

증자 등글레 추출물의 3T3-L1 지방세포에서 분화억제 및 지질강하 효과

강병태^{1#}, 최원경¹, 박동철², 김종국³, 박모라³, 김성옥⁴, 김미려^{4,5*}

1 : 김천대학교 식품영양학과

2 : 김천대학교 호텔조리외식경영학과

3 : 경북대학교 과학기술대학 식품의식산업학과

4 : 한의치료 기술과학화 사업팀(BK 21 Plus) & 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실

5 : (재)대구TP한방산업지원센터

Effects of steamed *Polygonatum odoratum* extract on inhibition of adipocyte differentiation and lowering lipid in 3T3-L1 adipocytes

Byung Tae Kang^{1#}, Won Kyung Choe¹, Dong Cheol Park², Jong Kuk Kim³,
Mora Park³, Sung Ok Kim⁴, Mi Ryeo Kim^{4,5*}

1 : Dept. of Food Nutrition, Gimcheon University, Gimcheon, Republic of Korea

2 : Dept. of Hotel Cuisine & Food Service Management, Gimcheon University, Gimcheon, Republic of Korea

3 : Dept. of Food and Food -Service Industry, Kyungpook National University, Sangju, Republic of Korea

4 : Team for Scientification of Korean Medical Intervention (BK21 Plus) & Dept. of Herbal Pharmacology, Coll. of Oriental Medicine, Daegu Haany Univ. Daegu, Republic of Korea

5 : Oriental Medical Industry Support Center, Daegu Technopark, Daegu, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to investigate inhibitory effects of steamed *Polygonatum odoratum* extract (POE) on differentiation and adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes.

Methods : *Polygonatum odoratum* (*P. odoratum*) extract was extracted with ethyl acetate. Total phenolic and flavonoid contents in POE were measured for antioxidant activity. The spectrophotometric method was used to determine the DPPH and ABTS radical scavenging activity and ferric-reducing antioxidant potential (FRAP). MTT assay was examined for cell toxicity, oil red O staining was performed for intracellular adipogenesis in differentiated 3T3-L1 adipocytes. Western blot analysis for measurement of CCAAT/enhancer-binding protein α (C/EBP α), peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and AMP-activated protein kinase (AMPK) expressions were performed.

Results : The results revealed that POE has antioxidant activities. Contents of total polyphenolics and flavonoids were 50.83 ± 1.52 GAE mg/100g dry weight of POE and 17.05 ± 2.47 RE mg/100g dry weight of POE, respectively. DPPH radical scavenging activity, and FRAP in 10 mg/ml concentration were $92.1 \pm 0.6\%$, 244.8 ± 9.0 μ M Fe(II) and ABTS inhibition in 5 mg/ml concentration was $84.8 \pm 4.1\%$. Treatment of POE in adipocytes inhibited the differentiation and adipogenesis of 3T3-L1 adipocytes compared to those of vehicle control. Additionally, protein expressions of C/EBP α and PPAR γ , major transcription factor for the adipogenic genes, were significantly decreased compared to those of vehicle control ($p < 0.05$). Furthermore, phosphorylation of AMPK was increased in 3T3-L1 adipocytes treated with POE compared to that of vehicle control ($p < 0.05$).

Conclusions : we demonstrate that steamed *P. odoratum* extract (POE) has potentiating antioxidant activities,

*교신저자 : 김미려, 대구시 수성구 상동 165, 한의치료 기술과학화 사업팀(BK 21 Plus) & 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실

· Tel : 053-770-2251 · FAX : 053-770-2251 · E-mail : mrkim@dhu.ac.kr

#제1저자 : 강병태, 경북 김천시 대학로 214 김천대학교 식품영양학과

· Tel : 054-420-4131 · FAX : 054-420-4003 · E-mail : btkang@gimcheon.ac.kr

· 접수 : 2014년 2월 21일 · 수정 : 2014년 3월 10일 · 채택 : 2014년 3월 13일

inhibits differentiation and lipid accumulation and also induces energy expenditure in adipocytes, which may contribute to antiobesity property.

Key words : *Polygonatum odoratum* extract, antioxidant activity, C/EBP α , PPAR γ , 3T3-L1 cells

서론

WHO에 의하면 전세계 68억 인구 가운데 과체중 또는 비만으로 고통을 받고 있는 사람은 약 16억명이며¹⁾, 우리나라 성인의 비만율은 남자 36.3%, 여자 24.8%로서, 남성의 비만율이 높게 나타났을 뿐 만 아니라 지난 10년 동안 지속적인 증가 추세를 보이고 있다²⁾. 비만은 과다한 영양섭취, 신체활동 부족 등의 잘못된 생활습관으로 야기되며, 제2형 당뇨병 및 지방대사 이상, 고혈압 등의 대사성 질환의 주요원인이 된다. 우리나라 비만환자의 44.4%가 당뇨로 보고되고 있어³⁾ 비만에 따른 당뇨병 유병률이 심각하게 증가하고 있다.

미분화 3T3-L1 지방세포(pre-adipocyte)가 분화되어 완전 성숙한 3T3-L1 지방세포(matured adipocyte)로 분화되는 과정은 세포의 형태, 유전자 및 단백질의 발현, 호르몬 민감성의 변화 등을 수반⁴⁾하며, CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs)과 peroxisome proliferator activated receptor- γ (PPAR γ)를 중심으로 adipogenesis를 조절하면서 분화가 진행 된다⁵⁾. 이러한 지방세포의 분화를 저해하기 위하여 운동요법, 식이요법, 약물요법 및 외과적 수술 등의 다양한 방법들이 이용되고 있다. 이들 비만조절 요법 중 약물 치료제인 sibutramine (Reductil), orlistat (Xenical)과 같은 제제의 부작용(복통, 변비, 불면, 혈압의 상승 등)이 보고되면서 안전성과 유효성이 입증된 치료제 개발의 필요성이 절실한 실정이다⁶⁾. 따라서 안전성이 확보된 천연물로부터 항비만을 포함한 항당뇨 효능을 보유한 소재 발굴과 그에 대한 연구가 많이 진행되고 있다.

본 연구에 사용한 등굴레(*P. odoratum*)는 백합과(pluriflorum)에 속하는 다년생 초본으로 전국에 널리 자생하며, 인공 재배 가능 식용식물이다. 같은 속에 속하는 식물로는 각시등굴레, 용등굴레, 진황정, 시베리아등굴레, 큰등굴레 등이 있으며, 뿌리줄기를 건조시켜 약초로 이용할 때에는 황정 또는 옥죽이라고 불린다. 등굴레는 점액질이 풍부하고 전분질, 탄수화물, 아미노산, 알카로이드 등의 성분이 많이 함유된 것으로 보고되고 있다^{7,8)}. 한방과 민간에서는 등굴레 근경이 소갈, 자양, 강장, 허약증상보강에 많이 이용된다. 또한 영양불량, 폐결핵, 강심작용, 혈압저하, 혈당저하, 말기암의 보조 치료제 등에 효능이 있다고 전래되고 있다⁹⁾. 따라서 등굴레에 내재하는 생리활성 기능이 비만을 포함한 각종 성인병에 효과를 나타낼 수 있는 가능성을 시사해준다고 생각된다. 또한 식물에 포함되어 있는 총페놀함량은 항산화 효과와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다¹⁰⁾.

최근, 등굴레에 대한 건강 기능성 식품으로 활용도를 높이기 위하여 여러 가지 가공공정이 개발됨과 더불어 등굴레 성분의 생리적 효능을 밝히기 위한 생화학적인 연구가 진행되고 있다. 즉, 등굴레 증자 및 볶음조건에 따른 추출물의 항산화성 및 아질산염 소거능 분석¹¹⁾, alloxan처리 당뇨쥐에서 등굴레 유래 flavonoid의 혈당강하 효과¹²⁾, 등굴레에서 추출한 식

용섬유의 조성과 생리적 특성¹³⁾ 등이 있다고 보고하였다. 그러나 3T3-L1 지방세포에 등굴레 추출물의 처리에 따른 항산화 효과가 지방세포분화, 지질축적 억제 및 체내 에너지 항상성 관련 단백질의 인산화에 미치는 영향에 대한 연구는 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 등굴레 추출물의 항산화물 함량과 항산화능을 측정하고, 3T3-L1 지방세포에서 등굴레 추출물이 지방축적과 에너지 항상성에 미치는 영향과 항산화와 항비만 효과를 실험하였다.

재료 및 방법

1. 추출물의 조제 및 시약

김천산 등굴레 뿌리를 세척하고 껍질을 제거한 다음, 수증기로 1시간 증자하고 55~60°C 범위에서 열풍건조기로 6시간 건조하였다. 이 과정을 5회 반복 실시하여 추출용 시료로 사용하였다. 생리활성 물질의 추출은 먼저 건조한 등굴레 시료 200 g을 블렌드로 분쇄한 후, 실온에서 90% methanol($\times 3$ 용량)로 12시간 동안 진탕(120rpm)하여 추출하였으며 상기 과정을 3회 수행하여 methanol 추출액(수율 50.6%)을 모았다. 이를 여과지로 1회 거른 후, 45°C 수조에서 감압 농축 건조시켜 1차 추출물을 얻고 이를 증류수에 용해하였다. 1차 추출물을 chloroform과 ethyl acetate로 단계적으로 분배 추출하고, 감압 농축 건조하여 chloroform 분획(수율 1.09%)과 ethyl acetate 분획(수율 0.58%)을 얻었다. 본 실험에서는 ethyl acetate 분획시료를 동결건조하여 시료를 얻은 후, methanol에 용해하여 실험에 사용하였다.

본 실험에 사용 시약으로 bovine calf serum (BCS), fetal bovine serum (FBS), high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin streptomycin (P/S), enhanced chemiluminescence (ECL)은 Thermo Scientific사 (Rockford, IL, USA)에서 구입하였으며, dexametasone (DEX), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 3-[4,5-dimethylthiazolyl]-2,5-di phenyltetrazolium bromide (MTT), dimethylsulfoxide (DMSO), insulin, oil-red O 시약은 Sigma Aldrich사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. AMP-activated protein kinase (AMPK), pAMPK, 항체는 cell signaling technology사(USA)에서 구입하였고, proliferator activated receptor- γ (PPAR γ), CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α), β -actin 1차 항체 및 2차 항체는 Santa Cruz사(USA)에서 구입하였다. polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane은 Roche (Mannheim, Germany)에서 구입하였고, 그 외 언급하지 않은 시약들은 reagent-grade 로 구입하여 본 실험에 사용하였다.

2. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 페놀화합물의 함량은 folin-ciocalteu 방법으로 다음과 같이 실시하였다¹⁴⁾. 즉, 증류수 3.9 ml에 추출물 분획을 5~10 mg/ml 농도로 희석한 용액 100 ul 첨가하고 0.2N folin-ciocalteu 시약 500 ul을 혼합하여 실온에서 5분간 반응한 다음, 포화 탄산나트륨 500 ul을 가하고 30분간 더 반응시켰다. 725 nm 파장에서 흡광도를 측정 한 후, 총 페놀 함량을 gallic acid equivalent (GAE) mg/100 g dry weight 로 표시하였다.

총 flavonoid 함량은 Zhishen 변형 비색법으로 다음과 같이 실시하였다¹⁵⁾. 즉, 추출물 분획 500 ul에 증류수 2 ml과 5% 질산나트륨용액 150 ul를 혼합하고 실온에서 6분경과 후, 10% 염화알루미늄 용액 150 ul를 첨가하고, 다시 6분후, 4% NaOH 2 ml을 가한 다음, 증류수로 채워 5 ml로 희석하였다. 상기 용액을 완전히 섞은 후, 실온에서 15분간 방치한 다음, 510 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 총 flavonoid 함량은 rutin equivalent(RE) mg/100 g dry weight로 표시하였다.

3. DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능은 Blois 방법¹⁶⁾에 따라 측정하였다. 추출물 분획 100 ul에 0.1mM 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) 3.9 ml을 가하고 강하게 혼합한 후, 실온에서 60분간 반응하고 흡광도를 517 nm 파장에서 측정하였다. 대조군은 시료대신 ethanol을 동량 첨가하여 실험하였고, 라디칼 소거능은 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도를 구하여 다음과 같이 백분율로 표시하였다.

라디칼 소거능(%)

$$= [(대조군의 흡광도 - 실험군의 흡광도) / 100] * 대조군의 흡광도$$

4. ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼 양이온 소거능은 Kenneth 방법에 따라 다음과 같이 실시하였다¹⁷⁾. 즉, 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 최종농도로 혼합하여 실온에서 24시간 동안 암소에 방치하여 ABTS 라디칼 양이온을 형성시켰다. 이를 734 nm 파장에서 흡광도 값이 0.70±0.02 범위가 되도록 ethanol로 희석하여 반응에 사용하였다. 희석된 ABTS 시약 2 ml에 추출물 분획 50 ul를 혼합하고 실온에서 5분간 반응한 후, 734 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 라디칼 저해능(inhibition)은 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도를 구하여 다음과 같이 백분율로 표시하였다.

라디칼 소거능(%)

$$= [(대조군의 흡광도 - 실험군의 흡광도) / 100] * 대조군의 흡광도$$

5. FRAP 활성 측정

총 항산화 활성 평가는 Benzie 등의 FRAP 방법으로 평가하였다¹⁸⁾. 즉, 300 mM acetate 완충액(pH 3.6), 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine)/40 mM HCl, 20 mM ferric chloride을 10: 1: 1의 비율로 혼합하여 TPTZ 시약을

제조하였다. TPTZ 시약 1.8 ml에 추출물 분획 200 ul을 혼합하고 5분 경과 후, 594 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 총 항산화 활성은 Fe(II) 표준품(FeSO₄·7H₂O)으로 표준곡선을 작성한 후, 시료의 흡광도를 FRAP value (μM Fe(II))로 계산하였다.

6. 세포배양

본 실험에 사용한 세포주는 American type culture collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입한 마우스 전지방세포 3T3-L1을 사용하였다. 세포는 DMEM 배지 (10% BCS, 1% P/S 포함)를 처리하여 37° C, 5% CO₂ 배양기(MCO-15AC, SANYO, Japan)에서 75% confluence가 되도록 배양한 후, 배양액을 분화유도 배양액(0.5 mM IBMX, 2 μM DEX, 2 μg/ml insulin / 10% FBS)으로 바꾸어 POE 약물을 처리하고 2일간 배양하였다. 2일 후 2 μg/mL insulin / 10% FBS·DMEM배지로 교환하며, 약물을 이틀에 한 번씩 5번 처리하여 10일 동안 지방세포를 분화배양 하였다.

7. MTT 염색

3T3-L1세포를 96well plate에 2×10⁶ cells/ml 로 분주하여 안정화시킨 후 POE 추출물을 농도 별로 처리하여 24시간 배양한 후 배지를 제거하고 MTT 시약을 0.5 mg/ml 농도로 첨가하여 반응시켜 생성된 불용성 결정을 DMSO로 완전히 녹인 다음, microplate reader (TECAN Austria GmbH, Austria)를 이용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

8. Oil-Red O 염색

세포배양액 제거하고 D-PBS로 세척 후 10% formaldehyde가 포함된 cacodylate buffer로 4° C 에서 2 시간 고정하였다. 다시 증류수로 세척하여 oil-red O 염색시약으로 염색하고, 세척하여 염색된 세포를 현미경(CK2, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였으며 염색된 지방세포의 지방함량 측정을 위해 100% isopropyl alcohol 로 지방을 추출하여 분광광도계(Lambda UV/VIS, Perkin Elmer, USA) 로 510 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

9. Western blot

적정량의 단백질을 10~12% sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAGE에 분리한 후, PVDF membrane으로 전이시켰다. 단백질 전이된 membrane을 5% skim milk를 처리하여 비특이적인 단백질에 대한 blocking을 실시하고, C/EBPα, PPARγ, pAMPK/AMPK, β-actin 단백질 항체를 4° C에서 하룻밤 각각 반응 처리하였다. TBS-T로 세척한 후에 각각의 단백질 항체에 알맞은 2차 항체로 반응 하여 ECL 시약을 처리하여 X-ray film에 감광시켜 타겟 단백질 발현량을 관찰 하였다.

10. 통계방법

통계처리(Student's t-test)는 GraphPad Prism 5 program (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)을 사용하였고, 대조세포에 대한 유의성 검증은 $p < 0.05$ 수준에서 실시하였다. 밴드의 강도는 L process and multi gauge software (Version 2.01, Fujifilm)을 사용하여 분석 정량하였다.

결 과

1. 동굴레 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량과 항산화 효과

폴리페놀은 reactive free radical에 수소원자를 제공하여 안정한 non-radical을 만들어 항산화작용을 나타내며 항암 및 콜레스테롤 저하효과 등의 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있다. 또한 플라보노이드는 항균, 항암 및 항염증 활성 등이 있다¹⁹⁾. 본 실험에서 사용한 동굴레 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량과 항산화 활성 측정 결과는 Fig. 1-(A), (B)와 같다. 증자 동굴레의 ethyl acetate 추출물의 총 폴리페놀 함량은 50.83 ± 1.52 GAE mg/100g dry weight, 플라보노이드 함량은 17.05 ± 2.47 RE mg/100 g dry weight 으로 각각 나타났다.

항산화 효과는 DPPH 라디칼 및 ABTS 라디칼 소거능 분석으로, 총항산화능은 FRAP분석으로 측정하였다. DPPH 분석의 경우, 추출물 10 mg/ml 농도에서 $92.1 \pm 0.6\%$ 의 라디칼 소거능을 나타내었으며, ABTS 분석의 경우, 추출물 농도 5 mg/ml에서 $84.8 \pm 4.1\%$ 의 라디칼 양이온 소거 활성을 나타내었다. 추출물 농도 10 mg/ml에서 페놀화합물의 총 항산화능은 244.8 ± 9.0 μ M Fe(II)로 나타났다.

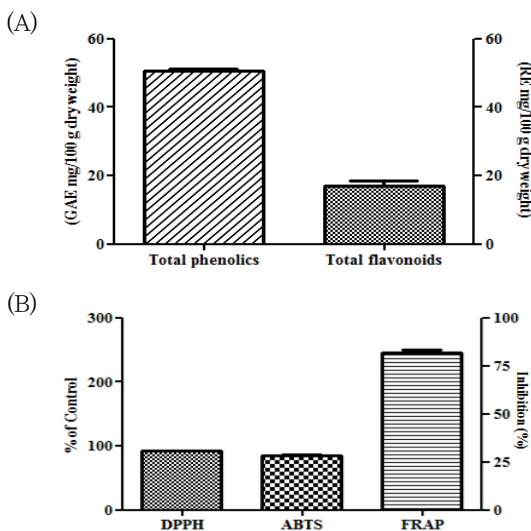


Fig. 1. Contents of polyphenol compounds and antioxidant activities in ethyl acetate extracts of *P. odoratum* on the condition for steaming. (A) Total flavonoids and phenolics contents were measured by folin-ciocalteu method and Davis method. (B) DPPH radical scavenging activity, ABTS inhibition and FRAP were measured using the Lambda 35 UV visible spectrophotometer, respectively. Data are presented as mean \pm SD. (n=3) from three independent experiments.

2. 동굴레 추출물의 세포 생존율에 미치는 영향

동굴레 추출물(POE) 처리가 3T3-L1 지방세포에 미치는 독성 영향을 알아보기 위해 3T3-L1세포에 0.05~1 mg/ml 농도의 POE를 각각 처리하고 MTT 염색법을 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과, 지방세포에 처리농도에서 세포 독성을 나타내지 않았다. 따라서 본 실험에서는 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 농도인 0.2 mg/ml 농도에서 이후 실험들을 진행하였다(Fig. 2).

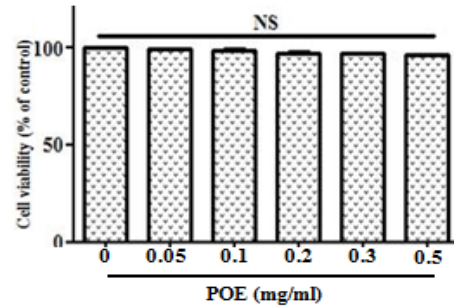


Fig. 2. Effect of POE on cell viabilities in 3T3-L1 cells. The data were expressed as the mean \pm SD. (n=3) from three independent experiments. NS, no significance.

3. 동굴레 추출물(POE)이 3T3-L1세포의 지방 축적에 미치는 영향

POE 처리로 지방분화 및 지방축적에 미치는 영향을 조사하기 위해서 oil-red O 염색법으로 세포 내 지방입자의 크기를 관찰한 결과, 0.2 mg/ml의 농도에서 동굴레 추출물의 지방축적 억제 정도는 동굴레 추출물을 처리하지 않고 용매만 처리한 대조세포에 비하여 유의적 수준($p < 0.05$)의 억제효과를 나타냈다(Fig. 3).

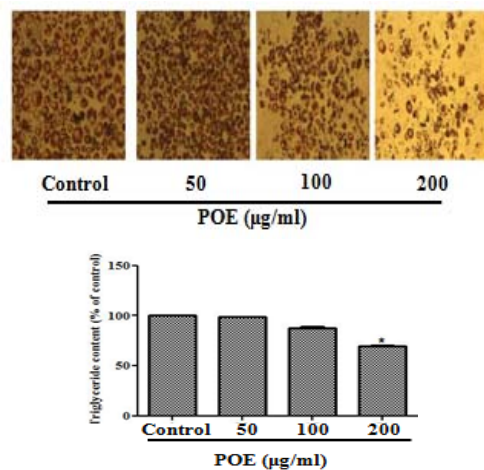


Fig. 3. Effect of POE on lipid accumulation in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were treated with 0.2 mg/ml POE. At 10th day after differentiation, cells were fixed and stained with oil red O dye. Images of representative cells captured with a microscope, scanned, and quantified by the lipid accumulation using spectrophotometer. The extent of lipid accumulation was expressed as the percentage of control. The data were expressed as the mean \pm SD. (n=3) from three independent experiments. * $p < 0.05$, significant between the vehicle control and POE treated cells

4. 등굴레 추출물의 3T3-L1 지방세포에서 분화 전사인자 및 에너지 항상성 단백질 발현에 미치는 영향

POE 처리가 3T3-L1세포에서 비만관련 지표인 초기 분화 전사인자 C/EBP α , PPAR γ 발현과 세포내 에너지 항상성 조절인자인 AMPK 인산화에 대한 영향을 확인하기 위해 western blot을 수행하였다. 그 결과, 3T3-L1 지방세포가 분화하는 동안 POE 처리 세포는 등굴레 추출물을 처리하지 않고 용매만 처리한 대조세포에 비하여 세포 내의 에너지 상태와 관련 있는 AMPK 인산화 활성 뿐 만 아니라 초기 지방세포 분화 및 지방합성 관련인자인 C/EBP α , PPAR γ 의 발현이 유의적인 수준($p < 0.05$)으로 억제되었다(Fig. 4).

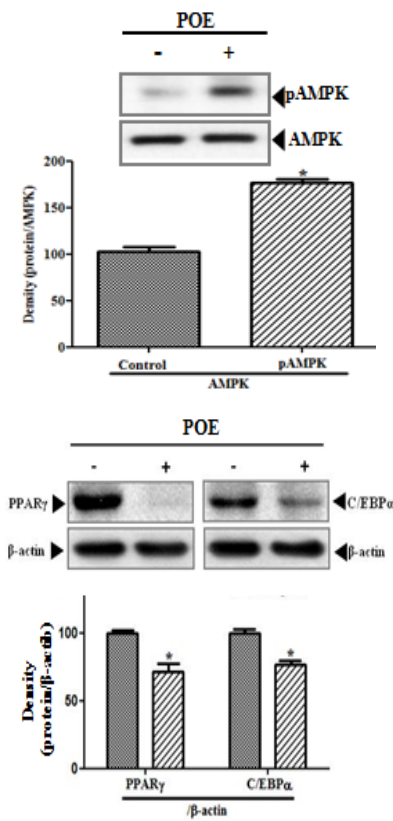


Fig. 4. Effects of POE on C/EBP α , PPAR γ and phosphorylation of AMPK protein expressions in 3T3-L1 cells treated with/without 0.2 mg/ml of POE. After 5 days, the protein expression levels of C/EBP α , PPAR γ and AMPK phosphorylation were measured using western blot analysis. Total proteins were isolated and subjected to SDS-polyacrylamide gels, followed by Western blotting using the indicated antibodies and an ECL detection system. β -actin, AMPK was used as an internal control. Densitometry was performed using L Process and Multi Gauge software (Version 2.01, Fujifilm), and represent the average densitometric analyses as compared with β -actin. The data were expressed as the mean \pm SD. (n=3) from three independent experiments. $p < 0.05$, significant between the vehicle control and POE treated cells

고찰

대사성질환인 제2형 당뇨병과 밀접한 관련이 있는 비만은 장기적인 치료와 관찰을 요구하는 만성질환이다²⁰. 비만은 예

너지 흡입과 소비의 불균형으로 체지방의 과잉 축적으로 체중 증가와 혈중지방양이 증가하며²¹, 고혈압, 제2형 당뇨병, 비알코올성 지방간질환, 다낭성 난소증후군, 고지혈증 및 관상동맥 심장질환과 같은 각종 질환의 발병에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다²².

비만은 한의학적 관점에서 그 원인을 주로 기허(氣虛), 담습(痰濕), 다식(多食) 등으로 보며 이는 주로 인체의 오장육부중 비장과 위장의 음식물이나 영양물질의 이동 기능의 실조로 인한 수습(水濕)이나 담탁(痰濁)의 형성으로 인한 발생된다고 본다. 동의보감에서는 ‘비만이 수명을 단축시키며, 섭취하는 곡기를 그 사람의 원기가 온전히 감당하지 못해서 생기기도 하고, 담이 원인이 되어 발병한다’고도 하였다²³. 비만의 치료법으로 허증(虛證)은 익기(益氣), 보신(補腎), 건비(健脾)시키며, 실증(實證)은 거습(祛濕), 화담(化痰), 활혈(活血), 이수(利水) 하는 방법을 주로 활용하였다²⁴.

증자 등굴레의 ethyl acetate 분획 추출물에는 폴리페놀과 플라보노이드가 존재하는 것으로 나타났다. Gallic acid와 rutin을 각각 표준물질로 사용 하였다. 폴리페놀과 플라보노이드는 식물이 갖고 있는 생리활성물질로 항산화 활성을 포함하는 다양한 기능을 나타낸다. 등굴레 ethyl acetate 분획 추출물의 경우에도 높은 DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 양이온 소거능을 나타냈으며, FRAP 활성 측정결과 총항산화력 역시 높은 수치를 보였다. 따라서 등굴레 ethyl acetate 분획추출물의 항산화능이 확인된 등굴레 추출물이 지방세포분화 및 지방축적 억제 효과를 나타 낼 것으로 예상되어 3T3-L1 지방세포의 세포생존율과 세포에 영향을 미치지 않는 0.2 mg/ml 농도에서 등굴레 추출물(POE)을 처리하여 지방세포의 분화정도와 지방축적정도를 실험하였다.본 실험에서 사용한 0.2 mg/ml 처리농도는 천연물 추출 효능검정 실험에서 통상적으로 처리하는 농도로 전 등²⁵의 논문을 참고하였다. 결과 3T3-L1 지방세포에서 대조세포에 비해 등굴레 처리 지방세포에서 지방생성 및 지방축적이 억제되었다. 중성지방은 영양상태, 또는 다양한 호르몬 (글루코코르티코이드, 에피네프린, 글루카곤등)의 자극에 의해 지방세포 내의 HSL (hormone sensitive lipase)이 활성화되어 지방산과 글리세롤로 분해되어 분비되는데 이때 분비되는 지방산이나 글리세롤의 수준으로 지방세포내의 지방분해 정도를 알 수 있다²⁶. 지방세포분화에 관여하는 C/EBP α , PPAR γ 발현은 지방세포분화에 중요한 역할을 하는 초기 전사인자 단백질이로 지방세포의 비대(hypertrophy)와 과형성(hyperplasis)을 유도한다²⁷. 주로 지방조직에 발현되는 PPAR γ 는 glucose 신진 대사를 조절하고 이것의 활성은 인슐린 감도를 증가시킨다²⁸. PPAR γ 와 C/EBP α 는 인슐린 신호전달과 관련된 유전자의 발현과 성숙한 지방세포에서 포도당과 지질대사를 조절하여 분화를 더욱 촉진시켜 분화과정을 완성시킨다²⁹. 따라서 0.2 mg/ml POE 처리한 3T3-L1 분화지방세포에서 이들 단백질 발현의 유의적 감소 결과는 등굴레 추출물이 지방세포에서 발현을 억제하여 지방축적 및 지방분화를 억제하는 것으로 보인다. 이전의 한약을 이용한 연구보고에서 C/EBP α , PPAR γ 발현억제가 지방세포분화능을 감소시켜 비만억제에 효과적이라고 보고된 바 있어 본 연구와도 일치하는 결과이다^{30,31}. 또한, AMPK는 세포내 에너지 항상성을 유지³²시키고 이것의 활성화는 포도당 이용 및 지방산 산화 증가와 간에서의 지방 합성 및 포도

당 신생억제 그리고 췌장에서 인슐린 분비를 조절하는 중요한 매개인자로 작용³³⁾ 한다.

본 실험에서 POE 처리가 지방축적을 저해할 뿐만 아니라, 체내 에너지 항상성 조절에 대한 영향을 확인하기 위하여 지방세포인 3T3-L1 세포에서 western blot을 통해 지방세포의 분화 초기전사인자인 C/EBP α , PPAR γ 의 발현 억제를 통하여 지방분화 억제에도 관여한다고 보여진다. AMPK 인산화 발현 정도를 측정한 결과, 대조세포에 비하여 POE 처리 세포에서 AMPK 인산화 단백질 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 이상의 결과를 종합하여 보면, POE 처리가 3T3-L1 지방세포에서 중성지방 생성 및 축적을 억제시키고, AMPK 인산화 수준을 증가시키므로서 세포내 에너지 항상성을 유지 시키므로 혈액 내 포도당 이용의 증가를 통해 혈당강하 효과가 있음을 확인함으로써 POE는 비만 뿐만 아니라 제2형 당뇨병을 효과적으로 예방하거나 개선시킬 수 있을 소재로 활용될 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 앞으로 더 세부적인 기전 연구 및 동물실험 등의 추가연구가 뒷받침 되어야 할 것으로 생각된다.

결론

본 연구에서 증자 등굴레 추출물의 3T3-L1 지방세포에서 분화억제 및 지질강하 효과를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 증자 등굴레 추출물(POE)는 총 폴리페놀과 프라보노이드 함량이 50.83 ± 1.52 GAE mg, 17.05 ± 2.47 RE mg을 각각 포함하고 있었다. DPPH와 ABTS 라디칼 소거능은 $92.1 \pm 0.6\%$, $84.8 \pm 4.1\%$ 로 각각 나타내었다. 페놀화합물의 총 항산화능은 244.8 ± 9.0 μ M Fe(II)로 나타내어 POE의 항산화력을 관찰하였다.
2. 증자 등굴레 추출물은 0.05 mg/ml~0.5 mg/ml 처리 농도에서 3T3-L1 세포에 독성을 나타내지 않았다.
3. POE의 Oil-red O 염색결과 0.2 mg/ml의 농도에서 지방축적 억제 정도가 대조세포에 비하여 유의적으로 지방축적 억제 효과를 보였다.
4. POE 처리가 3T3-L1세포에서 비만관련 지표인 초기 분화전사인자 C/EBP α , PPAR γ 발현이 유의적인 수준 ($p < 0.05$)으로 억제되었고, 세포내 에너지 항상성 조절인자인 AMPK 인산화 수준은 POE 처리 세포에서 대조세포에 비하여 유의적인 수준($p < 0.05$)으로 증가하였다.

이상의 결과에서 증자 등굴레 추출물(POE)의 우수한 항산화력을 관찰 할수 있었을 뿐만 아니라 지방세포 3T3-L1 에서 초기 지방세포 분화 관련인자인 PPAR γ 과 C/EBP α 의 발현억제 및 AMPK의 인산화 증가로 지방세포의 분화 억제 및 3T3-L1 세포내 지방합성 억제 효과가 관찰되어 항비만 예방 및 치료에 대한 후보 약물로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 대구경북지방중소기업청 주관 '경북지역 바이오 중소기업을 위한 기술개발지원사업의 사업비 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

Referenses

1. World Health Organization (WHO). Obesity and overweight in Media centre, 2011.
2. Korea Centers for Disease Control and Prevention, 2009 Korea national health and nutrition and examination survey. Ministry of Health and Welfare, 2010.
3. Korean Diabetes Association. Diabetes factsheet 2013. [9 screens]. Available from : URL : http://www.diabetes.or.kr/temp/diabetes_factsheet_2013111.pdf
4. Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol. 2001 ; 16 : 145-71.
5. Morrison RF, Farmer SR. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. J Nutr. 2000 ; 130(12) : 3116-21.
6. Park YW. Clinical guidelines of treatment of obesity in adults. J Korean Med Assoc. 2003 ; 46(4) : 345-6.
7. Lee CB. Daehan plant handbook, Seoul : Hyangmoonsa, 2985: 213-4.
8. Rural development administration national crop experiment station. Classification of Korean medicinal plant resources. Korea, 1990 : 243-4.
9. Ahn DG. Restorative of Korea. Yeollin Chakdle. Seoul : Korea, 1993 : 307-21.
10. Lee JH, Lee SR. Analysis of phenolic substance content in Korean plant foods. Korean J Food Sci. 1994 ; 26(3) : 310-6.
11. Kim KT, Kim JO, Lee GD, Kwon JH. Antioxidative and nitrite scavenging activities of *Polygonatum odoratum* root extracts with different steaming and roasting conditions. Korean J Food Preserv. 2005 ; 12(2) : 166-2.
12. Shu XS, Lv JH, Tao J, Li GM, Li HD, Ma. Antihyperglycemic effects of total flavonoids from *Polygonatum odoratum* in STZ and alloxan-induced diabetic rats. J Ethnopharmacol. 2009 ; 124(3) : 539-54.
13. Lan G, Chen H, Chen S, Tian J. Chemical composition and physicochemical properties of dietary fiber from *Polygonatum odoratum* as affected by different processing methods. Food Res Int. 2012 ; 49(1) : 406-10.
14. Singleton VL, Rossi JA Jr. Colorimetry of total

- phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965 ; 16(1) : 144-8.
15. Zhishen J, Mengecheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 1994 ; 64(12) : 555-9.
 16. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958 ; 25(2) : 1199-200.
 17. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 1998 ; 78(2) : 547-81.
 18. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Anal Biochem.* 1996 ; 239(1) : 70-6.
 19. Cha JY, Kim SY, Jeoung SJ, Cho YS. Effects of hesperetin and naringenin on lipid concentration in orotic acid treated mice. *J Life Sci.* 1999 ; 9(4): 389-94.
 20. Korean Society For The Study of Obesity Fact Sheet. 2010. [5 screens] Available from : URL : <http://www.kosso.or.kr/general/>
 21. Devlin MJ, Yanovski SZ, Wilson GT. Obesity: what mental health professionals need to know. *Am J Psychiatry.* 2000 ; 157(6) : 854-66.
 22. Barness LA, Opitz JM, Barness EG. Obesity: genetic, molecular, and environmental aspects. *Am J Med Genet A.* 2007 ; 143A(24) : 3016-34.
 23. Heo J. Donguibogam. Seoul : Bubin publishers, 2005 : 119, 334, 1145.
 24. Jo HG, Kim BT. Causes and treatment of obesity and literature review on stage. *Korea Inst Sci Technol Inform.* 1992 ; 1 : 61-71.
 25. Jeon SY, Park JY, Kim SO, Lee EL, Koo JS, Kim MR. Water extract of fermented new korean medicinal mixture (F-MAPC) controls intracellular adipogenesis and Glut-4 dependent glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes and L6 myoblasts. *Kor J Herbology.* 2014 ; 29(1) : 45-52.
 26. Slavin BG, Ong JM, Kern PA. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. *J Lipid Res.* 1994 ; 35(9) : 1535-41.
 27. Otto TC, Lane MD. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2005 ; 40(4) : 229-42.
 28. Rangwala SM, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism. *Trends Pharmacol Sci.* 2004 ; 25(6) : 331-6.
 29. Kwak DH, Lee JH, Kim DG, Kim T, Lee KJ, Ma JY. Inhibitory Effects of Hwangryunhaedok-Tang in 3T3-L1 Adipogenesis by Regulation of Raf/MEK1/ERK1/2 Pathway and PDK1/Akt Phosphorylation. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013 ; 2013 : 413906.
 30. Ikarashi N, Tajima M, Suzuki K, Toda T, Ito K, Ochiai W, Sugiyama K. Inhibition of preadipocyte differentiation and lipid accumulation by Oreganodokuto treatment of 3T3-L1 cultures. *Phytother Res.* 2012 ; 26(1) : 91-100.
 31. Ntambi JM, Kim YC. Adipocyte differentiation and gene expression. *Korean J Nutr.* 2000 ; 130(12) : 3122-6.
 32. Guo H, Zhao H, Kanno Y, Li W, Mu Y, Kuang X, Inouye Y, Koike K, Jiang H, Bai H. A dihydrochalcone and several homoisoflavonoids from *Polygonatum odoratum* are activators of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013 ; 23 (11): 3137-9.
 33. Zhang BB, Zhou G, Li C. AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab.* 2009 ; 9(5) : 407-16.