

단삼 유래 Tanshinone IIA가 3T3-L1 세포의 아포토시스 유도과 지방형성 억제에 미치는 영향

정승일 · 이종우¹ · 장선일^{1,2,*}

전주생물소재연구소, 1: 전주대학교 대체의학대학 대체건강관리학부 건강관리전공, 2: 전주대학교 아토피 · 건강전문연구소

Effects of Tanshinone IIA from *Salvia Miltiorrhiza* Bunge on Induction of Apoptosis and Inhibition of Adipogenesis in 3T3-L1 Cells

Seung Il Jeong, Jong Woo Lee¹, Seon Il Jang^{1,2,*}

Jeonju Biomaterials Institute, 1: School of Alternative Medicine & Health Science, College of Alternative Medicine, Jeonju University, 2: Jeonju University Atopy & Health Research Institute

Obesity is especially a serious health problem in industrialized countries, because it is considered to be a risk factor associated with the genesis or development of various metabolic diseases, including cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. The purpose of this study was to investigate the effects of tanshinone IIA from *Salvia miltiorrhiza* Bunge on induction of apoptosis and inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes. The results demonstrated that tanshinone IIA decreased cell population growth of 3T3-L1 preadipocytes, assessed with the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] and LDH (lactate dehydrogenase) assay. Flow cytometric analysis of 3T3-L1 preadipocytes exposed to tanshinone IIA showed that apoptotic cells increased in a time- and dose-dependent manner. Treatment with tanshinone IIA decreased the number of normal cells and increased the number of apoptotic cells in a dose-dependent manner. The induction of apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes by tanshinone IIA was mediated through the activation of caspase-3 and Bax, and then through the cleavage of PARP and the down-regulation of Bcl-2. Moreover, tanshinone IIA significantly decreased the amount of intracellular triglycerides and GPDH (glycerol-3-phosphate dehydrogenase) activity in 3T3-L1 adipocytes. Our results suggest that tanshinone IIA efficiently induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes.

Key words : tanshinone IIA, *salvia miltiorrhiza*, apoptosis, adipogenesis, 3T3 L1 cells

서 론

21세기 현대 산업사회에서 비만(obesity)은 관상동맥심질환 (coronary heart disease), 고혈압 및 제2형 당뇨병(type 2 diabetes mellitus) 등 심각한 대사성 질환을 (metabolic diseases) 야기하는 주요 요인으로 지목 받고 있다¹⁾. 최근 연구보고에 의하면, 대사성 질환을 야기하는 주요 요인인 비만을 줄이기 위한 전략으로 음식물의 섭취 감소, 에너지소비 증가, 전지방세포 (preadipocytes)의 분화와 증식억제, 지방형성 과정 (adipogenesis)의 억제 및 지방분해의 증가 등에 대한 기전

(mechanism)을 제안하고 있다²⁾. 전지방세포는 지방세포 (adipocytes)를 성숙하게하고 지방을 체내에 축적시키는데 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려졌다³⁾. 이런 관점에서, 마우스 유래 전지방세포로 알려진 3T3-L1 세포는 적절한 조건하에서 배양하면 비만세포로 분화하는 특성을 가지고 있으며, 분화 시 비만에 관련된 단백질 분비가 촉진되는 등 세포학적인 특징이 잘 알려져 있기 때문에 비만의 원인인 지방세포의 분화과정을 연구하는 모델로 널리 이용되고 있다⁴⁾.

단삼(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)은 전통적으로 부종(edema), 관절염(arthritis) 및 간염(hepatitis) 등 인체질환에 사용된 약용식물이다⁵⁾. Tanshinone IIA는 단삼의 뿌리에서 추출된 주요 diterpene계 화합물이다⁶⁾. 전 연구에서 우리는 tanshinone IIA가 전염증성 매개물(pro-inflammatory mediators) 억제와 IκB 해리

* 교신저자 : 장선일, 전주시 완산구 효자동 3가 전주대학교 대체의학대학

· E-mail : sonjjang@jj.ac.kr, · Tel : 063-220-3124

· 접수 : 2009/11/21 · 수정 : 2009/12/01 · 채택 : 2009/12/11

에 의한 NF- κ B 활성화 및 이에 대한 세포기전을 lipopolysaccharide (LPS)로 자극된 마우스 유래 대식세포주인 RAW264.7 세포에서 확인한바 있다^{7,8)}. 최근에 Huang 등⁹⁾은 3T3-L1 세포를 대상으로 tanshinone IIA을 처리하여 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ 의 활성을 경유하는 결과를 얻어 지방형성 억제에 대한 신호전달 기전을 밝힌바 있다. 그러나 tanshinone IIA가 지방세포의 아포토시스(apoptosis)와 지방형성 억제에 대한 상세한 기전에 대해서는 아직까지 명확히 알려진 바 없다.

따라서 이 연구는 3T3-L1을 대상으로 tanshinone IIA을 처리하여 전지방세포에서 아포토시스 유도에 대한 기전과 지방세포에서 지방형성 억제를 조사하여 매우 흥미로운 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

MTT dye [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide], propidium iodide, ribonuclease, Oil Red O, 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx), dexamethasone(DEX), insulin(INS) 등은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Annexin V-FITC, anti-caspase-3, anti-PARP, anti-Bax, anti-Bcl, anti- α -actin antibodies 및 anti-rabbit secondary horseradish peroxidase antibodies 등은 Santa Cruz Biotechnology사(USA)로부터 구입하여 사용하였다. Caspase-3 activity assay kit는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)로부터 구입하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), bovine calf serum, and antibiotic mixture (penicillin-streptomycin) 등은 Gibco BRL사(Grand Island, NY)에서 구입하였으며, 기타 시약은 reagent grade급 이상을 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다.

2. Tanshinone IIA의 분리

Tanshinone IIA는 건조된 단삼(*S. miltiorrhiza*) 뿌리로부터 Jang 등⁷⁾의 방법에 따라 분리하였다. Tanshinone IIA의 구조는 ¹H-NMR, ¹³C-NMR와 MS spectra 자료를 얻고 Park 등¹⁰⁾의 결과와 비교하여 동정하였으며, 순도는 95% 이상이었다(Fig. 1).

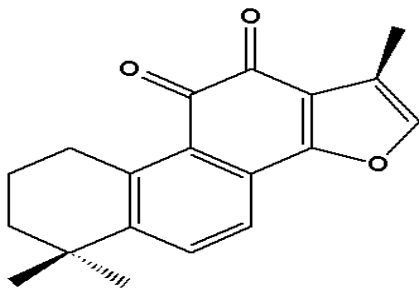


Fig. 1. Chemical structure of Tanshinone IIA isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bunge.

3. 세포배양

마우스 배아에서 유래한 3T3-L1 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)사로부터 구입하여 사용하였다. 전지방세포시기의 3T3-L1의 배양은 10% FBS, 0.15% sodium bicarbonate와 1% penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C에서 5% CO₂ 유지되는 배양기에서 배양하였으며, 지방세포분화를 유도하기 위해서 전지방세포시기의 배양액에 0.5 mM IBMx, 1 μ M DEX 및 1 μ M INS를 첨가하여 배양하였다. 그 후 세포배양은 정상배지로 교환하였으며, 48시간 마다 새로운 배지를 교환하면서 세포의 분화를 현미경하에서 관찰하고 수확하여 실험에 사용하였다.

4. MTT 분석

MTT 분석은 Mosmann¹¹⁾의 방법에 준하여 수행하였다. 간단히 설명하면, 3T3-L1 전지방세포는 well 당 1×10^4 개를 96 well plate에 접종하고 24시간 후에 0-10 μ M tanshinone IIA가 함유된 배지를 100 μ l씩 넣고 24, 48 및 72시간 동안 배양하였다. 이때 tanshinone IIA의 용매인 dimethyl sulfoxide (DMSO)의 농도는 최종적으로 0.01%이하로 적정하였다. 각 시간에 적합하게 배양된 세포를 MTT 분석에 사용하였다. MTT 용액은 5 mg/ml의 농도로 인산완충용액(phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.4)에 녹여 0.45 μ m 필터를 이용하여 통과시켜 무균화 하였으며, 각 well에 배양액을 제거하고 새로운 배양액을 90 μ l를 넣고 10 μ l의 MTT 용액(0.5 mg/ml 최종농도)을 주입하여 5시간 동안 배양 후 잔여 MTT 용액을 제거하였다. Crystal formazan은 DMSO로 용해하여 microplate readers (Molecular devices, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. LDH 유리능 측정

Lactate dehydrogenase (LDH) 유리능은 통상적으로 이용되는 kit(BioVision, CA, USA)을 활용하여 측정하였다. 3T3-L1 전지방세포는 MTT 분석에서와 같은 조건으로 tanshinone IIA을 처리하여 배양하였다. 배양이 종료된 well에서 상층액을 얻어 LDH 유리능을 측정하였다. 측정 방법은 Sigma사가 제시한 방법에 준하여 수행하였다.

6. PI 염색에 의한 flow cytometry

세포의 아포토시스는 Takada¹²⁾의 propidium iodide (PI) 염색방법에 따라 측정하였다. 간단히 설명하면, 3T3-L1 전지방세포는 24, 48, 및 72시간 동안 각각 0-10 μ M tanshinone IIA로 자극하였다. 그 후 세포를 trypsin-EDTA 용액(0.05% trypsin과 0.02% EDTA/PBS)을 주입하여 수확한 다음 PBS로 2번 세척하고 4°C에서 30분간 80% 에탄올로 고정하였다. 고정된 세포는 실온에서 15분동안 40 mg/ml PI 용액으로 염색한 후 FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems USA, San Jose, CA)을 이용하여 DNA량을 분석하였다. 약 10,000개의 세포의 정보를 얻어 세포 아포토시스 비율을 CELL Quest software로 분석하였다.

7. Annexin V-FITC/PI 염색에 의한 flow cytometry.

Annexin V-FITC/PI 염색은 Annexin V-FITC kit (Santa Cruz Biotechnology, USA)을 이용하였다. Tanshinone IIA에 의해 유도된 초기와 후기 아포토시스 및 괴사 비율을 측정하기 위해서 3T3-L1 전지방세포는 (1×10^5 cells/dish) 6 cm dish에 접종하고 tanshinone IIA의 최종농도를 0-10 μ M까지 다양하게 처리하여 72시간 배양 후 FITC-conjugated Annexin V-FITC/PI 염색을 하였다. FITC-conjugated Annexin V-FITC/PI 용액을 주입하여 실온에서 10분 동안 염색한 다음 FACScan flow cytometer를 이용하여 분석하였다. Annexin V-FITC and PI 여기파장은 525와 575 nm 여기필터를 활용하여 FACScan flow cytometer의 FL1과 FL2 channels에서 분석하였다. 각 실험군당 약 10,000개 세포를 대상으로 분석하였다.

8. Caspase-3 활성 측정

Caspase-3 활성의 측정은 R&D Systems사에서 제공하는 caspase-3 activity assay kit을 이용하여 측정하였다. 간단히 설명하면, tanshinone IIA 처리 후 3T3-L1 전지방세포는 PBS로 세척하여 lysis buffer (1% Triton X-100, 0.32 M sucrose, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8, 2 mM dithiothreitol, 10 μ g/mL pepstatin A, 2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, and 10 μ g/mL leupeptin)를 주입하고 4°C에서 20분간 방치한 다음 30분간 10,000 g로 원심하여 상층액의 세포 용해물을 얻었다. 얻어진 세포 용해물은 caspase-3 activity assay kit을 활용하여 R&D Systems사가 제공하는 방법에 준하여 수행하였으며, microplate readers (Molecular devices, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9. Triglyceride 함량 측정

3T3-L1 지방세포는 분화 이후 8일간 배양 후 수확하였다. 세포는 tanshinone IIA (0-10 μ M)을 처리하여 72시간 동안 배양한 후 PBS로 세척하고 lysis buffer (1% Triton X-100 /PBS)를 넣었다. 세포에서 총 triglyceride 함량은 통상적으로 이용되는 triglyceride assay kit (Sigma, (St. Louis, MO, USA). 단백질의 농도는 Bio-Rad DC protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 이용하여 측정하였다.

10. Oil Red O 염색

Oil Red O 염색은 Ramirez-Zacarias 등¹³⁾의 방법에 따라 만들었다. 3T3 지방세포는 분화 시점으로부터 8일간 배양 후 수확하였다. 세포는 tanshinone IIA (0-10 μ M)을 처리하여 72시간 동안 배양한 후 PBS로 세척하고 실온에서 20분간 10% 중성 포르말린용액(pH 7.2)을 주입하여 고정하였다. 그 후 포르말린용액을 제거하고 100% propylene glycol을 3분 동안 각 well에 넣고 다시 60% propylene glycol을 넣어 세포의 색소를 탈색한 다음 Oil Red O 용액을 주입하여 1시간동안 염색하였다. 그 후 세포의 잔여 Oil Red O를 제거하기 위해서 철저히 세척한 후 세포내 염색물을 well 당 1 ml의 isopropyl alcohol을 넣어 염색물을 용출시

켰다. 용출된 염색액은 microplate readers (Molecular devices, USA)를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

11. Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 활성 측정

3T3 지방세포는 분화 시점으로부터 8일간 배양 후 수확하였다. 세포는 tanshinone IIA (0-10 μ M)을 처리하여 72시간 동안 배양한 후 주의 깊게 냉각 PBS로 2번 세척하고 25 mM Tris/1 mM EDTA (pH 7.5)을 주입하여 세포를 용해하고 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH)의 활성을 측정하였다. GPDH의 활성은 Wise and Green¹⁴⁾의 방법에 따라 결정하였으며, 효소활성은 단백질 unit/mg로 표현하였다.

12. Western blot

3T3-L1 전지방세포는 tanshinone IIA (0-10 μ M)을 처리하고 12와 24시간동안 배양하였다. 약물처리가 종료된 세포는 냉각 lysis buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM EDTA, 500 μ M sodium orthovanadate, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 10 mM NaF, 10 μ g/mL leupeptin, and 1 mM PMSF]를 주입하여 용해하였다. 세포용해물의 단백질의 정량은 Bio-Rad DC protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 각 실험군의 단백질은 30 μ g으로 적정하고 12% polyacrylamide gel [sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)]의 각 well에 주입하여 분리하였다. 겔상에 전개된 단백질은 PVDF membrane에 옮긴 후 PBS에 5% skim milk (0.05% v/v Tween-20, pH 7.2)로 1시간 동안 blocking하였다. Membrane은 각 1차 항체(1:2000)를 주입하고 4°C에서 약 12시간 방치한 후 2차 항체(1:5000)를 주입하고 1시간 동안 방치하였다. 각 단계마다 PBST (PBS/Triton X-100)로 3번씩 세척하였다. 단백질 발현에 대한 신호는 Amersham ECL system (Amersham-Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL)으로 감광하여 측정하였다.

13. 통계처리

모든 실험 값은 평균±표준오차(mean±SD)로 표시했으며, 통계분석은 ANOVA와 Student's t-test로 처리했으며, 유의성 한계는 p<0.05로 정하였다.

결 과

1. 3T3-L1 전지방세포 성장 억제에 미치는 tanshinone IIA의 영향

Tanshinone IIA가 3T3-L1 전지방세포의 성장억제에 미치는 영향을 알아보기 위해서 여러 가지 농도의 tanshinone IIA (0-10 μ M)을 24-72 h까지 처리하고 MTT 분석과 LDH 유리능을 측정하였다. 그 결과 Fig. 2A와 같이 3T3-L1세포의 성장은 tanshinone IIA의 농도와 시간에 의존적으로 억제되었으며, 72시간 배양시 IC50은 2.5 μ M이었다. 또한 배지내로 유리되는 LDH의 활성을 조사한 결과 Fig. 2B와 같이 tanshinone IIA의 세포독

성은 시간과 농도에 의존적으로 증가되었다. 따라서 tanshinone IIA가 3T3-L1 전지방세포의 성장을 대조군에 비해 효과적으로 억제시킬 수 있다는 것을 제시해 주었다($p < 0.05$).

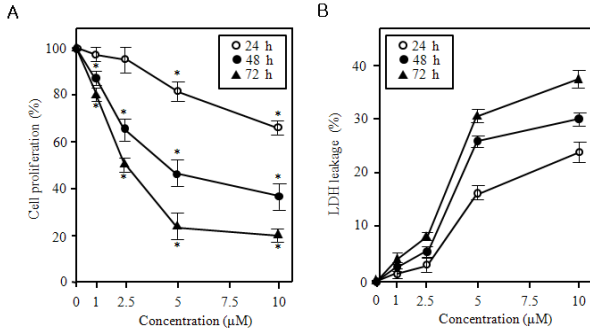


Fig. 2. Effect of tanshinone IIA on the inhibition of cell growth (A) and cytotoxicity (B) in 3T3-L1 preadipocytes. Cells were treated with 0–10 μM tanshinone IIA for 24, 48, and 72 h. The data are presented as the means ± S.D. of three independent experiments. * $p < 0.05$ vs. control.

2. 3T3-L1 전지방세포 아포토시스 유도에 미치는 tanshinone IIA의 영향

Tanshinone IIA가 3T3-L1 전지방세포의 아포토시스 유도에 미치는 영향을 알아보기 위해서 tanshinone IIA (5 μM과 10 μM)을 24-72 h까지 처리하고 PI와 Annexin V-FITC로 염색하고 flow cytometer로 분석하여 아포토시스 활성을 측정하였다. PI 염색에 의한 sub-G1시기의 DNA량을 분석한 결과 Fig. 3A와 같이 3T3-L1 전지방 세포의 초기 아포토시스 유도는 tanshinone IIA의 농도와 시간에 의존적이었다. 또한 Annexin V-FITC로 염색하여 아포토시스 세포를 분석한 결과 PI 분석결과와 유사하게 tanshinone IIA의 농도와 시간에 의존적으로 아포토시스가 유도되었다(Fig. 3B) 이러한 결과는 tanshinone IIA가 3T3-L1 전지방세포의 아포토시스를 효과적으로 유도하는 것을 제시해 주었다($p < 0.05$).

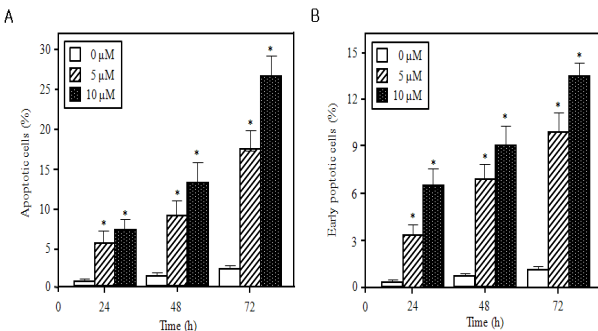


Fig. 3. Flow cytometric analysis of tanshinone IIA-mediated cell apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. Cells were treated with 0–10 μM tanshinone IIA for 24, 48, and 72 h. The percentage of apoptotic cells was calculated by CELL Quest software. (A) PI data. (B) Annexin V-FITC data. The data are presented as the means ± S.D. of three independent experiments. * $p < 0.05$ vs. control.

3. 아포토시스 유도 관련 분자발현에 미치는 tanshinone IIA의 영향

Tanshinone IIA가 3T3-L1 전지방세포의 아포토시스 유도 관련 단백질들의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해서 tanshinone IIA (5 μM과 10 μM)을 12시간 또는 24시간 처리하고 단백질의 활성과 발현은 ELISA와 Western blot방법으로 분석하였다. 아포토시스가 유도될 때 중요한 역할을 하는 caspase-3의 활성을 측정한 결과 Fig. 4A와 같이 tanshinone IIA의 농도와 시간에 의존적으로 caspase-3의 활성이 유도되었다. 더불어 5 μM과 10 μM의 tanshinone IIA를 24시간 동안 처리하고 caspase-3의 발현을 조사한 결과 단백질의 활성과 유사하게 농도가 높을수록 증가했다(Fig. 4B). 이러한 결과는 tanshinone IIA가 3T3-L1 전지방세포의 아포토시스 유도에 caspase-3가 관여된다는 사실을 제공해 주었다. 또한 tanshinone IIA가 유도하는 아포토시스에 있어서 또 다른 관련 분자들의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해서 아포토시스 유도 중요분자인 PARP의 발현을 조사하였다. Fig. 4B와 같이 대조군의 PARP 발현에 비해서 tanshinone IIA 처리를 세포에서는 농도에 의존적으로 그 발현이 줄어드는 반면, 절단 PARP는 PARP 발현과 반대로 tanshinone IIA 농도에 의존적으로 증가했다. 또한 Bax의 경우는 tanshinone IIA를 5μM 처리했을 경우보다 10 μM을 처리했을 때 그 발현이 증가되었다. 그러나 Bcl-2의 경우는 대조군에 비해 tanshinone IIA(5 μM과 10 μM)를 처리한 세포에서 그 발현이 억제되었다. 이러한 결과는 tanshinone IIA가 아포토시스 관련 분자를 발현 또는 억제 시킴으로서 3T3-L1 전지방세포의 아포토시스를 유도한다는 것을 제시해주었다.

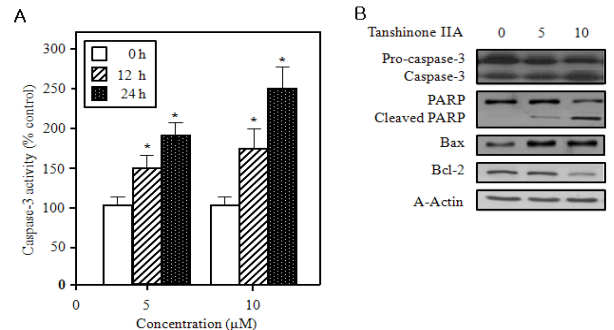


Fig. 4. Effect of tanshinone IIA on caspase-3 activity (A) and apoptotic protein levels (B) in 3T3-L1 preadipocytes. Cells were treated with 0–10 μM tanshinone IIA for 12 and 24 h. Caspase-3 activity levels were measured by ELISA. Protein levels were analyzed by Western blot analysis. The data are presented as the means ± S.D. of three independent experiments. * $p < 0.05$ vs. control.

4. 3T3-L1 지방세포의 지방 함량과 GPDH 활성에 미치는 tanshinone IIA의 영향

Tanshinone IIA가 3T3-L1 전지방세포에서 지방세포로 분화할 때 지방 함량에 미치는 영향을 알아보기 위해서 high glucose 배지에 0.5 mM IBMX, 1 μM DEX 및 1 μM INS를 첨가하여 배양한 후 Oil Red O 염색과 triglyceride 함량 및 GPDH의 활성을 측정하였다. Oil Red O로 염색하고 DMSO로 용출하여 지방의 함량을 측정한 결과 Fig. 5A와 같이 tanshinone IIA를 처리했을 경우 5 μM과 10 μM을 처리한 농도에서만 줄어드는($p < 0.05$) 반면,

세포내 triglyceride 함량을 측정된 결과 Fig. 5B와 같이 tanshinone IIA의 농도가 높을수록 그 함량이 현저히 줄어들었다 ($p < 0.05$). 더욱이 GPDH 활성의 경우도 tanshinone IIA를 처리했을 경우 triglyceride의 함량과 유사하게 농도가 높을수록 GPDH의 활성이 현저히 억제되었다. 이러한 결과는 3T3-L1 지방세포의 초기 분화에 있어서 tanshinone IIA가 뚜렷한 억제효과가 있음을 제공해주었다.

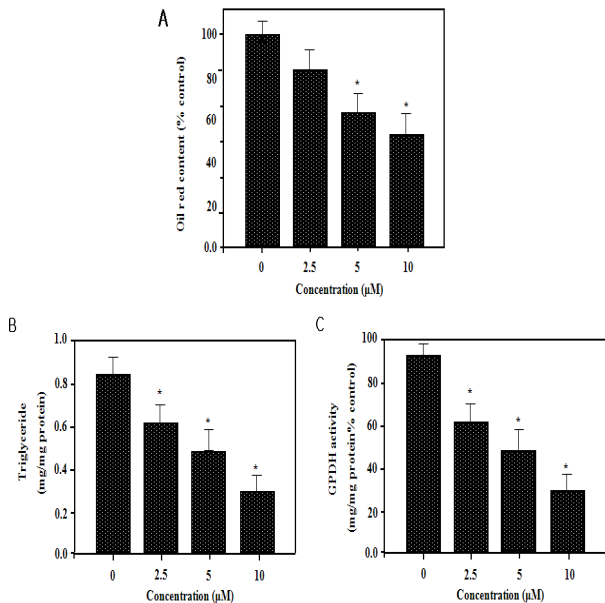


Fig. 5. Effect of tanshinone IIA on the inhibition of intracellular triglyceride production and GPDH activity in 3T3-L1 adipocytes. Cells were treated with 0–10 μM tanshinone IIA for 72 h. (A) Oil Red O contents. (B) Triglyceride contents. (C) GPDH activity. The data are presented as the means ± S.D. of three independent experiments. * $p < 0.05$ vs. control.

고찰

단삼 유래 tanshinone IIA는 항염증효과(anti-inflammatory activity)^{7,8,15,16}와 항산화효과(anti-oxidant activity)^{15,16} 뿐만 아니라 간성상세포(hepatic stellate cells)¹⁴, 간암 세포주인 HepG2 세포¹⁰와 유방암세포(breast cancer cells)¹⁸를 비롯한 여러 암세포의 아포토시스를 유도하는 것으로 알려졌다. 우리는 최근에 단삼으로부터 tanshinone II를 분리 동정한 후 설치류 유래 단핵구 세포주인 RAW264.7 세포를 endotoxin으로 자극하고 tanshinone IIA를 처리한 결과 일산화질소(nitric oxide, NO), tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin (IL)-6 등 염증 매개물 생성을 억제하는 효과를 보고하였으며⁷, 이어서 tanshinone IIA가 처리된 세포를 대상으로 nuclear factor (NF)-κB, mitogen-activated protein (MAP) kinase, 그리고 extracellular signal-regulated kinase (ERK) 세포신호전달에 관여하는 단백질의 발현을 조사하여 항염증 기전을 보고한바 있다⁸.

비만은 관상동맥질환과 고혈압을 비롯한 심혈관계 질환과 제 2형 당뇨병 등 대사성 질환을 야기하는 중요한 원인으로 밝혀지면서 현대사회에서 주목을 받고 있다¹. 마우스 유래 3T3-L1 전

지방 세포주는 성숙한 지방세포로 분화하는데 필요한 분자적 특성이 잘 알려져 있고¹⁹, 지방조직은 triacylglycerol를 생산하는 지방세포로 구성되며 생체의 에너지로 사용되는 에너지 저장 창고다. 그런데 과도하게 지방이 축적된 지방조직은 인슐린 저항성을 야기하기 때문에 제 2형 당뇨병과 심혈관계 질환을 증가시키는 원인이라 할 수 있다²⁰. 그러므로 전지방세포의 증식과 지방세포의 지방합성을 조절하는 것은 항비만관리에 핵심적인 요소라 할 수 있다. 3T3-L1 전지방세포는 암세포주는 아니지만 특정물질 (IBMX, DEX 및 INS)을 처리하여 배양하면, 지방세포로 쉽게 분화될 수 있다는 장점이 있어 비만 연구에 빈번히 사용된다²¹.

우리는 상기와 같이 tanshinone II의 항염증 분자기전을 보고한 후 이 약물이 지방세포에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위해서, 우선 3T3-L1 전지방세포의 성장에 미치는 tanshinone IIA의 영향을 MTT와 LDH 유리능을 조사하였다. 그 결과 3T3-L1 전지방세포의 성장은 tanshinone IIA의 농도가 증가할수록 유의하게 억제된다는 사실을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 또한 tanshinone IIA가 3T3-L1 전지방세포의 아포토시스 유도에 미치는 영향을 알아보기 위해서 PI 염색을 하여 flow cytometer로 분석한 결과 Fig. 3A와 같이 농도에 의존적으로 아포토시스를 유도하는 사실을 확인할 수 있었다. Annexin V-FITC는 phosphatidylserine과 결합하는데, 이러한 현상은 아포토시스 초기에 발견된다고 알려졌다²¹. 따라서 tanshinone IIA 처리가 3T3-L1 전지방세포의 초기에 아포토시스를 유도할 수 있는 약리적 효과가 있는지 조사하였다. 그 결과 tanshinone IIA의 농도가 증가될수록 phosphatidylserine과 Annexin V-FITC의 결합이 증가됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 이와 같이 tanshinone IIA가 3T3-L1 전지방세포의 성장을 억제하는 방향은 초기의 아포토시스를 유도함으로써 약리효과를 나타낸다는 사실을 알 수 있었다.

Tanshinone IIA가 3T3-L1 전지방세포의 아포토시스를 유도하는데 관여하는 분자적 기전을 알아보기 위해서 우리는 아포토시스 유도와 관련된 단백질의 활성 및 발현을 조사하였다. 그 결과 caspase-3의 활성은 tanshinone IIA가 처리된 농도에 의존적으로 그 활성이 유의하게 증가되었다(Fig. 4A). 더불어 caspase-3, PARP, Bax 및 Bcl과 같은 아포토시스 유도에 관여하는 단백질 발현을 조사한 결과 Fig. 4B와 같이 tanshinone IIA의 농도가 증가할수록 caspase-3의 발현이 증가함을 할 수 있었다. Caspase-3는 PARP를 절단하여 세포사멸을 유도하는 중요한 단백질 효소 중의 하나이다²². PARP와 절단 PARP의 발현을 조사한 결과 tanshinone IIA의 농도가 증가할수록 PARP의 발현은 억제되었으나, 절단 PARP의 발현은 증가하였다. 더욱이 tanshinone IIA는 Bax의 발현을 증가시킨 반면, Bcl-2의 발현을 감소시키는 약리적 효과가 있었다. 이와 같은 tanshinone IIA의 분자 기전은 capsaicin이 작용하는 분자 기전과 유사함을 확인할 수 있었다²³.

한편 우리는 3T3-L1 전지방세포를 IBMX, DEX 및 INS를 처리하고 지방세포로 유도한 후 tanshinone IIA를 처리하고 지방합량을 조사하였다. 그 결과 Fig. 5A와 같이 Oil Red O 함량은 저농도에서는 큰 변화가 없었으나, 5 μM과 10 μM 처리군에서는 유의하게 그 함량이 감소되었고, triglyceride와 GPDH는 5-10 μ

M tanshinone IIA 처리군에서 모두 유의하게 감소되어 농도에 의존적이었다(Fig. 5B와 C). 따라서 3T3-L1 지방세포의 분화에 있어서 tanshinone IIA의 약리 및 분자기전의 조사가 남아 있을 지라도 본 연구의 결과에서 제시한 tanshinone IIA는 지방세포의 분화를 효과적으로 억제하는 약리 효과가 있음을 확인할 수 있었다. Huang 등(2009)은 3T3-L1 세포를 대상으로 tanshinone IIA를 처리한 결과 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ 의 활성을 억제하는 신호전달 경로를 통하여 전지방세포에서 지방세포로 분화하는 것을 억제한다는 보고를 하였다⁹⁾.

본 연구의 결과를 요약하면, tanshinone IIA는 3T3-L1 전지방세포의 증식을 억제하는 효과가 있었고, 이러한 억제는 caspase-3의 활성 및 관련 분자를 억제 또는 활성화 시킴으로써 아포토시스를 유도하는 약리적 효과가 있었다. 또한 tanshinone IIA는 3T3-L1 지방세포의 분화시 지방의 함량을 억제하는 효과가 있었다. 따라서 단삼 유래 tanshinone IIA는 3T3-L1 전지방세포와 지방세포의 지방형성을 억제시킬 수 있는 효과적인 물질이라 사료된다.

결 론

비만은 심혈관계 질환 및 제 2형 당뇨병을 포함한 여러 가지 대사성 질환을 일으키기 때문에 특별히 선진국에서 심각한 건강상의 문제로 주목 받고 있다. 본 연구의 목적은 3T3-L1 전지방세포와 지방세포에서 아포토시스의 유도과 지방형성을 억제에 대한 단삼(*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 유래 tanshinone IIA의 효과를 조사하기 위한 것이다.

Tanshinone IIA가 3T3-L1 전지방세포의 성장에 미치는 영향을 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]와 LDH (lactate dehydrogenase) 분석을 통하여 조사한 결과 농도와 시간에 의존적으로 유의하게 감소되었다. 또한 3T3-L1 전지방 세포에 tanshinone IIA를 처리하여 flow cytometer로 분석한 결과 시간과 농도에 의존적으로 아포토시스가 유도되었다. tanshinone IIA의 처리는 정상 세포수를 감소시킨 반면, 초기와 후기에 아포토시스를 농도에 의존적으로 증가시켰다. Tanshinone IIA는 3T3-L1 전지방세포에서 caspase-3와 Bax의 활성을 증가시키므로써 PARP의 절단을 증가시켰고, Bcl-2의 억제조절에 의한 신호전달 체계로 아포토시스를 유도하였다. 더욱이 tanshinone IIA는 세포내 triglyceride의 함량과 GPDH (glycerol-3-phosphate dehydrogenase)의 활성을 감소시키는 약리 효과가 있었다.

이러한 결과는 tanshinone IIA가 3T3-L1 전지방세포와 지방세포의 아포토시스 유도와 지방형성의 억제시키는 단서를 제공 해주었다

참고문헌

1. Kopelman, P.G. Obesity as a medical problem. *Nature* 404: 635-643, 2000.

2. Formiguera, X., Canton, A. Obesity: epidemiology and clinical aspects. *Best Pract. Res. Clin Gastroenterol.* 18: 1125-1146, 2004.

3. Wang, Y.W., Jones, P.J. Conjugated linolic acid and obesity control: efficacy and mechanisms. *Int J Obe Relat Metab Disord.* 28: 941-955, 2004.

4. Madsen, L., Petersen, R.K., Sørensen, M.B., Jørgensen, C., Hallenborg, P., Pridal, L., Fleckner, J., Amri, E.Z., Krieg, P., Furstenberger, G., Berge, R.K., Kristiansen, K. Adipocyte differentiation of 3T3-L1 preadipocytes is dependent on lipoxygenase activity during the initial stages of the differentiation process. *Biochem J.* 375: 539-549, 2003.

5. Kim, J.K. *Illustrated natural drugs encyclopedia*, Namsandan Publishers, Seoul, p 160, 1989.

6. Ueng, Y.F., Kuo, Y.H., Wang, S.Y., Lin, Y.L., Chen, C.F. Induction of CYP1A by a diterpene quinone tanshinone IIA isolated from a medicinal herb *Salvia miltiorrhiza* in C57BL/6J but not in DBA/2J mice. *Life Sci.* 74: 885-896, 2004.

7. Jang, S.I., Jeong, S.I., Kim, K.J., Kim, H.J., Yu, H.H., Park, R., You, Y.O. Tanshinone IIA from *Salvia miltiorrhiza* inhibits expression of inducible nitric oxide synthase and production of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in activated RAW 264.7 cells. *Planta Med.* 69: 1057-1059, 2003.

8. Jang, S.I., Kim, H.J., Kim, Y.J., Jeong, S.I., You, Y.O. Tanshinone IIA inhibits LPS-induced NF- κ B activation in RAW 264.7 cells: possible involvement of the NIK-IKK, ERK1/2, p38 and JNK pathways. *Eur J Pharmacol.* 542: 1-7, 2006.

9. Gong, Z., Huang, C., Sheng, X., Zhang, Y., Li, Q., Wang, M.W., Peng, L., Zang, Y.Q. The role of tanshinone IIA in the treatment of obesity through peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonism. *Endocrinology* 150: 104-113, 2009.

10. Park, H.J., Lee, S.B., Lee, E., Cha, B.C., Chio, M.Y., Lee, S.M., Chung, W.T. GC-MS analysis of diterpene quinone constituents of *Salvia miltiorrhiza* radix and biological activity. *J Korean Soci Food & Nutr.* 24: 459-465, 1995.

11. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63, 1983.

12. Takada, E., Toyota, H., Suzuki, J., Mizuguchi, J. Prevention of anti-IgM-induced apoptosis accompanying G1 arrest in B lymphoma cells overexpressing dominant-negative mutant form of c-Jun N-terminal kinase 1. *J Immunol.* 166: 1641-1649, 2001.

13. Ramirez-Zacarias, J.L., Castro-Munozledo, F., Kuri-Harcuch, W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by

- staining intercytoplasmic lipids with Oil Red O. *Histochemistry* 97: 493-497, 1992.
14. Wise, L.S., Green, H. Participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate dehydrogenase in the adipose conversion of 3T3 cells. *J Biol Chem.* 254: 273-275, 1979.
 15. Lu, Q., Zhang, P., Zhang, X., Chen, J. Experimental study of the anti-cancer mechanism of tanshinone IIA against human breast cancer. *Int J Mol Med.* 24: 773-780, 2009.
 16. Lin, R., Wang, W.R., Liu, J.T., Yang, G.D., Han, C.J. Protective effect of tanshinone IIA on human umbilical vein endothelial cell injured by hydrogen peroxide and its mechanism. *J Ethnopharmacol.* 108: 217-222, 2006.
 17. Che, X.H., Park, E.J., Zhao, Y.Z., Kim, W.H., Sohn, D.H. Tanshinone II A Induces apoptosis and S phase cell cycle arrest in activated rat hepatic stellate cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* in press. 2009.
 18. Lu, Q., Zhang, P., Zhang, X., Chen, J. Experimental study of the anti-cancer mechanism of tanshinone IIA against human breast cancer. *Int J Mol Med.* 24: 773-780, 2009.
 19. Cowherd, R.M., Lyle, R.E., McGehee, R.E.Jr. Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Cell Dev Biol.* 10: 3-10, 1999.
 20. Saltiel, A.R., Jahn, C.R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806, 2001.
 21. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-nakken, H., Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptosis cell using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol. Methods* 184: 39-51, 1995.
 22. Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirer, G.G., Earnshaw, W.C. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371: 346-347, 1994.
 23. Hsu, C.L., Yen, G.C. Effects of capsaicin on induction of apoptosis and inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J Agric Food Chem.* 55: 1730-1736, 2007.