

# 胡椒와 Piperine에 의한 총체적 유전자 발현 비교

조은영 · 정지천\*

동국대학교 한의과대학 내과학교실

## Genome-wide Expression Profiling of Piperine and *Piper nigrum* Linne

Eun Young Jo, Ji Cheon Jeong\*

Department of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dongguk University

In addition to spice, black pepper (*Piper nigrum* Linne : PnL) has been used as herbal medicine because of its function in anti-oxidation, anti-inflammation, and anti-carcinogenesis. Recently, it has been reported that piperine, a component of PnL, inhibits adipocyte differentiation by repressing various adipogenic gene expressions. In this study, we determined whether piperine is a major constituent of PnL that confers the anti-adipogenic activity at whole genome level. Differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes was induced in presence of PnL extract or piperine. To compare genes that are regulated by PnL extract or piperine, we performed expression profiling using microarrays (Agilent Mouse 44k 4plex). RNA samples were labeled with Cy3 and Cy5, respectively. Labeled samples were hybridized to the microarrays. Results were filtered and cut off set  $p < 0.05$ . Genes exhibiting significant differences in expression level were classified into Gene Ontology (GO)-based functional categories (<http://www.geneontology.org>) and KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>). Extract of PnL and its component piperine reduced lipid accumulation in 3T3-L1 cells during adipogenesis. Such anti-adipogenic activity appears to result from down-regulation of transcription factor genes involved in adipogenesis, and other genes involved in fatty acid synthesis, transport, triglyceride synthesis, and carbohydrate metabolism. These genome-wide studies lead to conclude that piperine, as a critical component of PnL, plays common role with PnL in anti-adipogenesis.

Key words : *Piper nigrum* Linne, piperine, 3T3-L1 cells, adipogenesis, microarray

### 서 론

지방세포는 지방조직 내에 존재하는 특화된 세포로서 체내의 에너지 항상성 조절에 매우 중요한 역할을 담당한다<sup>1)</sup>. 정상인의 지방세포는 과잉의 에너지가 체내에 흡수될 경우 중성지방(triglyceride)의 형태로 에너지를 세포에 축적해두며, 에너지가 부족하게 되면 축적된 중성지방을 분해하여 에너지원으로 사용할 수 있도록 항상성을 조절하는 기능을 한다. 과잉 에너지가 지속적으로 체내에 흡수되면 지방조직은 과잉 에너지를 축적하기 위해 지방전구세포를 자극하여 지방세포로의 분화(adipogenesis)를 촉진하여 지방세포의 수를 늘리게 되고 늘어난 지방세포에 의해 인체는 더 많은 중성지방을 축적하게 된다. 지속적인 에너지 공급에 의해 증가되는 지방세포의 증가와 중성지

\* 교신저자 : 정지천, 경주시 석장동 1090-1 동국대학교 경주한방병원 2 내과

· E-mail : jjcjh@paran.com, · Tel : 054-770-126

· 접수 : 2010/08/17 · 수정 : 2010/09/30 · 채택 : 2010/10/05

방의 축적은 이후 염증 반응 및 비만으로 이어지게 되며 당뇨병, 고지혈증, 심혈관질환 등 질병의 형태로 발전할 수 있다<sup>1,2)</sup>. 그러므로 지방세포 분화의 기전 연구는 인체의 에너지 항상성 조절 뿐만 아니라 질병의 예방 및 치료의 방안을 제시해 줄 수 있다.

지방세포의 분화는 매우 복잡한 신호 전달과 유전자들의 발현 조절을 통해 이루어지며, 몇몇 핵심 유전자들이 분화 과정에서 중요한 역할을 한다. CCAAT-enhancer binding protein (C/EBP) family, Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ), Sterol regulatory element binding protein (SREBP) family는 지방세포 분화에서 중추적인 기능을 담당하는 유전자들로서 지질 생합성 조절, 세포내 지질의 축적 조절, glucose 흡수 조절 등의 기능을 하는데 필요한 유전자들의 발현 조절을 담당하여 분화의 진행을 유도한다<sup>3,5)</sup>. 이러한 지방세포의 분화 조절에 기능성 식물 및 한약재 추출물들이 효과가 있음이 보고되고 있다. 白果葉, 松葉, 黃精 등은 혈압, 고지혈증, 고혈당을 완화시켜주는 등의 효능이 있어 이들이 함유하고 있는 phytochemical

들은 지방세포의 분화조절에 영향을 주는 것으로 알려져 있다<sup>6-8)</sup>.

胡椒 (*Piper nigrum* Linne)는 후추나무의 과실을 말린 것으로서 세계적으로 널리 사용되는 향신료이다. 한의학에서는 溫中除寒下氣 快膈消痰 解毒 등의 효능으로 寒痰食積 脘腹冷痛 霍亂吐瀉 腸滑冷痢 등의 치료에 활용되어 왔다<sup>9)</sup>. 胡椒의 작용은 활성물질인 piperine을 통하여 일어나는데 항염증<sup>10)</sup>, 항산화<sup>11)</sup>, 복통완화<sup>12)</sup>, 진통<sup>13)</sup> 등의 효과가 있어 치료에 사용되고 있다. 본 교실에서는 선행 연구를 통하여 胡椒추출물이 piperine의 작용을 통해 PPAR $\gamma$ 와 SREBP의 발현 조절에 영향을 주어 지방세포 분화를 억제한다는 결과를 보고하였다<sup>14)</sup>.

본 연구에는 胡椒에 의해 저해되는 지방세포 분화 현상을 전체 유전자 수준에서 비교 분석하여 작용 기전을 밝히고자 하였으며, 그것이 piperine을 통해서 이루어짐을 명확히 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약제 및 시약

Oil-red-O, Dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), insulin, Dimethylsulfoxide (DMSO)는 Sigma (ST. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Fetal bovine serum (FBS), Bovine serum (BS)은 GIBCO (Grand Island, NY) 제품을 사용하였다. 胡椒는 시중 (태원당약업사, 대구, 대한민국)에서 구입하고 정선하여 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 검액의 조제

胡椒 300 g을 잘게 분쇄하고 3배량의 95% methanol을 가하여 60°C에서 중탕으로 24시간씩 3회 반복 추출하여 추출액을 얻었다. 이 추출액을 실온으로 냉각시키고 여지로 여과한 다음 여액을 회전 감압농축기를 사용하여 건조시켜 추출물 12.97 g (수율 4.32%)을 얻어 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

#### 2) 세포 배양 및 분화 유도

3T3-L1 세포는 heat inactivation한 10% (v/v) bovine serum, antibiotics/antimiotics (Invitrogen)를 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 혼합하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건에서 배양하였다. 3T3-L1 세포의 분화 유도는 6 well plate에서 100%로 자란 세포를 2일간 더 배양하고, 100 mM IBMX, 5  $\mu$ g/ml insulin, 0.5  $\mu$ M dexamethasone, heat inactivation된 10% FBS가 첨가된 배지에서 2일간 배양한 후, 5  $\mu$ g/ml insulin, antibiotics/antimiotics (Invitrogen), 10% FBS가 첨가된 배지를 2일마다 교체하며 배양하여 6-10일 후 실험에 사용하였다. 胡椒추출물, Piperine, DMSO는 분화 유도와 함께 처리하여 2일마다 배지 교체 시에 지속적으로 처리하였다.

#### 3) Oil-Red-O staining

분화가 진행된 3T3-L1 세포를 PBS로 2회 세척하고, PBS에 용해된 10% Formalin 용액 2 ml를 사용하여 실온에서 5분간 고정하고, 용액을 제거한 후에 다시 1시간 동안 고정하였다.

Formalin 용액을 제거하고 60% isopropanol로 세척한 후 실온에서 말렸다. Oil Red O working solution을 가하여 10분간 반응시킨 후 DW를 이용하여 5회 세척하였다. 염색된 세포는 현미경 사진을 찍었고, 100% isopropanol을 가하여 세포 내에 축적된 lipid를 용출하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 4) RNA extraction, Reverse-transcription 및 PCR

RNA는 TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 분리하였고, 1 mg의 RNA를 MMLV reverse transcriptase와 random oligo (dT) primers (Invitrogen)를 이용하여 역전사 반응을 진행하여 cDNA를 준비하였다. 준비된 cDNA는 CFX96TM real-time system (Bio-Rad), SYBR green reaction system (Bio-Rad) 그리고 Quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR) 방법을 통해 유전자의 발현을 확인하는데 사용되었다. 유전자의 발현 확인은 아래의 primer 조합을 이용하여 진행하였다.

Table 1. List of primers for qRT-PCR

Name	Forward primer (5' to 3')	reverse primer (5' to 3')
GAPDH	CTGCACCACCAACTGCTTAGC	GGGCCATCCACAGTCTTCTGG
LPL	ATCCATGGATGGACGGTAACG	CTGGATCCCAATACTTCGACCA
adipsin	CCTGAACCCTACAAGCGATG	GGTTCACCTCTTTGTCTCTCG
PPAR $\gamma$	TTTTCAAGGGTGCCAGTTTCAAT CC	AATCCTTGCCCTCTGAGAT
SREBP-1c	CTG AGG CAA AGC TGA ATA AAT CTG CTG	GTT CTC CTG CTT GAG TTT CTG GTT G
LXR $\alpha$	GCTGCCAGCAACAGTGTAA	CTGCCGGGGTTGTACCTCCGT
C/EBP $\alpha$	CGC TGCCCGCCT CTTCCC	GGCTGCAGGTGCATGGTGGT
GLUT4	AGGGGCCTGCCGAAAGAGT	CTGTTGGCTCAGCTGCAGCAC
FATCD36	GTCCTGGCT GTGTTTGGAGG	CTTGGCTAGATAACGAACTCTGT A
aP2	AAAGACAGCTCCTCCTCGAAGGT T	TGACCAAATCCCCATTTACGC
Scd1	CATCCCATCGCCTGCTCTACC	GAAACCTGCCCTCCTGACTCTC

#### 5) Microarray 및 결과 분석

분리된 RNA의 정성 및 정량 분석은 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 이용해 수행되었다. RNA는 RNA integrity number (RIN) 값이 9 이상의 시료를 사용하여 시료제작사의 실험 방법을 기준으로 하여 증폭되었으며, Cy3와 Cy5 두 탐침으로 표지되어 Agilent 4 $\times$ 44K Mouse Whole-Genome CHIP 상에서 분석되었다. The Lowess (locally weighted linear regression curve fit) and dye-swap normalization 방식을 이용해 microarray 상에서 나타난 신호 세기의 비율 (Cy5/Cy3)을 적용하여 분석 결과를 확보 하였다. 확보된 결과는 각 탐침의 신호 세기에 대한 보정을 통해 일정 수준의 유의성 (p<0.05)을 가진 경우만을 선별하였고, 아래에 언급한 database를 이용하여 genome-wide 수준에서 유전자의 발현 패턴을 비교 분석하였다. Gene Ontology (GO)-based functional categories (<http://www.geneontology.org>), KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>), DAVID Bioinformatics Resources (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)

#### 6) 통계처리

실험결과의 통계처리는 각 실험결과의 평균값과 평균 오차

를 이용하여 표시하였고, student t-test를 통하여 유의성을 검정하였다.

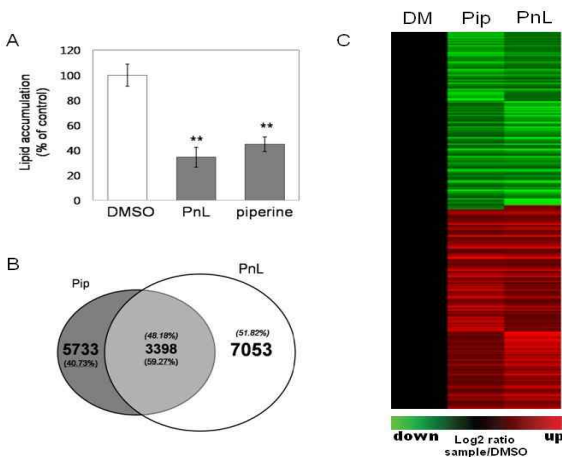
## 결 과

### 1. 胡椒추출물과 piperine에 의한 지방 축적 억제 효과

지방세포 분화에 胡椒추출물과 piperine을 처리하여 분화 억제 효과를 확인하였다. 胡椒추출물 (40 µg/ml)과 piperine (100 µM)을 분화 기간 중인 10일간 지속적으로 처리하였고, ORO staining을 통하여 지방 축적의 정도를 확인한 결과 胡椒추출물은 34.51% 수준으로, piperine은 44.91% 수준으로 감소되었음을 확인하였다(Fig. 1A).

### 2. Microarray 분석

Microarray 분석에 사용하기 위해 胡椒추출물과 piperine이 처리되어 분화 억제 효과를 보이는 3T3-L1 세포로부터 RNA를 분리 정제하였다. 정제된 RNA를 상기한 실험 방법에 따라 처리 및 분석에 사용하였다. 분석 결과 胡椒추출물은 대조군과의 유전자 발현 패턴을 비교해 보았을 때 7053개의 유전자의 변화가 나타났고, piperine은 5733개의 유전자의 발현 변화가 나타났음을 확인하였다. 두 물질의 유전자 발현 변화에서 같은 발현 패턴을 보이는 유전자는 3398개의 유전자로 나타났다(Fig. 1B). 같은 발현 패턴을 보이는 3398개의 유전자를 clustering을 통하여 분석하였고, 胡椒추출물과 piperine은 지방세포 분화 중에서 매우 유사한 유전자 발현 조절 패턴을 보임을 확인하였다(Fig. 1C).



**Fig. 1. Gene expression profiling of piperine-regulated adipogenesis in 3T3-L1.** (A) Piper nigrum Linne (PnL) extract and piperine reduces lipid accumulation in 3T3-L1. Data displayed reflect the mean±SEM of three independent experiments. \*\*p<0.001 (B) Genes expressed differentially during adipogenesis by piperine or PnL extract are indicated in Venn diagram. (C) Clustering analysis of 3398 gene.

### 3. 지방세포 분화와 연관된 유전자들의 발현 억제 효과

胡椒추출물과 piperine에 의해 조절되는 유전자들 중에서 지방세포 분화에 핵심적인 기능을 하는 유전자들의 발현을 확인하여 보았다. 지방세포 분화에서 중추적인 기능을 하는 전사인자 인 PPARγ의 발현 패턴은 DMSO를 처리한 대조군의 발현을 1.0

으로 설정하였을 경우 piperine 처리시 0.178 수준으로 감소되었고, 胡椒추출물 처리시 0.266 수준까지 감소되었다. SREBP1의 경우 0.527배와 0.445배로 감소되었고, C/EBPα 또한 0.256과 0.206 수준으로 감소됨을 확인하였다. PPARγ의 표적유전자인 adipon (adipoq)과 ap2 또한 낮은 수준으로 감소됨을 확인하였다. 지질 생합성과 콜레스테롤 생합성 및 조절에 관여하는 LXRα의 발현 수준도 0.395배와 0.416배로 감소되어 있음을 확인하였다. SCD1은 LXRα의 표적 유전자로서 역시 매우 낮은 수준으로 발현이 억제되어 있음을 확인할 수 있었다. Lipin, resistin, Pherilipin 등은 지방세포 분화시에 증가되는 유전자들로서 piperine과 胡椒추출물 처리시 발현이 감소되어 있음을 확인하였다. Glucose의 세포 내 흡수에 관여하는 Glut4의 발현도 0.073배와 0.049배로 매우 낮게 나타남을 확인하였다(Table 2).

**Table 2. The mRNA expression level of genes associated with fat cell differentiation**

Gene description	Name	Gene bank	Pip	PnL
<b>Adipocyte differentiation</b>				
Solute carrier family 2, member 4 (Slc2a4)	Glut4	NM_009204	0.073	0.049
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	Cebpb	NM_009883	0.400	0.399
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	Cebpa	NM_007678	0.256	0.206
Sterol regulatory element binding factor 1	Srebf1	NM_011480	0.527	0.445
Peroxisome proliferator activated receptor gamma	Pparg	NM_011146	0.178	0.266
Adiponectin, C1Q and collagen domain containing	Adipoq	NM_009605	0.355	0.095
Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3 (nr1h3)	LXRα	NM_013839	0.395	0.416
Nuclear receptor co-repressor 2	Ncor2	NM_011424	0.744	0.446
Fatty acid binding protein 4, adipocyte (ap2)	Fabp4	NM_024406	0.216	0.440
Lipin 1	Lpin1	NM_015763	0.123	0.219
Resistin	Retn	NM_022984	0.054	0.028
Stearoyl-coenzyme A desaturase 1	Scd1	NM_009127	0.090	0.054
Perilipin	Plin	NM_175640	0.133	0.089

### 4. 지질대사에 관여하는 유전자들의 발현 억제 효과

胡椒추출물과 piperine이 지질대사에 관여하는 유전자들의 발현에 영향을 미치는지 확인하여 보았다. FASN, ACSL1, ACSL5는 지방산 생합성에 관여하는 유전자로서 piperine과 胡椒추출물 처리시 낮은 발현 패턴을 보여주었다. SCD1은 지방산 생합성에도 관여하는 유전자로서 낮은 수준의 발현 패턴을 보였다(Table 2). DGAT1, DGAT2는 중성지방 (triglyceride)의 생합성에 관여하는 유전자들로서 발현 수준이 매우 낮게 나타났다. 중성지방의 생합성에는 SREBP1C와 LPL도 관여하며 이 두 유전자의 발현 또한 대조군에 비해 낮은 수준으로 발현되고 있음을 확인하였다. CD36, Slc27A4, FABP4 등은 지질의 흡수 및 전달에 관여하는 유전자들로서 역시 발현이 감소되어 있음을 확인할 수 있었다. Slco2a1은 지질분자인 prostaglandin의 수송에 관여하는 유전자로서, 세포내의 prostaglandin을 세포 외부로 배출하는 기능을 가진 유전자로서 발현이 증가되어 있음을 확인하였다 (Table 3).

Table 3. The mRNA expression level of genes associated with lipid metabolism

Gene description	Name	Gene bank	Pip	PnL
<b>Biosynthetic process</b>				
Fatty acid synthase	Fasn	NM_007988	0.336	0.151
Acyl-coa synthetase long-chain family member 1	Acs1	NM_007981	0.152	0.070
Acyl-coa synthetase long-chain family member 5	Acs15	NM_027976	0.360	0.394
Fatty acid desaturase 3	Fads3	NM_021890	0.439	0.687
Cytochrome P450, family 51	Cyp51	NM_020010	0.234	0.396
Diacylglycerol o-acyltransferase 2	Dgat2	NM_026384	0.144	0.248
Diacylglycerol o-acyltransferase 1	Dgat1	NM_010046	0.220	0.371
Adiponectin receptor 1	Adipor1	NM_028320	0.641	0.564
Adiponectin receptor 2	Adipor2	NM_197985	0.250	0.402
<b>Uptake and transport</b>				
Solute carrier family 37, member 4	Slc37a4	NM_008063	0.615	0.276
Solute carrier family 27, member 4	Slc27a4	NM_011989	0.353	0.620
Solute carrier family 22, member 4	Slc22a4	NM_019687	0.452	0.231
CD36 antigen (fatcd36)	Cd36	NM_007643	0.187	0.171
Lipoprotein lipase	Lpl	NM_008509	0.230	0.279
Apolipoprotein C-II	Apoc2	NM_009695	0.341	0.173
Fatty acid binding protein 4, adipocyte (ap2)	Fabp4	NM_024406	0.216	0.440
Mal1 mna for keratinocyte lipid-binding protein	Fabp5	X70100	0.105	0.143
Prostaglandin transporter PGT mna, complete cds	Slco2a1	AF323958	9.903	10.450

5. PPAR signaling pathway에 속하는 유전자의 발현 억제

지방세포의 분화에서 중추적인 기능을 하는 PPAR $\gamma$ 는 분화 과정에서 매우 다양한 유전자의 발현 조절에 영향을 준다. 이러한 PPAR $\gamma$  pathway는 KEGG database를 통해 확인해 볼 수 있다. PPAR $\gamma$ 는 지질 생합성, 콜레스테롤 생합성, 지방산의 전달 및 산화에 관여하는 유전자의 발현을 조절함으로써 지질대사에 매우 광범위하게 작용한다. 또한 지방전구세포에서 지방세포로의 분화를 유도하는 유전자의 발현을 조절하여 지방세포 분화에 영향을 준다(Fig. 2).

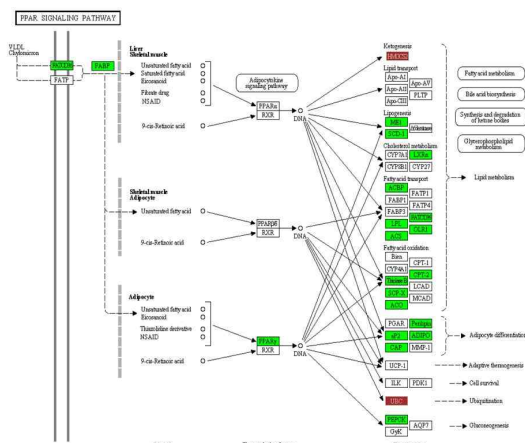


Fig. 2. PPAR signaling pathway from KEGG. Genes up-(brown) or down-(green) regulated by PnL extract and piperine are indicated from microarray results.

6. Microarray 분석 결과의 증명

Microarray 분석 결과의 증명을 위하여 qRT-PCR 방법을 이

용하여 유전자의 발현을 증명하였다. 모든 유전자는 대조군에서의 발현을 100%의 기준으로 하였을 때 piperine과 胡椒추출물에 의해 변화된 발현 정도를 %로 나타내었다(Fig. 3).

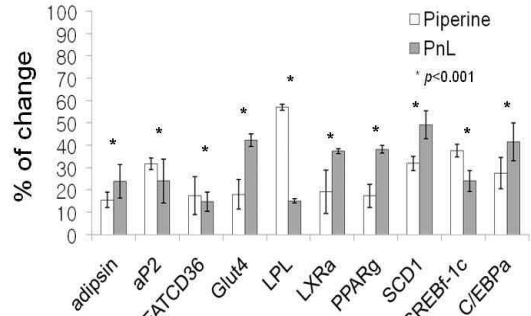


Fig. 3. Validation of genes expression selected in piperine- or PnL extract-regulated adipogenesis. 3T3-L1 cells were differentiated and treated with DMSO, piperine (100  $\mu$ M) and PnL extract (40  $\mu$ g/ml). 10 days following differentiation of 3T3-L1, the mRNA expression levels of indicated genes were monitored by qRT-PCR. Data displayed reflect the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. \*p<0.001 in contrast DMSO control.

고찰

胡椒는 미성숙 과실인 흑후추 (黑胡椒, black pepper)와 성숙한 과실인 백후추 (白胡椒, white pepper)로 구분되는데, 일반적으로 흑후추가 향신료로 사용되고 있다<sup>13,15</sup>. 한의학에서는 藥性이 熱하고 肺, 胃, 大腸經에 歸經하여 溫中除寒下氣 快膈消痰 解毒 등의 효능으로 寒痰食積 脘腹冷痛 霍亂吐瀉 腸滑冷痢 등의 치료에 활용되고 있다<sup>9</sup>. 실험 보고에 의하면 胡椒추출물이 혈액 내 지질 및 당 함량을 감소시킨다고 하여 체내 지질대사 조절과 밀접한 연관이 있음을 시사한다<sup>16,17</sup>.

胡椒의 약리 작용은 구성 성분 중 alkaloid-amine 성분의 효과임이 보고되고 있다<sup>18</sup>. Piperine은 胡椒의 alkaloid-amine 성분으로서, 항암, 항염증, 항산화 등 다양한 작용을 하는 활성물질로 보고되어 있다<sup>19,20</sup>. 이 논문에서는 胡椒추출물과 piperine에 의한 지방세포 억제 효과를 microarray 분석을 이용하여 전체 유전자의 발현 수준에서 증명하였다.

胡椒와 piperine은 지방세포 분화 과정 중에서 매우 유사한 유전자 발현 조절 패턴을 보였다. Piperine은 변화된 유전자중 59.27%의 유전자가 胡椒추출물에 의해 발현이 변화된 유전자와 일치되는 패턴을 보여 주었다(Fig. 1). 이는 胡椒추출물에 매우 다양한 alkaloid-amine 성분들이 함유되어 있음<sup>15,18</sup>을 고려해 볼 때 매우 높은 수준임을 알 수 있다. Clustering을 통한 유전자 발현 패턴을 비교해 보았을 때 piperine과 胡椒추출물에 의한 유전자의 발현 패턴이 매우 유사하게 나타남을 확인할 수 있다(Fig. 1C). 이는 胡椒추출물에 의한 지방세포 분화억제 기전이 piperine의 활성을 통해 일어날 가능성이 높음을 시사한다. 이러한 가능성은 특정 유전자들의 발현 패턴을 확인함으로써 더욱 명확해졌다. 지방세포 분화에 중심적인 역할을 하는 유전자들과 지질대사에 연관된 유전자들의 발현 패턴은 piperine과 胡椒추출물 처리시에 매우 유사한 발현 패턴을 보였다(Table 1 & 2). 이

는 piperine의 약리 활성을 통하여 胡椒추출물이 지방세포 분화에 영향을 미친다는 사실을 강하게 뒷받침한다.

胡椒추출물과 piperine은 지방세포 분화에 관여하는 유전자의 발현을 억제하였다(Table 1). PPAR $\gamma$ , SREBF1, C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  등은 분화 초기부터 지방세포 분화를 유도하는데 매우 핵심적인 전사인자들이다<sup>5,21</sup>). 胡椒추출물과 piperine에 의한 전사인자들의 발현 억제 효과는 상기 유전자들의 표적유전자의 발현 조절에도 영향을 주어 억제하는 효과를 유도하게 된다. Adipsin, aP2, LPL, LXRA와 같은 표적 유전자들은 지방산 생합성, 중성지방 생합성, 콜레스테롤 생합성 등 지질대사에서 중요한 기능을 하는 유전자들로서<sup>22-24</sup>), 이들 표적유전자들의 발현 억제는 지방조직 및 지방세포의 지질대사 조절을 억제하는 결과를 가져온다.

胡椒추출물과 piperine은 지질 생합성에 관여하는 유전자들의 발현을 억제하였다. 과잉 에너지상태에서 지질의 생합성은 lipid의 세포내 흡수나 glucose의 세포내 흡수로부터 시작된다. Glucose의 흡수는 발현이 증가하여 세포막으로 이동한 Glut4를 통해 이루어진다. 胡椒추출물과 piperine은 Glut4의 발현을 억제하였다(Table 1 & Fig. 3). 또한 지질의 세포내 전달에 관여하는 FATCD36, SLC27A4, FABP4의 발현을 억제하고 있음을 확인하였다(Table 2 & Fig. 3). 이는 piperine이 glucose뿐만 아니라 지질의 세포 내 흡수에도 영향을 주어 지질대사에 영향을 주고 있음을 의미한다.

Database를 이용한 microarray 분석 결과 piperine과 胡椒추출물은 지질 생합성 과정, 탄수화물 생합성 과정의 전반적인 억제 현상을 나타내고 있었다. 이러한 억제 현상은 PPAR signaling pathway, insulin signaling pathway, TCA-cycle, lipid biosynthetic procedure 등에 관여하는 유전자들의 발현이 감소되어 있음을 통해 확인할 수 있었다. PPAR signaling pathway를 살펴보면 PPAR $\gamma$ 의 발현 감소로부터 표적유전자의 발현 억제로 이어져 지방세포 분화의 유도 억제뿐만 아니라 대사 작용에 이르는 넓은 범위에서 세포내의 대사에 영향을 주게 됨을 확인할 수 있다(Fig. 2).

胡椒추출물과 piperine의 약리 작용은 기존에 알려진 진통, 항산화, 항암, 항염증 등의 반응뿐만 아니라 백반증의 회복, 과콜레스테롤혈증, 고지혈증, 고혈당의 완화, 지방세포 분화 억제 등 다양한 작용이 보고되고 있다. Piperine이 diacylglycerol acyltransferase (DGAT)를 억제하여 중성지방 합성을 억제한다는 보고가 있는데<sup>18</sup>), 이것은 본 논문의 microarray 결과에서 DGAT1과 DGAT2의 발현이 piperine에 의해 감소되어 있는 현상과 일치함을 보여준다. Piperine과 유사한 경우로서 capsaicin 또한 비만 유도 쥐의 혈중 중성지방 수치를 낮춘다는 결과가 보고되어 있다<sup>25</sup>). 이 두 물질은 모두 transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1 (TRPV1) receptor와 결합하여 신호를 전달할 수 있는 물질로 보고되어 있다<sup>13</sup>). Piperine의 경우 지방세포 분화에서 유전자들의 발현 억제 현상을 고려해 보았을 때 TRPV1에 의한 신호 전달 이외에 직접적인 표적이 존재할 것으로 기대된다.

## 결론

胡椒추출물과 piperine에 의해 나타나는 지방세포 분화 억제 효과를 microarray 방법을 이용하여 전체 유전자의 발현 수준에서 분석하였다. 胡椒추출물에 의한 지방세포의 분화 억제는 활성물질인 piperine의 약리 활성을 통해 이루어짐을 확인하였다. 지방세포 분화 과정에서 胡椒추출물과 piperine은 공통으로 PPAR $\gamma$ , SREBF1c, C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ 의 발현을 억제하였고, 지방산 생합성, 중성지방 생합성, 탄수화물 대사에 관여하는 중추적인 유전자들의 발현을 억제하는 약리작용을 통하여 지방세포 분화를 억제함을 밝혔다. 이를 통해 胡椒추출물의 활성은 대표적 성분인 piperine에 의해 매개됨을 전체 유전자 발현 수준에서 확인하였다.

## 참고문헌

1. Gregoire, F.M., Smas, C.M., Sul, H.S. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev.* 78(3):783-809, 1998.
2. Trujillo, M.E., Scherer, P.E. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev.* 27(7):762-778, 2006.
3. Fajas, L., Schoonjans, K., Gelman, L., Kim, J.B., Najib, J., Martin, G., Fruchart, J.C., Briggs, M., Spiegelman, B.M., Auwerx, J. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol Cell Biol.* 19(8):5495-5503, 1999.
4. Kim, J.B., Spiegelman, B.M. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev.* 10(9):1096-1107, 1996.
5. Le Lay, S., Lefrere, I., Trautwein, C., Dugail, I., Krief, S. Insulin and sterol-regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1C) regulation of gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Identification of CCAAT/enhancer-binding protein beta as an SREBP-1C target. *J Biol Chem.* 277(38):35625-35634, 2002.
6. Roh, S.W., Kim, J.B. Effects of Polygonati Rhizoma on the Diet-induced Hyperlipidemia in Rats. *Korean J Oriental Physiology & Pathology.* 22(5):1147-1151, 2008.
7. Lin, J., Della-Fera, M.A., Baile, C.A. Green tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits adipogenesis and induces apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. *Obes Res* 13(6):982-990, 2005.
8. Hassan, M., El Yazidi, C., Landrier, J.F., Lairon, D., Margotat, A., Amiot, M.J. Phloretin enhances adipocyte differentiation and adiponectin expression in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 361(1):208-213, 2007.

9. 李尙仁. 本草學. 서울, 醫藥社, pp 394-395, 1983.
10. Bang, J.S., Oh, D.H., Choi, H.M., Sur, B.J., Lim, S.J., Kim, J.Y., Yang, H.I., Yoo, M.C., Hahm, D.H., Kim, K.S. Anti-inflammatory and antiarthritic effects of piperine in human interleukin 1beta-stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models. *Arthritis Res Ther.* 11(2):R49, 2009.
11. Vijayakumar, R.S., Nalini, N. Efficacy of piperine, an alkaloidal constituent from *Piper nigrum* on erythrocyte antioxidant status in high fat diet and antithyroid drug induced hyperlipidemic rats. *Cell Biochem Funct* 24(6):491-498, 2006.
12. Bajad, S., Bedi, K.L., Singla, A.K., Johri, R.K. Antidiarrhoeal activity of piperine in mice. *Planta Med.* 67(3):284-287, 2001.
13. Szallasi, A. Piperine: researchers discover new flavor in an ancient spice. *Trends Pharmacol Sci.* 26(9):437-439, 2005.
14. Jeong, H.S., Jeong, J.C. Anti-adipogenic Effect of *Piper Nigrum* Linne. *Korean Journal of Oriental Physiology and Pathology.* 24(1):118-123, 2010.
15. Parmar, V.S., Jain, S.C., Bisht, K.S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O.D., Prasad, A.K., Wengel, J., Olsen, C.E. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry.* 46(4):597-673, 1997.
16. Kaleem, M., Sheema Sarmad, H., Bano, B. Protective effects of *Piper nigrum* and *Vinca rosea* in alloxan induced diabetic rats. *Indian J Physiol Pharmacol.* 49(1):65-71, 2005.
17. Jin, Z., Borjihan, G., Zhao, R., Sun, Z., Hammond, G.B., Uryu, T. Antihyperlipidemic compounds from the fruit of *Piper longum* L. *Phytother Res.* 23(8):1194-1196, 2009.
18. Lee, S.W., Rho, M.C., Park, H.R., Choi, J.H., Kang, J.Y., Lee, J.W., Kim, K., Lee, H.S., Kim, Y.K. Inhibition of diacylglycerol acyltransferase by alkalimides isolated from the fruits of *Piper longum* and *Piper nigrum*. *J Agric Food Chem.* 54(26):9759-9763, 2006.
19. Sunila, E.S., Kuttan, G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. *J Ethnopharmacol.* 90(2-3):339-346, 2004.
20. Faas, L., Venkatasamy, R., Hider, R.C., Young, A.R., Soumyanath, A. In vivo evaluation of piperine and synthetic analogues as potential treatments for vitiligo using a sparsely pigmented mouse model. *Br J Dermatol.* 158(5):941-950, 2008.
21. Hamm, J.K., el Jack, A.K., Pilch, P.F., Farmer, S.R. Role of PPAR gamma in regulating adipocyte differentiation and insulin-responsive glucose uptake. *Ann N Y Acad Sci.* 892: 134-145, 1999.
22. Juvet, L.K., Andresen, S.M., Schuster, G.U., Dalen, K.T., Tobin, K.A., Hollung, K, Haugen, F, Jacinto, S, Ulven, S.M., Bamberg, K. On the role of liver X receptors in lipid accumulation in adipocytes. *Mol Endocrinol* 17(2):172-182, 2003.
23. Schoonjans, K., Gelman, L., Haby, C., Briggs, M., Auwerx, J. Induction of LPL gene expression by sterols is mediated by a sterol regulatory element and is independent of the presence of multiple E boxes. *J Mol Biol.* 304(3):323-334, 2000.
24. Shimomura, I., Hammer, R.E., Richardson, J.A., Ikemoto, S., Bashmakov, Y., Goldstein, J.L., Brown, M.S. Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev.* 12(20):3182-3194, 1998.
25. Zhang, L.L., Yan Liu, D., Ma, L.Q., Luo, Z.D., Cao, T.B., Zhong, J., Yan, Z.C., Wang, L.J., Zhao, Z.G., Zhu, S.J. Activation of transient receptor potential vanilloid type-1 channel prevents adipogenesis and obesity. *Circ Res.* 100(7):1063-1070, 2007.