
 31. Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA. 1998. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 273: 30057-30060.
 32. Lee H, Lee YJ, Choi H, Ko EH, Kim JW. 2009. Reactive oxygen species facilitate adipocyte differentiation by accelerating mitotic clonal expansion. *J Biol Chem* 284: 10601-10609.