박사학위 청구논문
지도교수 구 자 현

Ginsenosides가 3T3-L1 지방세포 분화 및 중성지방 함량에 미치는 효과와 그 기전에 관한 연구

The Mechanism of the Effects of Ginsenosides on Differentiation and Triacylglycerol Content of 3T3-L1 Adipocytes

건국대학교 대학원

의 학 과

김 은 주

김은주의
의학박사학위 청구논문을 인준함

심 사 위 원

위원장 _____ 인

위 원 _____ 인

위 원 _____ 인

위 원 _____ 인

위 원 _____ 인

2004년 월
건국대학교 대학원

목 차

그 림 목 차

Ginsenosides가 3T3-L1 지방세포 분화 및 중성지방 함량에 미치는 효과와 그 기전에 관한 연구

건국대학교 대학원 의학과 박사학위과정

김 은 주

The Mechanism of the Effects of Ginsenosides on Differentiation and Triacylglycerol Content of 3T3-L1 Adipocytes

Kim Eunju

Doctor's Program in Department of Medicine

Graduate School of Konkuk University

Abstract

Obesity, the commonest nutritional disorder in modern societies, is associated with serious comorbidities including a high incidence of type II diabetes, cardiovascular disease, osteoarthritis, and the increased risk of many cancers. Changes in body weight are resulted from the difference between energy intake and expenditure that can be regulated by several factors.

Ginsenosides are the components of saponin extracted from ginseng and they are known to possess various physiological and pharmacological activities. One of these activities is related to decrease lipid levels in plasma.

In this study, the effects of ginsenosides on fat metabolism were examined in 3T3-L1 adipocytes cultured in high fatty acid conditions. The effects of ginsenosides on 3T3-L1 preadipocyte differentiation were also examined. Our results showed that various ginsenosides decreased the triacylglycerol (TAG) level in 3T3-L1 adipocytes and up-regulated the transcription of leptin which is known for lowering TAG content in adipocytes through transcriptional activation of the crucial genes involved in peroximal and mitochondrial β-oxidation. To elucidate the mechanism of the effects of ginsenosides on lowering TAG content in 3T3-L1 adipocytes, we examined whether ginsenosides modulate the expressions of other adipokines besides leptin and transcription factors related to control of energy expenditure process because adipokines

regulate adipocyte mass and increased energy expenditure may consume much TAG in adipocytes. In this study, ginsenosides increased the expressions of mRNAs for leptin, adipsin, and TGFβ and their corresponding proteins in 3T3-L1 adipocytes, resulting in decreased TAG content. In addition, ginsenosides also increased intracellular cAMP level and up-regulated the expression of PPAR δ, which is known to increase the transcription of target genes of energy expenditure.

In conclusion, ginsenosides could control TAG content in differentiated adipocytes by up-regulation of adipokines including leptin and transcription factors related to fat burn and these processes might be mediated by cAMP-related signaling.

I. 서 론

인류가 풍요로운 사회로 점점 발전해 감에 따라 비만이 심각한 질병 중의 하나로 등장하게 되었고 이에 세계보건기구 (WHO)는 비만을 치료해야 할 질병의 대상이라고 선언하였다 (Cummings와 Schwartz, 2003). 비만은 열량의 섭취와 소비의 불균형으로 발생되는 대사성 질환이며, 지방조직의 증가 상태로 정의된다 (Kopelman과 Stock, 1998). 비만은 서구사회에서 가장 흔한 영양장애일 뿐만 아니라, 최근 우리나라에서도 경제발전에 의한 식생활의 향상과 생활 방식의 서구화로 비만의 빈도가 급속히 증가하는 추세에 있어 그 치료와 예방에 대한 중요성이 크게 증가하였다. 비만은 심리적으로 개인을 위축시킬 뿐만 아니라 사회적으로도 여러 성인병의 발병 위험을 증가시키는 중요한 요인이다. 실제로 비만인 사람은 그렇지 않은 사람에 비하여 고혈압, 혈중 콜레스테롤 상승, 당뇨병, 신장질환, 뇌졸중, 동맥경화증, 지방간, 관절염 및 각종 암의 발병률이 훨씬 높다 (이홍규, 1992). 평균 사망률도 비만인 사람이 남자는 약 45%, 여자는 약 40% 더 높다. 이처럼 비만이 다양한 대사성 질환의 유병률을 증가시키고 실제 체중감소가 이러한 질환의 발병률을 현격히 감소시킨다는 사실로부터 지방을 많이 함유하는 지방세포가 이러한 현상을 매개할 것이라고 유추해 볼 수 있다. 과거에는 지방조직이 칼로리를 초과 섭취했을 때 남는 에너지를 triacylglycerol (TAG)의 형태로 저장하고 필요할 때 방출하는 단순한 에너지 저장을 위한 기관으로만 생각했었다. 그러나 최근에는 지방조직이 우리 몸의 주 에너지원인 지방을 합성, 저장하며 이를 분해하고 필요에 따라 다른 기관에 에너지를 공급하는 역할을 담당하고 있을 뿐만 아니라 여러

호르몬, 사이토카인 (cytokine), 성장요소들을 분비하는 내분비 역할까지 하여 체내의 에너지 항상성을 조절하는데 있어 중추적인 기능을 담당하는 것으로 밝혀졌다 (Ashima와 Flier, 2000). 따라서 지방세포의 증식과 지방세포에서 분비되는 물질들에 대한 이해와 그 생체 내 조절 메카니즘에 대한 규명이 비만 및 그로 인한 여러 질병들을 이해하고 효과적인 치료제를 개발할 수 있는 밑거름이 될 것으로 여겨지고 있고 이에 따라 지방세포 조절에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

한편, 비만과 그 관련 질환에 대한 관심이 고조되면서 비만 치료제로 개발될 수 있는 물질들을 탐색하는 일이 중요하게 되었는데 화학 합성 물질들인 경우 부작용이 많아 부작용이 적고 안전도가 높은 생약들의 개발이 더 절실하게 되었다. 그 중 인삼은 전세계적으로 건강 식품과 의약품으로 높은 인기를 차지하고 있는데 1854년 미국의 Garriques가 인삼으로부터 glycoside를 분리하여 panaquilon이라고 명명하면서 최초의 과학적인 연구가 시작되었다. 그 후 구 소련의 Brekhman이 인삼의 유효성분인 사포닌의 효능을 주장하였고, 안심 사포닌 성분은 1964년 Shibata가 인삼에 함유된 glycoside란 뜻으로 ginsenoside라 하고, 박층크로마토그래피 (TLC)에서 분리된 이동거리 순으로 ginsenoside-Ro와 ginsenoside-Ra, -Rb1, -Rb2, -Rc, -Rd, -Re, -Rf, -Rg1, -Rg2, -Rg3 및 -Rh 등으로 명명하였다. 이러한 사포닌 성분들이 다양한 약리 효능을 가지고 있음이 점차 밝혀지고 있는 가운데 인삼 사포닌 ginsenoside들이 생체 내 지질대사와 당뇨병에도 특별한 효능이 있다는 연구 결과들이 발표되었다. 인삼사포닌류가 쥐의 간 mitochondria에 의한 지방산 산화와 cytosol에 의한 지방 합성을 다같이 촉진하고 간장, 뇌, 지방 조직 및 혈청에서도 지방 합성을 크게 촉진하였다는 연구 (주충노 등, 1977)와 콜레스테롤이 다량 함유된 사료를 토끼에게

투여하여 홍삼이 고지혈증 (高脂血症)에 미치는 효과를 조사한 결과, 지질대사와 관련된 각종 효소의 활성이 촉진되어 혈중콜레스테롤 함량이 저하되고 고지혈증으로 야기되는 죽종 형성이 예방되었다는 연구가 발표되었다 (주충노, 1980). 인삼 사포닌, 특히 Rg1이 지질대사 개선에 매우 유효하여 동맥경화를 예방시켜준다는 임상 실험 및 당뇨병으로 인하여 2차적으로 고지혈증을 일으킨 67명을 대상으로 홍삼분말을 투여한 임상 실험에서 혈중 콜레스테롤, TAG 및 혈소판 점착이 저하되었고, 고밀도 지질단백질이 증가되었다는 연구가 발표되었다 (Yamamoto와 Uemura, 1984). 또한 당뇨병 환자에게 홍삼을 투여하면 환자에 따라 혈당량이 저하되고, 인슐린 치료환자는 투여량 감소조절이 가능하며 특히, 자각증상으로 현기증, 어깨결림, 흉부압박감, 갈증, 전신 권태감, 머리가 무거운 증상 등이 크게 개선되었다는 임상연구 결과와 고려홍삼이 모세 혈관의 혈액순환을 촉진시켜 당뇨병 환자가 흔히 걸리기 쉬운 동맥경화 등의 증상을 예방한다는 연구 결과 및 홍삼으로부터 다식 (多食), 다음 (多飮), 다뇨 (多尿), 뇨당 (尿螳) 등의 당뇨증상이 크게 개선되었다는 연구 결과가 보고되었다 (Yokozawa 등, 1985). 최근 사포닌의 대사물에 관한 연구가 진행되면서 체내에서 protopanaxadiol type 사포닌은 장내세균인 *Prevotella oris*에 의해 compound K (CK), IH902, IH903로 대사된다는 것 (Karikura 등, 1991; Akao 등, 1998)이 밝혀졌으며, 이러한 인삼 사포닌의 약효는 사포닌의 형태보다는 그 장내세균 대사물이 활성본체임이 시사되었다. 한편, 비만과 관련하여 실험 동물에서 홍삼복합체를 투여하여 유의한 체지방 감소를 보였다는 보고 (주종재, 1998)와 비만 환자를 대상으로 홍삼복합체를 4주간 투여한 결과 부작용 없이 체지방의 감소를 볼 수 있었다는 보고 (오승준 등, 1999), 홍삼복합체를 비만 환자를 대상으로 투여하였을 때 선택적인 체지

방 감소가 나타났다는 보고 (오승준 등, 2000) 및 고지방 식이 동물에 백삼과 홍삼을 투여하였을 때 유리콜레스테롤과 TAG 수치가 감소하였다는 보고 (성종환 등, 2003) 등이 있어 인삼 성분들이 새로운 비만치료제로 사용될 수 있다는 가능성을 보여 주었으나 이들이 에너지 대사 촉진 면에서 어떻게 작용하는가에 대해서는 아직 밝혀진 바가 없다. 따라서 새로운 비만치료제로 개발 가능한 인삼 성분들의 그 정확한 작용 기전을 밝히는 일은 꼭 필요하다고 판단되며 이에 본 연구를 수행하게 되었다.

인간은 동력원으로서의 에너지를 음식물로부터 획득한다. 우리 몸은 음식물을 섭취한 후 에너지 축적을 가능한 한 많이 하고 반대로 에너지 소비는 될 수 있는 대로 적게 하도록 구성되어 있는데 그 보존에너지의 가장 대표적인 형태가 지방이다. 인간 및 포유동물의 지방조직은 백색지방조직 (White adipose tissue, WAT)과 갈색지방조직 (Brown adipose tissue, BAT)이라는 기능적으로 다른 두 종류의 지방조직으로 나뉘며 이들의 주 기능은 각각 에너지 저장과 에너지 소모이다 (Klaus, 2004). 백색지방조직은 전신에 넓게 분포하며 에너지를 TAG의 형태로 저장하여 필요에 따라서 지방산으로 전신에 재공급하는 역할을 하는 곳으로 중배엽으로부터 유래한다. 다른 중배엽 유래의 조직과는 다르게 지방세포에서는 음식물 섭취 등 환경적인 요인에 의해 그 크기가 변하기 때문에 지방세포 용적이 늘어나는 것은 인간의 발육, 발달 상의 한정된 시기 뿐 아니라 식사나 운동 정도에 따라 평생 일어난다. 이렇게 체내에서 가장 큰 유연성을 가지는 지방조직의 특성으로 인해 지방세포는 직경을 20배까지 증가시킬 수 있으며 그 결과 세포 용적은 수천배까지 증가된다 (Kim과 Choi, 1992; 송영득, 1999). 사람에서 상대적 체지방 용적의 정상 범위는 남자의 경우 12 20%이고 여자의 경우 20 30%이며, 각각 25%와 33% 이상일 경우 병적인 수준으

로 여겨지고 있다 (Bray, 1998). 이같은 지방세포 용적 변화는 지방세포의 체적 증가 (hypertrophy)와 지방세포의 세포수 자체 증가 (hyperplasia)에 기인하는데 이는 지방 합성 (lipogenesis)과 지방 분해 (lipolysis) 그리고 지방세포 분화 (adipogenesis)와 지방세포 사멸 (apoptosis) 등의 과정을 통하여 엄격히 조절된다 (Klaus, 2001).

태생기 mesoderm 기원의 stem cell에서 전구지방세포, 근육 및 관절세포가 분화된다. 이런 전구지방세포에서 형태학적으로나 생화학적으로 완전히 성숙된 지방세포로 분화되는 과정은 호르몬, 사이토카인 그리고 전사인자 등의 여러 인자들의 상호 조절을 통해 이루어진다 (Gregoire 등, 1998). 지방세포는 4가지 단계로 증식되는데 우선 지방세포로서의 형질을 나타내는 미분화 세포 (전구지방세포, preadipocyte)가 형성되며 이 전구지방세포가 증식하고 증식된 세포가 분화한 후 분화한 지방세포에 지방이 축적되어 성숙한다. 전구지방세포의 세포주기 조절은 tumor suppressor retinoblastoma protein (Rb)의 phosphorylation에 의해 이루어지며 다음으로 CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP) family 및 peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) family 등의 전사인자들이 분화과정을 협동적으로 촉진하여 지방조직-특이 유전자들의 발현을 유도하고 성숙한 지방조직 형질을 나타나게 한다. 즉, 세포가 cAMP 같은 adipogenic signal에 접하게 되면 먼저 전사인자 C/EBPβ와 δ의 발현이 유도되고 이들이 adipogenesis의 주요 조절자인 PPARγ2의 발현을 유도하여 분화를 진행시킨다 (Camp 등, 2002; Hwang 등, 1997). 분화 과정에 관여하는 전사인자들 중 가장 잘 알려진 두 가지인 C/EBP family와 PPAR family는 지방세포 유전자 조절 부위와 상호 작용함으로써 지방세포 분화를 촉진시킨다. C/EBP family는 DNA binding을 매개하는 basic domain과 leucine zipper

dimerization domain을 가지는 bZIP class protein에 속한다 (Hurst, 1994). 분화 과정 초기에 C/EBPβ와 δ가 바로 발현이 증가되었다가 분화 말기에 감소하는데 isobutylmethylxanthine (IBMX)과 dexamethasone (DEX) 같은 분화 유도 시약들이 각각 C/EBPβ와 δ의 발현을 유도한다 (Yeh 등, 1995). 이들의 기능은 C/EBPα와 PPARγ를 유도하는 것으로 C/EBPα는 분화 말기에 여러 지방조직 특이성 유전자들이 발현되기 전에 증가하여 glucose transpoter-4 (GLUT-4) 등의 유전자들의 발현을 증가시킴으로 insulin의 대사 작용을 촉진하여 에너지 항상성을 조절하며 (Long과 Pekala, 1996), PPARγ는 adipogenesis의 key regulator로서 leptin, fatty acid synthase (FAS) 및 lipoprotein lipase (LPL) 등의 adipogenic gene들의 발현을 조절한다 (Hwang 등, 1997). PPAR family는 지방산의 산화에 관여하는 진핵세포내에 공포모양으로 존재하는 미세기관인 peroxisome에서 클로닝된 peroxisome proliferator의 수용체이다 (Issemann과 Green, 1990). PPAR은 핵내에 위치하는 핵내 수용체이고, 스테로이드 호르몬 수용체나 활성형 지용성 비타민 수용체와 유사한 구조를 가지며 약물투여에 의하여 유전자 전사 활성화를 매개하는 DNA 결합성 전사인자로 작용한다. 수용체 분자의 중앙에 DNA 결합도메인이 있고, 카르복시말단에 리간드 결합 도메인이 있으며, 아미노산 배열이 다른 수용체와 비슷하게 잘 보존되어 있다. PPAR은 9-cis retinoic acid 수용체인 retinoid X receptor (RXR)와 heterodimer를 형성한다 (Schoonjans 등, 1996). PPAR은 α, δ, γ 등의 여러 아형이 알려져 있는데 그 중 PPARα는 지방산 산화에 관여하고 지질강하제인 fibrate계 약물이 PPARα에 결합하는 리간드이며, PPARγ는 지방 분화에 관여하여 leptin을 포함한 지방 대사 관여 유전자들의 발현을 조절하고 15-deoxy-Δ12,14-prostagladin J2와 당뇨병 치료제인

thiazolidinedione 등의 리간드와 결합한다 (Hwang 등, 1997). 뿐만 아니라 PPARγ는 미토콘드리아에도 영향을 미친다. 지방산 수송단백질인 carnitine palmitoyl transferase (CPT) gene의 발현 증가 및 acyl CoA synthase들의 발현 증가로 미토콘드리아 내로의 지방산 흡수가 증가되고, peroxisome과 mitochondira에서 지방산의 β-oxidation을 증가시켜 궁극적으로 지방산 및 TAG의 합성을 감소시키며 very low density lipoprotein (VLDL) 생성도 감소시킨다. 더욱이 mitochodrial mass를 증가시키고 따라서 미토콘드리아의 지방산 산화를 더욱 촉진한다. 또한 PPARγ 리간드에 의해 미토콘드리아의 단백질인 uncoupling protein (UCP)이 활성화된다. 한편, 지방 축적과 지방을 연소시키는 것을 균형잡아 주는 세포 수용체 PPARδ는 지방이 정상 세포 기능을 유지하는데 사용하거나 혹은 열을 생산하기 위해 연소되어지는 속도를 조절하는 것으로 알려졌는데 이들은 새로운 비만 치료제의 개발 뿐만 아니라 제2형 당뇨병, 심혈관계 질환 (cardiovascular disease), 고혈압과 동맥경화 (atherosclerosis)와 같은 비만 연관 질환의 치료제 개발에도 도움이 될 것으로 전망되고 있다 (Wang 등, 2003). 이들 전사인자 외에 adipocyte determination and differentiation-dependent factor 1/sterol regulatory element binding protein 1 (ADD1/SREBP1)이라는 전사인자도 C/EBPα와 PPARγ의 발현을 조절하여 adipogenesis에 관여하는 것으로 밝혀졌는데 이들은 basic helix-loop-helix (bHLH) class에 속하며 E-box 및 SRE에 결합하여 LPL과 FAS 등의 유전자 발현을 유도하고 지방산 합성 (fatty acid synthesis)과 유입 (uptake)을 증가시키며 지방조직내로의 지질 축적을 증진시키는 것으로 보고되었다 (Kim과 Spiegelman, 1996; Kawabe 등, 1996).

한편, 지방세포의 내분비 기관으로서의 작용과 관련하여 분화된 성숙한

지방세포가 tumor necrosis factor-α (TNF-α), leptin, plasminogen activator inhibitor-1, angiotensinogen, adiponectin, resistin 등의 호르몬과 cytokine을 분비하여 지방 대사, 급식 행동, 지혈 작용, 혈관 긴장도, 에너지 균형, 인슐린 감수성 등의 생리적으로 중요한 조절 기능을 하는 것으로 밝혀져 이들을 adipokines라고 명명하기에 이르렀다 (Ashima와 Flier, 2000). 최초로 지방세포가 내분비 기관으로 역할을 한다는 것을 증명해 준 물질은 leptin으로 비만 및 인슐린저항성 당뇨병의 표현형을 갖는 실험동물인 *ob/ob* 생쥐에서 클론되었다. Leptin은 시상하부의 포만 중추를 자극하는 식욕조절인자이며 발열 반응과 활동량을 증가시키고 섭취량을 감소시켜 체중과 체지방량을 감소시키는 생리적 작용을 가지고 있다 (Halaas 등, 1995; Andrea 등, 2000). Leptin은 저장된 에너지 양에 정비례하게 지방조직에 있는 세포들에 의해 만들어지고 혈관으로 분비된다. 혈액을 통해 뇌하수체에 전달된 leptin은 뇌와 상호작용을 일으켜서 행동을 유발하는 경로를 통해 식욕을 억제하는 역할을 하고 남은 에너지를 산화시키는 것을 증가시킨다 (Montague 등, 1997). 또한 leptin은 acyl-CoA oxidase (ACO)와 carnitine palmitoyltransferase (CPT-1)등의 지방산 산화에 관여하는 효소들의 발현을 증가시켜 지방 조직에 있는 지방의 산화를 증진시키고 UCP의 발현을 통해 열발생을 증가시켜 에너지를 소모시켜 버리는 작용을 하며 (Flier, 1997; Zhou 등, 1997), apoptosis를 통해 adipocytes를 제거한다 (Qian 등, 1998; Della-Fera 등, 2001). 이러한 leptin의 체중감소 효과는 선택적으로 지방 조직에만 영향을 주는 것으로 알려졌고 (Soukas 등, 2000), leptin이 지방의 형성을 방해하고 지방의 소모를 촉진함으로써 혈액내의 포도당 농도를 낮추게 되어 인슐린을 생산하는 세포의 기능을 향상시키며 인슐린에 대한 세포의 민감성을 증가시킴으로 제2형 당뇨병을 개선시킨다는

것이 발표되었다. (Shimabukuro 등, 1997). 또한 성숙한 지방세포에서 분비되는 사이토카인인 TNFα는 지방세포의 열대사 (thermometabolism), 지방 합성, 지방 분해에 관여하여 체지방량 (body fat mass)을 조절하는 작용을 하며 leptin의 생성과 분비를 증가시키고 성숙한 adipocyte의 dedifferentiation과 adipocyte apoptosis를 유도한다 (Porras 등, 1997).

한편, 또 하나의 지방 조직인 갈색지방조직은 체내의 열생산 기능이 고도로 발달해 있는 기관으로 갈색지방조직 1 kg당 300 ~ 400 W의 열을 생산한다. 이들은 사람과 포유동물의 체온유지를 위한 열 생성과 동면동물의 각성 및 과식 에너지 소모 등의 기능을 하는 것으로 알려졌다 (Klaus, 2004). 일반적으로 생체의 체중 유지는 전적으로 에너지 섭취와 소모 사이의 균형에 의해 결정되고 에너지 섭취는 음식물 섭취에 의해 결정되며 에너지 소모는 육체적 운동 외에 열생성 (thermogenesis)과 기초대사량 등의 여러 요인에 의해 결정된다. 체내의 대부분 대사 회로들은 ATP를 소비하고 열을 발생시키는데 기여한다. 전자 전달계가 미토콘드리아 밖으로 H^+를 내보내면 양성자 전위차가 형성되어 미토콘드리아 내막을 사이에 두고 electric potential과 chemical H^+ gradient가 형성되고 이런 전자화학 전위차이가 ATP 합성을 유도한다. 이와 같은 미토콘드리아 연계 (coupling)는 요구되는 에너지 양에 따라 산화율을 적응시킨다 (Erlanson-Albertsson, 2003). 이와 반대로 비연계 (uncoupling) 과정은 양성자 전위차를 소모시킬 수 있는 여러 요소들에 의해 자극되어 열을 발산하는 열생성에 기여한다. 이러한 양성자 누출에 관여하는 물질은 미토콘드리아 내막에 존재하는 uncoupling protein (UCP)으로 1에서 5까지의 아형이 있으며 (Boss 등, 2000; Erlanson-Albertsson, 2002), 동물에서 휴식시 에너지 소비의 25%가 바로 UCP의 기여에 의한 양성자 누출에 의해 발생된다 (Ricquier와

Bouillaud, 2000). 갈색지방의 활성화는 중추신경계 및 개개 세포에 분포하는 자율신경섬유에 의해 조절된다. 신호물질이 adrenergic receptor에 결합되면 cAMP 형성을 자극하여 세포내 지방을 분해하고, 갈색지방세포 내에 존재하는 많은 미토콘드리아에 의해 지방산을 산화시킨다. 즉, 호르몬이 세포 표면에 결합하게 되면 세포 내부에 신호 전달 물질인 cAMP가 생성되게 되며, cAMP-dependent protein kinase (PKA)에 의해서 일련의 반응들이 일어난다 (Holm, 2003). PKA가 주로 작용하는 단백질에는 지방산을 방출하기 위해서 지방 저장 물질인 TAG를 분해하는 호르몬-감수성 lipase (hormone-sensitive lipase)와 UCP 유전자의 발현을 촉진시키는 cAMP response element binding protein (CREB)이 있다 (Palou 등, 1998). CREB는 지방세포의 발달 조절 과정에도 영향을 미친다. (Reusch, 등. 2000). 백색지방세포에서 PKA의 주요 기질은 TAG 알갱이 표면에서 관찰되는 perilipin이라는 단백질이다. 이 perilipin의 위치와 인산화 정도에 따라 호르몬-감수성 lipase가 TAG 알갱이 표면에 접근하는 것이 조절되며 PKA에 의한 지방 분해 (lipolysis)가 이루어진다 (Souza 등, 2001; Clifford 등, 2000). 갈색지방세포에서 PKA는 미토콘드리아 생합성, 갈색지방세포 조직의 분화와 성장, 그리고 UCP 유전자의 발현을 자극하는 triiodothyronine 호르몬의 양을 증가시키는 type-II thyroxine deiodinase 활성을 자극하는 데에 관여하는 것으로 생각되고 있다 (Cummings 등, 1996). 한편, 백색지방조직도 체내 지방량 조절에 관여한다. 체지방량은 지방세포내에 TAG의 축적과 분해 사이의 균형에 의해 결정되며 지방의 축적은 LPL이 매개된 혈중 지질의 농도와 포도당으로부터의 직접적인 지방산 합성에 의존한다 (Kumar 등, 1999). 인간의 전체 체지방 생성의 40%는 지방조직에서 생성되고 이러한 지방조직에서 지질 형성의 증가가 비만을 초래한다. 따라서

지방조직 자체에서 지질을 형성하는 대사과정이 교정되지 않고 칼로리 제한만으로는 비만을 조절할 수 없다. 호르몬 감수성 lipase에 의해 지방에서 유리된 지방산은 재에스테르화되거나 산화되어 다른 조직으로 보내지고, 지방산의 산화는 갈색지방조직의 UCP1을 통해 열생성에 기여한다. 백색지방에서 발현되는 UCP는 갈색지방에 비해 2% 정도 밖에 안되는 미약한 양이지만 이런 적은 양의 etopic UCP1만으로도 백색지방 미토콘드리아의 산화적 인산화를 비연계시켜 지방축적을 감소시켜준다. 따라서, UCP에 대한 기능을 촉진시키는 물질들은 결국 에너지 소모 및 지방의 산화를 통해 체중을 조절하여 대사성 질환의 기본적 치료제로 개발될 수 있을 것으로 기대된다. 실제로 비만치료제 개발을 위한 전략은 지방 흡수 저해와 식욕 억제, 그리고 에너지를 열로 방출하는 크게 세가지 방법으로 구별된다. 소장에서 먹은 음식물 중의 지방 흡수를 방해하는 약리기전을 가진 물질로는 Xenical, Orlistat 등이 있다. 이 물질은 pancreatic lipase inhibitor로서, 음식물 중의 TAG가 소장 내에서 분해, 흡수되지 못하게 하여 섭취된 지방의 약 30% 정도가 배설되도록 한다 (Reddy와 Chow, 1998). 식욕을 억제하는 방법으로 쓰이는 물질에는 신경 전달 물질의 분자적 기작을 이용하여 개발된 Merdia 또는 Reductil로 불리는 약물이 있다. 이 약물은 무기력증, 불면증, 그리고 혈압과 심장장애 등의 부작용이 많다. 최근에 주목받고 있는 또 다른 방법은 체내로 들어온 과량의 에너지를 지방으로 저장하지 않고 열로 방출하는 방법인데, 이와 관련된 유전자로는 β3-adregenic receptor와 UCP family 그리고 UCP의 발현과 활성화를 조절하는 유전자로 PKA, CREBP, PPARs, thyroid hormone receptor (TR), retinoic acid receptor (RAR) 등이 알려져 있다 (Cassard-Doulcier 등, 1993; Kozak 등, 1994; Susulic 등, 1995; Champigny 등, 1991; Cummings 등, 1996). 특히, PPAR 유전자와

PPAR과 물리적으로 결합하는 PPARγ coactivator-1α (PGC-1α)는 최근 연구를 통해 새로운 비만치료제 개발 target으로 대두되고 있으며, 특히 PPAR에 특이적인 리간드의 개발은 비만치료제 뿐만 아니라 비만에 의해 유도되는 많은 만성 대사성 질환의 분자적 기작을 규명할 수 있도록 하고 있다 (Walczak와 Tontonoz, 2002). PGC-1은 에너지를 저장하는 세포들을 에너지를 발생하는 세포들로 전환시키는 유전자들의 형질 발현을 유도한다. 보조활성화인자는 전사인자에 결합하는 단백질로 한 보조활성화인자는 여러개의 전사인자에 결합하여 작용함으로써 서로 다른 유전자를 조절할 수 있고 하나의 경로에 관련된 여러 단계를 조직화할 수 있다. PGC-1은 여러 조직에서 서로 다른 인자들과 작용하여 산화과정이 더욱 왕성해지도록 하는 방향으로 대사과정을 변화시킨다 (Puigserver 등, 1998; Wu 등, 1999). PGC-1은 심장, 신장, 갈색지방세포, 그리고 뇌에서 발현되며 전사인자인 PPARγ에 결합한다. PGC-1이 백색지방세포에서 발현될 때는 미토콘드리아의 양이 두 배로 늘어나게 하고 전자전달계 단백질 유전자를 비롯한 미토콘드리아 유전자의 발현을 유도한다. 그래서 결국 에너지를 저장하는 세포인 백색지방세포를 에너지를 소비하는 갈색지방세포로 전환시켜 버린다 (Lin 등, 2002).

본 연구에서는 인삼 사포닌이 *in vivo*에서 선택적 TAG 감소 효과를 나타내는 것에 착안하여 고지질 조건에서 지방세포를 배양하였을 때 ginsenosides가 TAG 함량이나 지질 대사 관련 유전자 발현을 변화시키는지 알아보고 한편으로 지방세포의 분화에도 영향을 주는지 알아보기 위해 분화 관련 유전자의 발현과 TAG 함량 변화를 중심으로 관찰하였고 본 실험 결과를 통해 ginsenosides가 비만 치료제로 사용될 수 있을지에 대한 근거 자료를 제시하고자 하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에 사용된 실험세포는 3T3-L1 전구지방세포 (CL-173)를 American Type Culture Collection (ATCC, USA)로부터 분양 받아 사용하였고, 배양 배지는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GibcoBRL, USA)을, 배지에 첨가한 지방산 (oleic acid와 palmitic acid)은 sodium salt 형태로 Sigma사 (USA)에서 구입하였다. 실험대상 인삼성분인 총사포닌, ginsenoside-Rb1, -Rb2, -Re, -Rg1, -Rg2, -Rh1, -Rh2 및 CK 분획은 한국인삼연초연구원 (Korea)으로부터 제공받았으며 대조군인 gemfibrozil은 Sigma사 (USA)에서 구입하였다.

Fetal bovine serum (FBS), penicillins-streptomycin, sodium bicarbonate, trypsin-EDTA 및 세포분화 유도에 사용된 시약들은 Sigma 사 (USA) 제품을 구입하여 사용하였다.

Total RNA는 TRIzol Reagent (Sigma, USA)와 RNeasy mini kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 추출하였고, Southern blot hybridization은 digoxigenin (DIG)-high prime labelling Kit II (Roche, Germany)를 구입하여 실시하였다. Reverse transcription-polymerase chain reation (RT-PCR)에 사용된 reverse transcriptase는 NEB사 (USA)의 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMLV-RT)를 사용하였고 RNase inhibitor는 Promega사 (USA)에서, Taq polymerase는 Genemed사 (USA)에서 구입하였다. Semi-quantitative RT-PCR에 사용한 leptin,

UCP, ACO, FAS, SREBP1, PPARδ, PPARγ, C/EBPα, adipsin, TGFβ 및 β-actin의 primer들은 Cosmo사 (Korea)와 Bioneer사 (Korea)에 제작을 의뢰하여 사용하였다. Real time RT-PCR에 사용한 leptin, CREB 및 GAPDH TaqMan probe와 primer들은 ABI사 (USA)의 Assays-on-Demand™ gene expression products를 사용하였다.

2. 세포 배양

세포는 5% CO_2, 37℃ 배양기에서 3T3-L1 전구지방세포를 DMEM (10% FBS, penicillins-streptomycin)에 72시간 배양한 후 세포가 90 100% confluent 해졌을 때 (D-0일) 0.5 mM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX), 1 μM dexamethasone (DEX)과 10 μg/ml insulin이 포함된 DMEM (10% FBS)으로 교환하여 분화를 유도하였으며 그 후 매 2일마다 10 μg/ml insulin이 포함된 DMEM (10% FBS)으로 교환하였다. 고지질 조건에서 지방세포에 미치는 ginsenosides의 효과를 보기 위하여 분화 6일 후 세포를 PBS (phosphate buffered saline)으로 세척하여 지방산 (fatty acid mixture, oleic:palmitic acid=2:1) 및 각각의 실험 조건의 물질이 들어있는 배지를 처리하였다. 모든 실험군에 사용된 배지는 혈청이 들어있지 않은 serum free DMEM으로 여기에 실험 조건에 따라 지방산과 각각의 ginsenosides를 처리하여 배양하였다. 배지에 첨가된 지방산과 인삼의 총사포닌 및 각각의 인삼 분획들을 녹인 메탄올 및 에탄올 함량은 모든 실험군이 동일하도록 하였으며 이때 알코올의 최종농도는 0.1%가 되도록 조절하였다. Ginsenosides가 분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 12 well plate에 3T3-L1 전구지방세포를 접종하여 0.5 mM IBMX, 1 μM DEX와

10 μg/ml insulin을 처리하여 분화를 유도한 것을 대조군으로, 대조군에 각 ginsenosides를 처리한 것을 시험군으로 하여 분화를 유도하고 그 후 매 2일 마다 10 μg/ml insulin과 각각의 ginsenosides가 포함된 배지로 교환하여 주었다.

3. 3T3-L1 adipocytes 내 TAG의 정량 및 단백질 정량

세포 내 TAG의 정량은 Bio Clinical System (BCS, Korea) TAG 정량 kit를 사용하여 효소법으로 실시하였고, 단백질은 Bradford reagent (Sigma, USA)를 가지고 정량하여 세포 단백질 1mg당 TAG의 양을 결정하였다.

4. Oil red O 염색 및 정량

세포내 지방구 생성을 확인하기 위하여 세포를 PBS로 세척한 후 3.7% formalin으로 2분간 고정하고 다시 물로 세척하여 Oil red O를 처리한 후 10분간 염색하였으며 물로 3회 세척하였다. 정량을 위해 isopropanol을 가하여 지방을 추출한 후 spectrophotometer (Beckman DU-70, Beckman, USA)로 518 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 총 RNA의 추출 및 정량

총 RNA의 추출은 TRizol과 RNeasy Kit을 이용하여 제조사 지시 방법대로 시행하였다. PBS로 세척한 세포에 Trizol을 첨가하여 마이크로파이펫을 이용하여 균질화 시켰다. 그 후 여기에 0.2 ml의 chloroform을 첨가하

여 혼합한 후 10분간 원심분리 (10,000 x *g*, 4℃)하여 상청액을 취해 동량의 isopropanol을 첨가해 실온에서 10분간 둔 후 10분간 원심분리 (10,000 x *g*, 4℃)한 뒤 70% ethanol로 세척해 공기중에 말렸다. 이것을 RNase-free water에 녹여 UV spectrophotometer (Beckman DU-70, Beckman, USA)로 260 nm에서의 흡광도를 측정하여 총 RNA양을 정량하였다.

6. Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reation (RT-PCR)

1) Primer 제작

본 실험에 사용한 모든 primer는 GeneBank에서 검색한 mouse의 cDNA 서열을 토대로 제작하였다 (Table 1).

2) Reverse transcription

각 실험군의 총 RNA를 주형으로 oligo-dT primer를 1 μM씩 첨가한 후 90℃에서 2분간 가열하여 RNA의 2차 구조를 파괴하였다. 여기에 20 unit의 MMLV reverse transcriptase와 1 mM의 dNTPs (dATP, dCTP, dGTP와 dTTP), 20 unit의 RNase inhibitor를 각각 첨가한 후 최종 부피가 20 μl가 되도록 RNase-free water를 넣어 주었다. 37℃에서 1시간 동안 reverse transcription을 시행하였다.

3) Polymerase chain reaction

Table 1. Primers for semi-quantitative RT-PCR

Target mRNA		Sequence (5′→ 3′)	PCR products	GeneBank Accession No.
ACO	Sense	CGCCAGTCTGAAATCAAGAG	600 bp	AF006688
	Antisense	ACTTCCTTGCTCTTCCTGTG		
Adipsin	Sense	CTGCTGGACGAGCAGTGG	568 bp	NM_0134359
	Antisense	GATGACACTCGGGTATAGACGC		
C/EBPα	Sense	CTGGCCTCCATCGTCAAC	345 bp	NM_007678
	Antisense	TCTGGGCATGCTCAGTGA		
FAS	Sense	GTTGTCACATCAGCCACTTG	649 bp	XM_126624
	Antisense	CTGCTGGACGAGCAGTGG		
Leptin	Sense	GGAATTCAGGAAAATGTGCTGGAGA	517 bp	NM__008493
	Antisense	GGAATTCTCAGCATTCAGGGCTAAC		
PPARδ	Sense	GATAGGTGTGATCTTAAC	348 bp	NM_011145
	Antisense	CTATGTGACGATCTGCCT		
PPARγ	Sense	ATGGAGCTGGTGAAACGGAA	903 bp	NM_011146
	Antisense	ACTGCTTCCCGAATGTCTGA		
SREBP1	Sense	CTCAGGTCATGTTGGAAACC	550 bp	AF374266
	Antisense	TGCTACAGTCTACAGCATCG		
TGFβ	Sense	ATGGAGCTGGTGAAACGGAA	300 bp	NM_011577
	Antisense	ACTGCTTCCCGAATGTCTGA		
UCP	Sense	GGAATTCAACAGTTCTACACCAAGGGC	486 bp	NM_011671
	Antisense	GGAATTCAGCATGGTAAGGGCACAGTG		
β-actin	Sense	TCGTGCGTGACATTAAGGAG	364 bp	AA316641
	Antisense	TTGCGCTCAGGAGGAGCAAT		

Reverse transcription을 통하여 얻은 cDNA를 주형으로 하여 각각의 유전자에 대한 PCR을 수행하였다. Sense primer 및 antisense primer는 0.4 μM씩 첨가하였으며 0.2 mM dNTPs, 1 U Taq polymerase를 10 × PCR buffer 3 μl와 섞어 최종 부피가 30 μl가 되게 하였다. 95℃에서 5분간 방치한 후 55℃/40초 (annealing), 72℃/40초 (extention), 95℃/40초 (denaturation)으로 25 - 33 cycles 반응을 수행하였다. PCR product는 0.5 × TBE buffer (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA)를 사용하여 1.2% agarose 젤 상에서 전기영동한 후 etidium bromide 염색하여 확인하였다. Fluor-S^{TM} MultiImager (Bio-Rad, USA)를 이용하여 RT-PCR product의 상대적 양을 측정하였고 각 mRNA에 대한 RT-PCR 산물의 측정된 양은 β-actin에 대한 산물의 양으로 보정하였다.

4) RT-PCR의 Southern blot analysis

(1) Probe 제작

각각의 RT-PCR 산물들을 pBluscript vector에 넣어 cloning 한 후 sequencing하여 확인한 다음 *EcoR*I로 잘라 그 절편을 사용하였다. 각 절편은 0.5 × TBE 완충용액을 이용하여 1% agarose gel 상에서 분리하여 QIAEXII Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany)를 이용해 정제하였다. 추출된 DNA는 DIG High Prime (Roche, Germany)을 이용하여 제조회사의 지시대로 random prime labeling을 하였다.

(2) 전기영동 및 transfer

각각의 PCR 산물들을 동일하게 섞은 후 0.5 × TBE buffer를 사용하여 1% agarose 젤에서 전기영동 하였다. Transfer 전처리로 agarose 젤을 danaturation solution (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)에 15분간 2번, neutralization solution (0.5 M Tris-HCl [pH 7.5], 1.5 M NaCl)에 15분간 2번 처리한 후 20 × SSC (standard saline citrate, 1.5 M NaCl, 0.15 M sodium citrate)에 10분간 담가두었다. Turboblotter apparatus (Schleicher & Schell, Germany)를 이용해 6시간 동안 positively charged nylon membrane (Roche, Germany)에 downward capillary transfer 한 후 membrane을 2 × SSC에 적신 filter paper에 놓고 UV crosslinker (UVP, model CL-1000)에서 1200 μJ의 에너지로 crosslinking하였다.

(3) Hybridization 및 stringency wash

Prehybridization 및 hybridization은 Roche사 (Germany)의 DIG Easy Hyb solution을 이용하여 42°C에서 수행하였다. Prehybridization을 30분 실시한 후 probe를 넣고 6시간 이상 hybridization을 실시하였다. Hybridization이 끝난 후 5분간 두 번 실온에서 low stringency buffer (2 × SSC, 0.1% SDS)를 이용하여 세척한 후 65°C에서 high stringency buffer (0.5 × SSC, 0.1% SDS)를 사용하여 15분간 두 번 세척하였다.

(4) Detection

다음의 과정은 모두 실온에서 수행하였다. Washing buffer (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, pH7.5, 0.3% Tween 20)로 membrane을 5분간

세척한 후 blocking solution (DIG detection kit, Roche, Germany)으로 30분간 blocking을 하였다. Anti-Digoxigenin-AP conjugate를 blocking solution에 1:10,000으로 dilution하여 30분간 반응시킨 후, washing buffer로 15분간 두 번 세척한 후 detection buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 9.5)로 5분간 처리하였다. CSPD® ready-to-use solution (Roche, Germany)를 처리한 후 실온에서 5분 반응시킨 후 비닐백에 넣은 상태로 실온에서 X-OMAT X-ray film (Kodak, USA)에 20분간 노출시켰다.

(5) Densitometry

X-ray film을 현상한 후 Fluor-S™ MultiImager (Bio-Rad, USA)를 이용하여 RT-PCR product의 상대적 양을 측정하였고 각 mRNA에 대한 RT-PCR 산물의 측정된 양은 β-actin에 대한 산물의 양으로 보정하였다.

7. Real time RT-PCR

1) Primer 제작

Real time RT-PCR에 사용한 probe-primer는 ABI사 (USA)에 제작을 의뢰 사용하였다.

2) Reverse transcription

각 실험군의 총 RNA를 주형 (1 μg)으로 oligo-dT primer를 1 μM씩

첨가한 후 여기에 4 unit의 Omniscript Reverse Transcriptase (Quiagen, Germany), 10 × buffer, 0.5 mM의 dNTPs (dATP, dCTP, dGTP와 dTTP)와 20 unit의 RNase inhibitor를 각각 첨가한 후 최종 부피가 20 μl 가 되도록 RNase-free water를 넣어 주었다. 37℃에서 1시간 동안 reverse transcription을 시행하였다.

3) Polymerase chain reaction

Reverse transcription을 통하여 얻은 cDNA를 주형으로 하여 각각의 유전자에 대한 PCR을 수행하였다. 제작된 20 × TaqMan probe-primer는 probe 0.25 μM와 primer 0.9 μM의 농도로 첨가하였으며 제조사 효소반응액과 물을 섞어 최종 부피가 20 μl가 되게 하였다. 95℃에서 2분간 방치한 후 95℃/5초 (denaturation), 50℃/15초 (annealing), 72℃/20초 (extention)으로 40 cycles 반응을 수행하였다.

8. Immunoblot analysis

1) Immunoblot

PBS로 세척해서 원심분리하여 수거한 세포에 protease cocktail을 첨가한 RIPA lysis buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 7.4, 1.5 M NaCl, 2.5% deoxycholic acid, 10% NP-40, 10 mM EDTA)을 첨가하여 매 5분간 vortex 하여 얼음에 15분간 방치하였다. 그 후 20분간 원심분리 (12,000 rpm, 4℃)하여 상청액을 회수하여 단백질 양을 정량하였다. 각 lysate 50 μg

을 취하여 SDS loading buffer [100 mM Tris-Cl, pH 6.8, 20% glycerol, 200 mM β-mercatoethanol, 10% SDS, 0.2% (w/v) bromophenol blue]와 섞어 12.5% SDS-polyacrylamide gel에 loading하여 100 - 150 V 에서 전기영동 하였다. Blotting을 위하여 PVDF membrane (Amersham, Sweden)은 methanol에 적신 후 Towbin buffer (0.19 M glycine, 25 mM Tris-base, 20% methanol)에 담가 사용하였으며 Sammi-dryer (Schleicher & Schell, Germany)을 이용하여 100 mA로 1시간 동안 electrotransfer하였다.

2) Detection

5% 무지분유가 첨가된 TBS (10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 150 mM NaCl) 용액으로 blocking 시킨 후 C/EBPα, PPARδ, PPARγ (Santa Cruz, USA), 및 leptin (Sigma, USA) 1차 Ab을 1:200 1:5,000 희석하여 첨가한 후 1시간 이상 반응시켰다. 0.05% (v/v) Tween 20이 첨가된 TBS 용액으로 10분간 3회 세척한 후 horseradish peroxidaserk 표지되어 있는 anti-rabbit IgG (Santa Cruz, USA)를 1:2,000으로 희석하여 1시간 이상 반응시켰다. 0.05% Tween 20이 포함된 TBS 용액으로 10분간 3회 세척한 후 ECL detection kit (Amersham, Sweden)을 이용하여 X-ray film에 수초 내지 수분 노출시켜 현상하였다.

9. cAMP assay

cAMP biotrack enzymeimmunoassay (EIA) system kit (Amersham, Sweden)를 사용하여 제조사 지시대로 시행하여 450 nm에서 측정하였다.

III. 결 과

1. Ginsenosides의 3T3-L1 adipocytes 지방 대사 조절 작용

1) TAG 함량에 미치는 영향

고지질 조건을 결정하기 위하여 분화시킨 3T3-L1 adipocytes에 여러 농도 (0.1, 0.5, 1, 2, 및 5 mM)의 지방산 (fatty acid mixture, oleic:palmitic acid = 2:1)을 24시간 처리한 결과 농도에 비례하여 TAG 수치가 증가하였고 이에 본 실험에서는 2 mM의 지방산 농도를 적정 고지질 조건으로 선택하였다 (Fig. 1). 적정 고지질 조건에서 TAG의 함량 변화에 대한 적정 배양 시간을 결정하기 위하여 분화시킨 3T3-L1 adipocytes에 2 mM fatty acid mixture와 여러 농도 (0.1, 1, 10, 및 100 μg/ml)의 ginsenoside-Rb2 (G-Rb2)를 처리하여 각 시간대별 (4, 8, 12, 및 24 hour)로 배양한 결과, 정상군에서는 시간 경과에 따른 TAG 증가가 보이지 않은 반면 대조군에서는 시간이 경과함에 따라 TAG가 증가하였으며 여기에 G-Rb2를 처리하였더니 모든 농도군에서 8시간 대에 가장 큰 TAG의 함량 차이가 관찰되었다 (Fig. 2). 여러 인삼 사포닌 성분들 간의 TAG 감소 효과를 비교하기 위하여 3T3-L1 adipocytes에 2 mM fatty acid mixture와 총 사포닌 및 각 ginsenosides (G-Rb1, -Rb2, -Re, -Rg1, -Rg2, -Rh1, -Rh2, 및 CK를 농도별 (0.1, 1, 10, 및 100 μg/ml)로 처리하여 8시간 배양한 결과, 대부분의 ginsenosides가 대조군에 비해 TAG를 감소시켰으며 (최대 49%) 전체적으로 10 μg/ml의 농도에서 가장 큰 TAG 감소를 보였고 이는 현재 가장

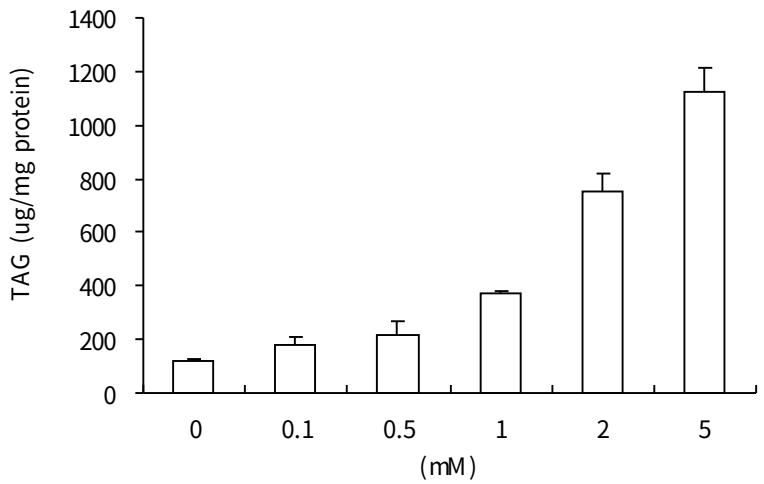

Fig. 1. Determination of high fatty acid concentration for TAG accumulation in 3T3-L1 adipocytes. Differentiated 3T3-L1 adipocytes were cultured in serum free-DMEM with or without various concentration of fatty acid mixture (oleic acid:palmitic acid=2:1) for 24 hours. Bars represent standard deviation (SD) of each mean. Data are given as the mean ± SD.

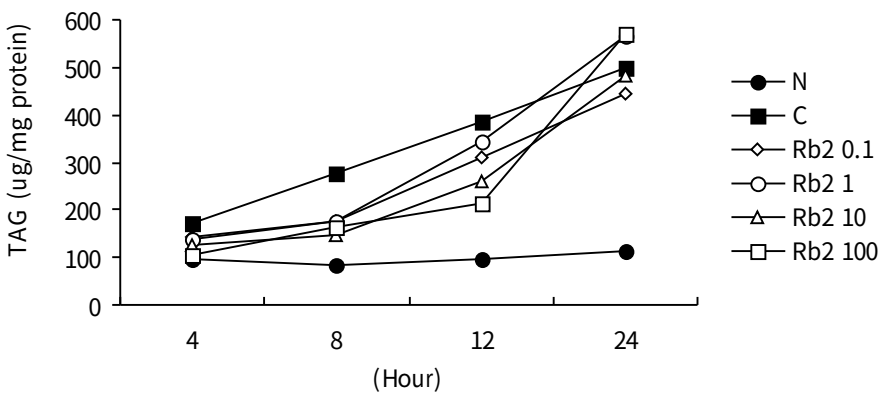

Fig. 2. Effect of ginsenoside-Rb2 on TAG reduction in 3T3-L1 adipocytes under high fatty acid condition. Differentiated 3T3-L1 adipocytes (N) were cultured in serum free-DMEM. Control group (C) was cultured in serum free-DMEM containing 2% albumin and 2 mM fatty acid mixture (oleic acid:palmitic acid = 2:1). Test groups were cultured under the same conditions as those of the control group with various concentrations of ginsenoside-Rb2 (0.1, 1, 10, and 100 μg/ml, respectively).

많이 사용되고 있는 TAG 강하제의 일종인 gemfibrozil을 같은 농도로 처리하였을 때와 비슷한 수준이었다 (Fig. 3). 한편, G-Rb2 및 ginsenosides의 체내대사체 (-Rh1, -Rh2, CK) 들에서 다른 인삼 성분들보다 더 큰 TAG 감소를 보였다.

2) Leptin 발현에 미치는 영향

Ginsenosides의 지질 강하 효과가 총체적인 지방 대사 조절자로 알려진 leptin의 발현과 연관이 있는지 알아보기 위하여 동일 농도 조건하에서 각 ginsenosides가 leptin mRNA 발현에 미치는 영향을 quantitative RT-PCR/Southern blot 방법을 사용하여 측정하였다. 분화시킨 3T3-L1 adipocytes에 2 mM fatty acid mixture와 여러 농도 (0.1, 1, 10, 및 100 μg/ml)의 ginsenoside-Rb2 (G-Rb2)를 처리하여 각 시간대별 (4, 8, 12, 및 24 hour)로 배양하여 leptin mRNA 발현을 측정한 결과, 대조군에서는 시간이 경과함에 따라 지속적으로 leptin 발현이 증가하는 반면, G-Rb2 (10 μg/ml) 처리군에서는 leptin 발현이 증가하다가 8시간 이후에는 감소하는 양상을 보였고 대조군에 비해서는 발현이 증가하였다 (Fig. 4). 또한 분화된 3T3-L1 adipocytes에 2 mM fatty acid mixture와 총 사포닌 및 각 ginsenosides (G-Rb1, -Rb2, -Re, -Rg1, -Rg2, -Rh1, -Rh2, 및 CK)를 10 μg/ml의 농도로 처리하여 8시간 배양하였을 때, 대조군에 비하여 각각의 인삼 처리군과 gemfibrozil 처리군에서 leptin mRNA 발현이 증가하였다. 특히 G-Re, -Rh1, -Rh2, 및 CK 처리군에서 그 발현이 현저하였고 대조군에 비하여 25 ~ 130%의 발현 증가를 보였다 (Fig. 5).

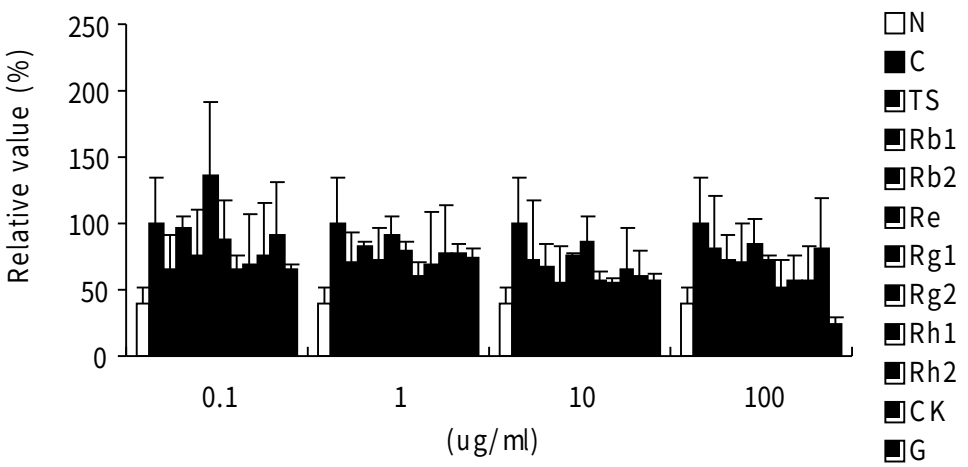

Fig. 3. Effects of ginsenosides on TAG reduction in 3T3-L1 adipocytes under high fatty acid condition. Differentiated 3T3-L1 adipocytes (N) were cultured in serum free-DMEM. Control group (C) was cultured in serum free-DMEM containing 2% albumin and 2 mM fatty acid mixture (oleic acid:palmitic acid=2:1) for 8 hours. Test groups were cultured under the same conditions as those of the control group with total saponin (TS, 10 μg/ml), ginsenosides (G-Rb1, -Rb2, -Re, -Rg1, -Rg2, -Rh1, -Rh2, and CK, 10 μg/ml), or gemfibrozil (G, 10 μg/ml), respectively. Data are given as the mean ± SD. Bars represent standard deviation of each mean. Control was set as 100%.

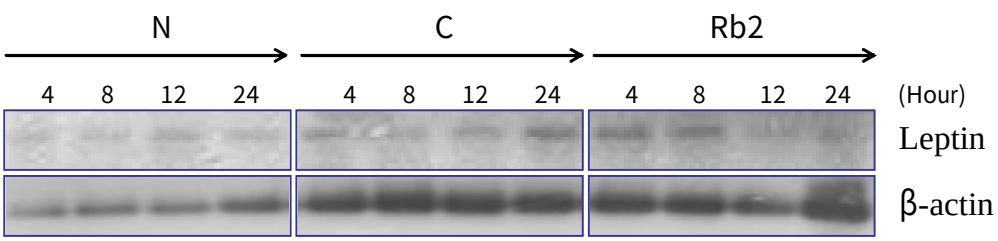

Fig. 4. Effect of ginsenoside-Rb2 on mRNA expression of leptin in 3T3-L1 adipocytes under high fatty acid condition. Differentiated 3T3-L1 adipocytes (N) were cultured in serum free-DMEM. Control group (C) was cultured in serum free-DMEM containing 2% albumin and 2 mM fatty acid mixture (oleic acid : palmitic acid = 2:1) for various time conditions. Test group was cultured under the same conditions as those of the control group with ginsenoside-Rb2 (10 μg/ml).

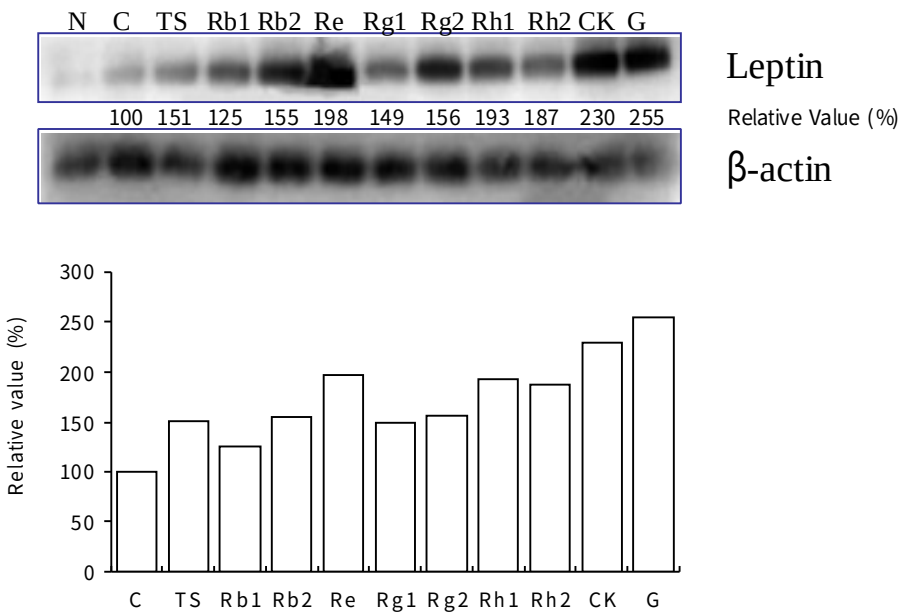

Fig. 5. Effects of ginsenosides on mRNA expression of leptin in 3T3-L1 adipocytes under high fatty acid condition. Differentiated 3T3-L1 adipocytes (N) were cultured in serum free-DMEM. Control group (C) was cultured in serum free-DMEM containing 2% albumin and 2 mM fatty acid mixture (oleic acid:palmitic acid=2:1) for 8 hours. Test groups were cultured under the same conditions as those of the control group with total saponin (TS, 10 μg/ml) , ginsenosides (G-Rb1, -Rb2, -Re, -Rg1, -Rg2, -Rh1, -Rh2, and CK, 10 μg/ml) or gemfibrozil (G, 10 μg/ml), respectively. Data are mean ±SD of the ratio between each gene and β-actin. Bars represent standard deviation of each mean. Control was set as 100%.

3) 지방 산화 관여 유전자 발현에 미치는 영향

Ginsenosides가 지질을 감소시키는 작용기전에 있어 지방 산화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 지방 산화 효소인 ACO와 에너지 소비 단백질인 UCP mRNA의 발현을 측정하였다. 분화시킨 3T3-L1 adipocytes에 2 mM fatty acid mixture와 총 사포닌 및 각 ginsenosides (G-Rb1, -Rb2, -Re, -Rg1, -Rg2, -Rh1, -Rh2, 및 CK)를 10 μg/ml의 농도로 처리하여 8시간 배양한 결과, 대조군에 비하여 각각의 인삼 처리군과 gemfibrozil 처리군에서 ACO mRNA 발현이 증가하였다. 특히 G-Re와 -Rh2 처리군에서 그 발현이 더 현저하였고 대조군에 비하여 18 ~ 236%의 발현 증가를 보였다 (Fig. 6). UCP mRNA 또한 같은 조건 하에서 대조군에 비하여 각각의 인삼 처리군과 gemfibrozil 처리군에서 발현이 증가하였으며 특히 G-Re, -Rh2, 및 CK 처리군에서 그 발현이 현저하였고 대조군에 비하여 44 ~ 183%의 발현 증가를 보였다 (Fig. 7).

4) 지방 합성 관여 유전자 발현에 미치는 영향

Ginsenosides가 지방 합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 지방 합성 효소인 FAS와 지방 합성에 관여하는 주요 전사인자인 SREBP1의 mRNA 발현을 측정하였다. 3T3-L1 adipocytes에 2 mM fatty acid mixture와 총 사포닌 및 각 인삼 성분들 (G-Rb1, -Rb2, -Re, -Rg1, -Rg2, -Rh1, -Rh2, 및 CK) 10 μg/ml의 농도로 처리하여 8시간 배양한 결과, 각각의 인삼 처리군과 gemfibrozil 처리군에서 FAS mRNA 발현이 대조군에 비하여 7 ~ 45% 증가하였고 특히 G-Rb2, -Re 및 CK 처리군에서 그 발현이 현저하였다

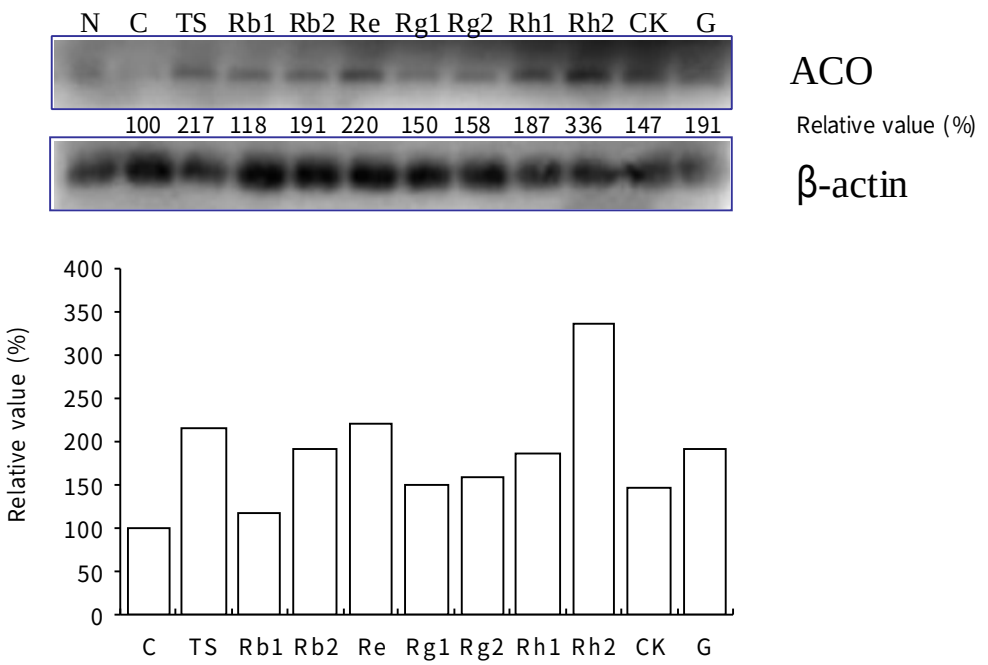

Fig. 6. Effects of ginsenosides on mRNA expression of ACO in 3T3-L1 adipocytes under high fatty acid condition. Differentiated 3T3-L1 adipocytes (N) were cultured in serum free-DMEM. Control group (C) was cultured in serum free-DMEM containing 2% albumin and 2 mM fatty acid mixture(oleic acid:palmitic acid=2:1) for 8 hours. Test groups were cultured under the same conditions as those of the control group with total saponin (TS, 10 μg/ml) , ginsenosides (G-Rb1, -Rb2, -Re, -Rg1, -Rg2, -Rh1, -Rh2, and CK, 10 μg/ml) or gemfibrozil (G, 10 μg/ml), respectively. Data are mean ±SD of the ratio between each gene and β-actin. Bars represent standard deviation of each mean. Control was set as 100%. ACO : acyl CoA oxidase

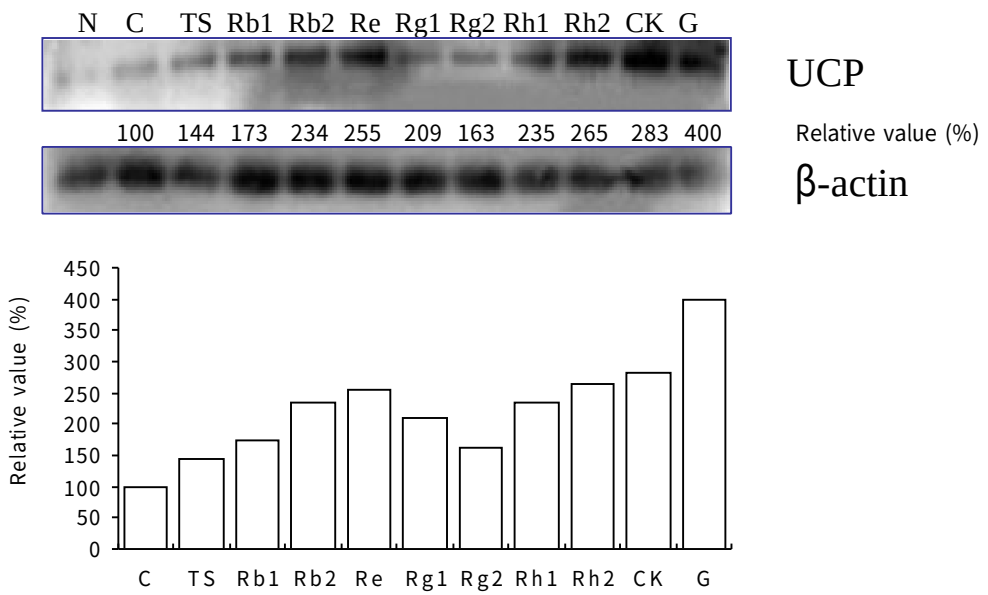

Fig. 7. Effects of ginsenosides on mRNA expression of UCP in 3T3-L1 adipocytes under high fatty acid condition. Differentiated 3T3-L1 adipocytes (N) were cultured in serum free-DMEM. Control group (C) was cultured in serum free-DMEM containing 2% albumin and 2 mM fatty acid mixture(oleic acid:palmitic acid=2:1) for 8 hours. Test groups were cultured under the same conditions as those of the control group with total saponin (TS, 10 μg/ml) , ginsenosides (G-Rb1, -Rb2, -Re, -Rg1, -Rg2, -Rh1, -Rh2, and CK, 10 μg/ml) or gemfibrozil (G, 10 μg/ml), respectively. Data are mean ±SD of the ratio between each gene and β-actin. Bars represent standard deviation of each mean. Control was set as 100%. UCP : uncoupling protein

(Fig. 8). SREBP1 mRNA 또한 대조군에 비하여 각각의 인삼 처리군과 gemfibrozil 처리군에서 3.7 ~ 8.5배의 발현 증가를 보였고 특히 G-Re, -Rh2, 및 CK 처리군에서 그 발현이 더 현저하였다 (Fig. 9).

2. Ginsenosides의 3T3-L1 adipocytes 분화 조절 작용

1) 분화 초기 단계에 미치는 영향

Ginsenosides가 3T3-L1 전구지방세포의 분화 과정에 미치는 영향을 보기위하여 전구지방세포가 confluent 해졌을 때 (day 0) 분화 유도 혼합제 (0.5 mM IBMX, 1 μM DEX와 10 μg/ml insulin)를 처리한 대조군에 총 사포닌 및 ginsenosides (G-Rb1, -Rb2, -Re, -Rg1, -Rg2, -Rh1, -Rh2, 및 CK)를 10 μg/ml의 농도로 첨가하여 분화를 유도한 후 날짜 경과에 따른 분화 양상을 현미경으로 관찰하였으며 4일째와 9일째 세포를 Oil red O로 염색하여 200배로 현미경 관찰한 후 지질량을 정량하였다. 분화 유도 혼합제를 첨가하지 않은 정상군 (10% FBS)에서는 느린 속도로 분화가 진행되는 것에 비하여 분화 유도 혼합제를 첨가한 대조군에서는 날짜 경과에 비례하게 지질량이 증가하였으며 4일째 이후 지방구가 관찰되었고 6일째에는 거의 80% 이상이 분화되었다 (Fig. 11). Ginsenosides를 분화 유도 혼합제에 동시 첨가하여 분화를 유도하여 본 결과, 대조군에 비하여 다소 빠른 지방구 생성을 보였으나 완전히 분화가 완료된 후에는 대조군에 비하여 지질량이 감소하였다 (Fig. 10). 또한, ginsenosides 중 가장 큰 지질 감소 효능을 보였던 CK를 분화 유도 혼합제를 첨가하지 않은 정상군 (10% FBS)과 분화 유도 혼합제 (0.5 mM IBMX, 1 μM DEX와 10 μg/ml insulin)

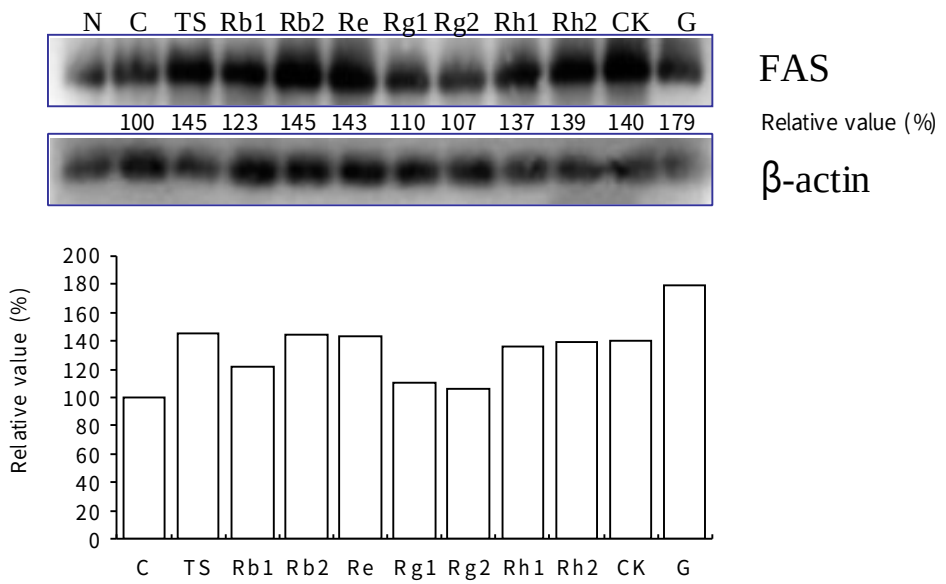

Fig. 8. Effects of ginsenoside on mRNA expression of FAS in 3T3-L1 adipocytes under high fatty acid condition. Differentiated 3T3-L1 adipocytes (N) were cultured in serum free-DMEM. Control group (C) was cultured in serum free-DMEM containing 2% albumin and 2 mM fatty acid mixture(oleic acid:palmitic acid=2:1) for 8 hours. Test groups were cultured under the same conditions as those of the control group with total saponin (TS, 10 μg/ml) , ginsenosides (G-Rb1, -Rb2, -Re, -Rg1, -Rg2, -Rh1, -Rh2, and CK, 10 μg/ml) or gemfibrozil (G, 10 μg/ml), respectively. Data are mean ±SD of the ratio between each gene and β-actin. Bars represent standard deviation of each mean. Control was set as 100%. FAS : fatty acid synthase

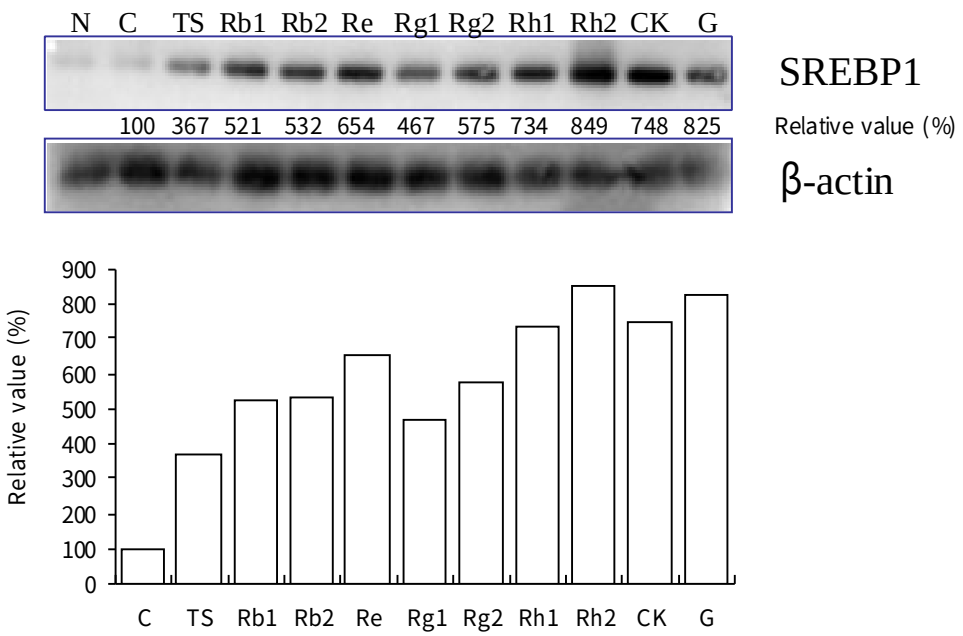

Fig. 9. Effects of ginsenosides on mRNA expression of SREBP1 in 3T3-L1 adipocytes under high fatty acid condition. Differentiated 3T3-L1 adipocytes (N) were cultured in serum free-DMEM. Control group (C) was cultured in serum free-DMEM containing 2% albumin and 2 mM fatty acid mixture(oleic acid:palmitic acid=2:1) for 8 hours. Test groups were cultured under the same conditions as those of the control group with total saponin (TS, 10 μg/ml) , ginsenosides (G-Rb1, -Rb2, -Re, -Rg1, -Rg2, -Rh1, -Rh2, and CK, 10 μg/ml) or gemfibrozil (G, 10 μg/ml), respectively. Data are mean ±SD of the ratio between each gene and β-actin. Bars represent standard deviation of each mean. Control was set as 100%. SREBP : sterol regulatory element binding protein

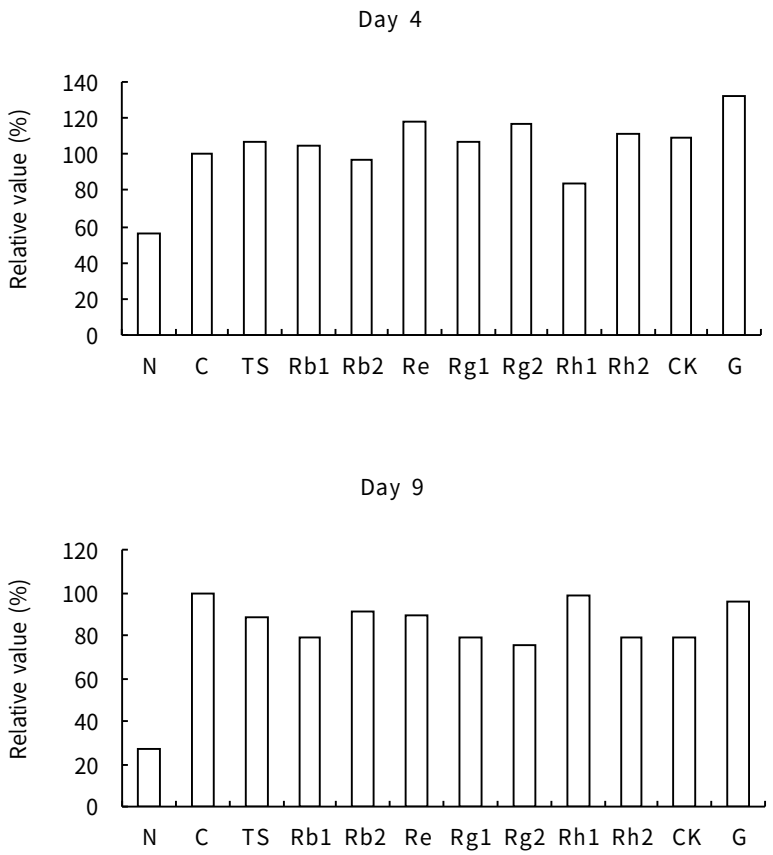

Fig. 10. Effects of ginsenosides on 3T3-L1 adipocytes differentiation in terms of TAG content. After being confluent (D0), 3T3-L1 adipocytes group (N) were cultured in 10% FBS-DMEM. Control group (C) was cultured in 10% FBS-DMEM containing 0.5 mM IBMX, 1 uM DEX, and 1 μg/ml insulin. Test groups were cultured under the same conditions as those of the control group with total saponin (TS, 10 μg/ml) , ginsenosides (G-Rb1, -Rb2, -Re, -Rg1, -Rg2, -Rh1, -Rh2, and CK, 10 μg/ml) or gemfibrozil (G, 10 μg/ml), respectively. Cells were differentiated in standard condition (10% FBS and insulin 10 μg/ml) and medium was changed by every other 2 days.

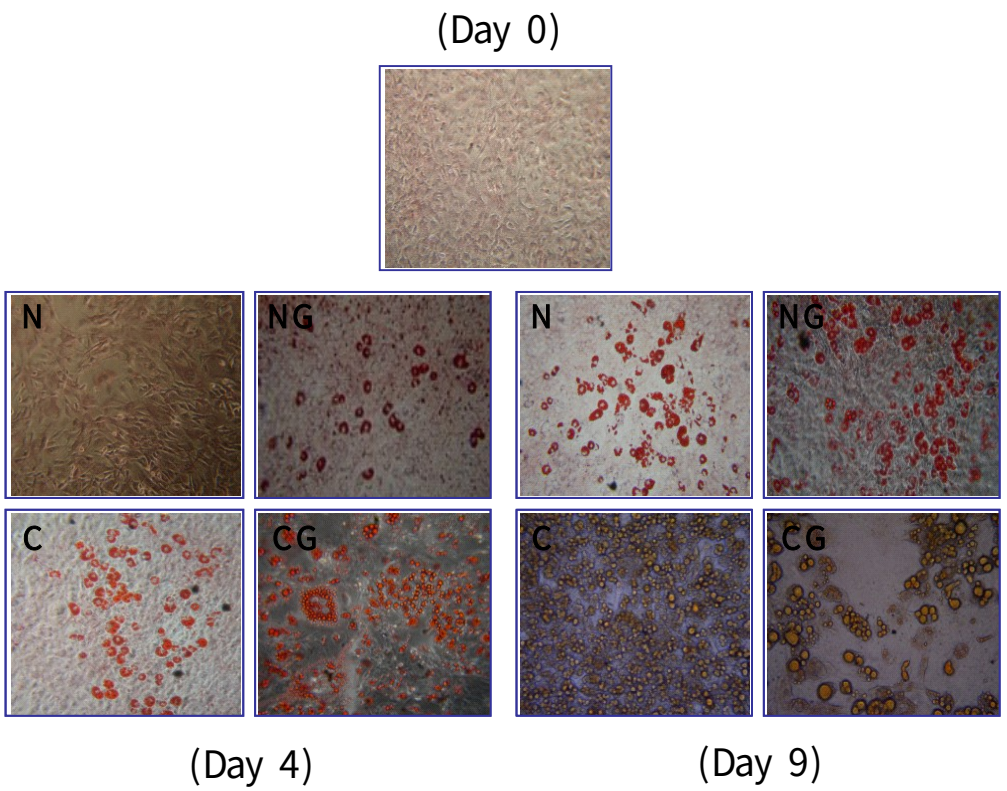

Fig. 11. Effect of CK on 3T3-L1 adipocytes differentiation. After being confluent (D0), 3T3-L1 adipocytes group (N) were cultured in 10% FBS-DMEM. Control group (C) was cultured in 10% FBS-DMEM containing 0.5 mM IBMX, 1 uM DEX, and 1 μg/ml insulin. Test group was cultured under the same condition as that of the control group with CK (G) 10 μg/ml. Cells were differentiated in standard condition (10% FBS and insulin 10 μg/ml) and medium was changed by every other 2 days. Magnitude × 200. NG : N+G, CG : C+G

를 첨가한 대조군에 첨가하여 분화 양상을 관찰하였을 때, 분화가 왕성하게 일어나 지방구가 관찰되기 시작하는 시기인 4일째에는 CK 처리군에서 지방구가 더 많이 관찰되었으나 완전 분화가 일어난 후인 9일째에는 생성되었던 지방구가 감소한 것을 관찰할 수 있었고 지질량을 정량했을 시 대조군에 비해 30%의 감소를 보였다 (Fig. 11와 12).

2) 분화 관련 전사인자 발현에 미치는 영향

Ginsenosides가 3T3-L1 adipocytes의 분화 조절 인자들 중 전사인자들의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 분화 유도 혼합제를 처리하지 않은 정상군 (10% FBS)과 분화 유도 혼합제를 처리한 대조군 (0.5 mM IBMX, 1 μM DEX와 10 μg/ml insulin)에 각각 CK와 G-Rh2를 처리하여 분화시킨 후 4일째와 9일째 각 전사인자의 발현 정도를 측정하였다. 분화 초기에 발현되어 분화 진행을 유도한다고 알려진 C/EBPα와 PPARγ, SREBP1의 전체적인 발현 양상과 두 인삼 처리군의 발현 양상은 거의 비슷하였다 (Fig. 13-15). C/EBPα mRNA의 경우 분화 4일째와 9일째 정상군에 비하여 CK 처리군에서 9 ~ 18% 발현이 증가하였고, 대조군에 비하여 분화 4일째 CK와 G-Rh2를 처리한 군에서 각각 68%와 58%의 발현 증가를 보였으며, 분화 9일째에는 각각의 인삼 처리군에서 61%와 4.1배의 발현 감소를 보였다 (Fig. 13). PPARγ mRNA의 경우 분화 4일째 정상군에 비하여 CK와 G-Rh2 처리군에서 각각 3.9배와 24% 발현 증가를 보였으며, 9일째 각각 19%와 9%의 발현 증가를 보였다. 대조군에 비하여 분화 4일째 CK 처리군에서는 약간 감소 (8%)하였으나 차이가 크지 않았으며 G-Rh2 처리군에서는 92% 발현이 증가하였다. 분화 9일째에는 두 인삼

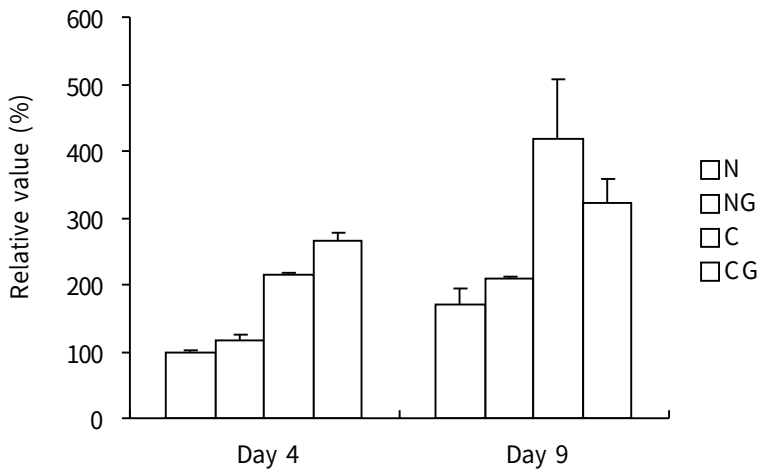

Fig. 12. Effect of CK on 3T3-L1 adipocyte differentiation. After being confluent (D0), 3T3-L1 adipocytes group (N) were cultured in 10% FBS-DMEM. Control group (C) was cultured in 10% FBS-DMEM containing 0.5 mM IBMX, 1 uM DEX, and 1 μg/ml insulin. Test group was cultured under the same condition as that of the control group with CK (G) 10 μg/ml. Cells were differentiated in standard condition (10% FBS and insulin 10 μg/ml) and medium was changed by every other 2 days. Data are given as the mean ± SD. Bars represent standard deviation of each mean. NG : N+G, CG : C+G

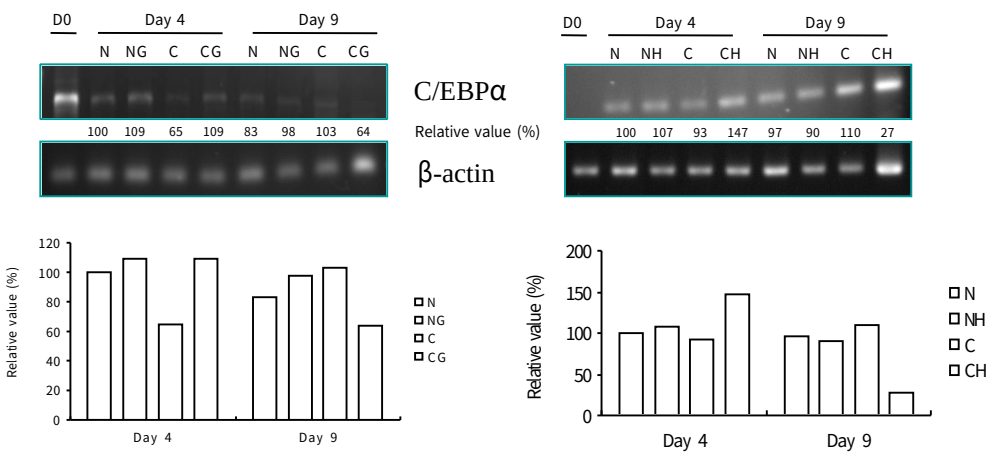

Fig. 13. Effects of CK and G-Rh2 on mRNA expression of C/EBPα in 3T3-L1 adipocytes during adipocyte differentiation. After being confluent (D0), 3T3-L1 adipocytes group (N) were cultured in 10% FBS-DMEM. Control group (C) was cultured in 10% FBS-DMEM containing 0.5 mM IBMX, 1 uM DEX, and 1 μg/ml insulin. Test groups were cultured under the same conditions as those of the control group with CK (G) or G-Rh2 (H) 10 μg/ml, respectively. Cells were differentiated in standard condition (10% FBS and insulin 10 μg/ml) and medium was changed by every other 2 days. NG : N+G, CG : C+G, NH : N+H, CH : C+H, C/EBP : CCAAT-enhancer binding protein

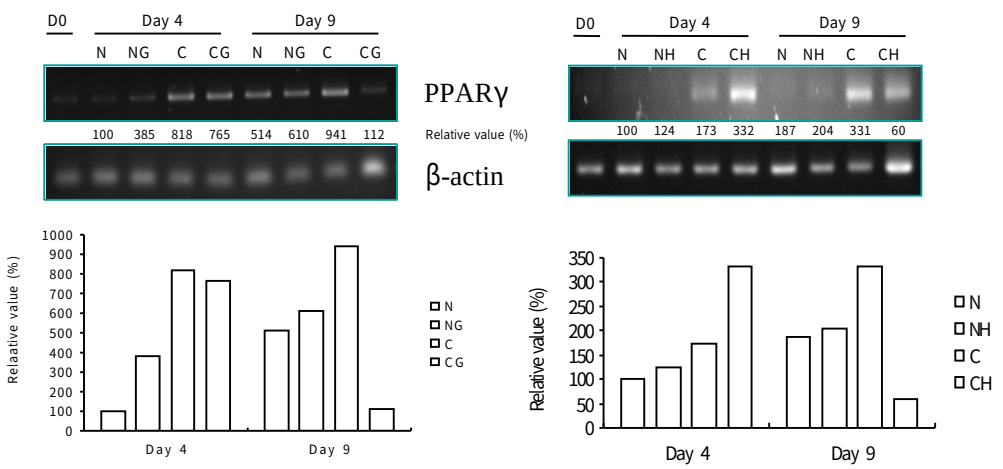

Fig. 14. Effects of CK and G-Rh2 on mRNA expression of PPARγ in 3T3-L1 adipocytes during adipocyte differentiation. After being confluent (D0), 3T3-L1 adipocytes group (N) were cultured in 10% FBS-DMEM. Control group (C) was cultured in 10% FBS-DMEM containing 0.5 mM IBMX, 1 uM DEX, and 1 μg/ml insulin. Test groups were cultured under the same conditions as those of the control group with CK (G) or G-Rh2 (H) 10 μg/ml, respectively. Cells were differentiated in standard condition (10% FBS and insulin 10 μg/ml) and medium was changed by every other 2 days. NG : N+G, CG : C+G, NH : N+H, CH : C+H, PPAR : peroxisome proliferator activated receptor

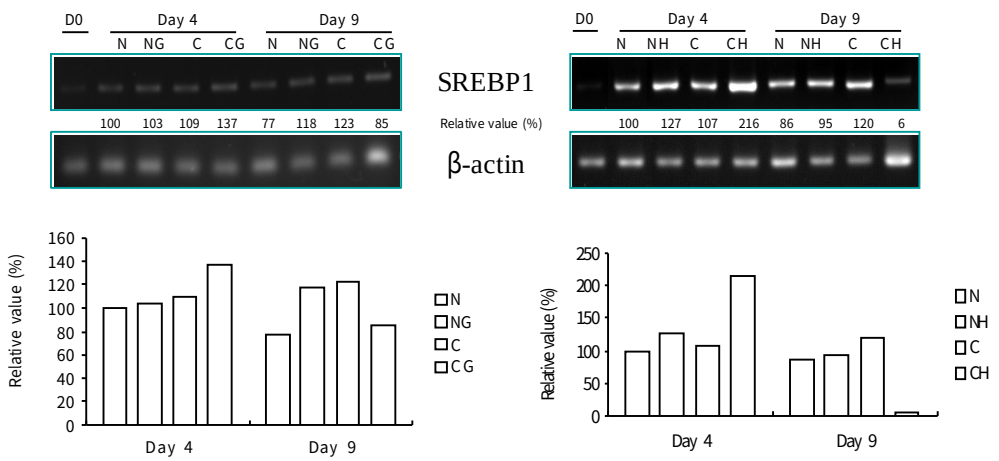

Fig. 15. Effects of CK and G-Rh2 on mRNA expression of SREBP1 in 3T3-L1 adipocytes during adipocyte differentiation. After being confluent (D0), 3T3-L1 adipocytes group (N) were cultured in 10% FBS-DMEM. Control group (C) was cultured in 10% FBS-DMEM containing 0.5 mM IBMX, 1 uM DEX, and 1 μg/ml insulin. Test groups were cultured under the same conditions as those of the control group with CK (G) or G-Rh2 (H) 10 μg/ml, respectively. Cells were differentiated in standard condition (10% FBS and insulin 10 μg/ml) and medium was changed by every other 2 days. NG : N+G, CG : C+G, NH : N+H, CH : C+H, SREBP : sterol regulatory element binding protein

처리군 모두 현저한 발현 감소를 보였는데 각각 8.4배와 5.5배의 발현 감소를 보였다 (Fig. 14). SREBP 1 mRNA의 경우 분화 4일째 두 인삼 처리군에서 정상군에 비하여 각각 3%와 27% 발현 증가하였고, 분화 9일째 CK 처리군에서는 53%의 발현 증가를 보였고 G-Rh2 처리군에서는 10% 발현 증가를 보였다. 대조군에 비하여 분화 4일째에는 두 처리군 각각 26%와 3배의 발현 증가를 보였으며, 9일째에는 각각 45%와 21배의 발현 감소를 보였다 (Fig. 15). Real time RT-PCR을 수행한 CREB의 경우 분화 4일째에는 정상군과 대조군에 비하여 CK 처리군이 각각 2.3배와 4.2배 발현 증가하였으나 9일째에는 정상군과 대조군에 비하여 각각 39%와 100% 발현 감소하였다 (Fig. 16). 한편, 에너지 소모에 관여한다고 알려진 PPARδ mRNA는 두 인삼처리군 모두에서 정상군과 대조군에 비하여 발현 정도가 증가하였는데 CK 처리군에서는 분화 4일째 대조군에 비하여 72%, G-Rh2 처리군에서는 4.7배의 발현 증가를 보였고 9일째에는 대조군에 비하여 각각 43%와 5.5배의 발현 증가를 보였다 (Fig. 17).

이같은 전사인자들의 단백질 발현을 측정한 결과, C/EBPα와 PPARγ에서는 9일째 CK 처리군에서 대조군에 비하여 단백질 발현이 감소하였으며 PPARδ은 CK 처리군에서 단백질 발현이 증가하여 mRNA 발현 양상과 동일하였다 (Fig. 23).

3. Ginsenosides가 3T3-L1 adipocytes에서 분비되는 adipokines과 에너지 소비 관여 유전자의 발현에 미치는 영향

Ginsenosides가 3T3-L1 adipocytes에서 발현되어 에너지 대사를 조절한다고 알려진 adipokines의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 분화

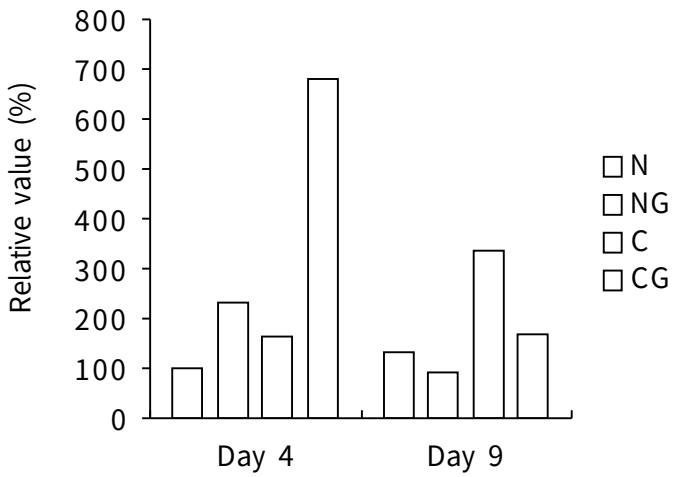

Fig. 16. Effect of CK on mRNA expression of CREB in 3T3-L1 adipocytes during adipocyte differentiation using real time RT-PCR. After being confluent (D0), 3T3-L1 adipocytes group (N) were cultured in 10% FBS-DMEM. Control group (C) was cultured in 10% FBS-DMEM containing 0.5 mM IBMX, 1 uM DEX, and 1 μg/ml insulin. Test group was cultured under the same condition as that of the control group with CK (G) 10 μg/ml. Cells were differentiated in standard condition (10% FBS and insulin 10 μg/ml) and medium was changed by every other 2 days. NG : N+G, CG : C+G, CREB : cAMP response element protein

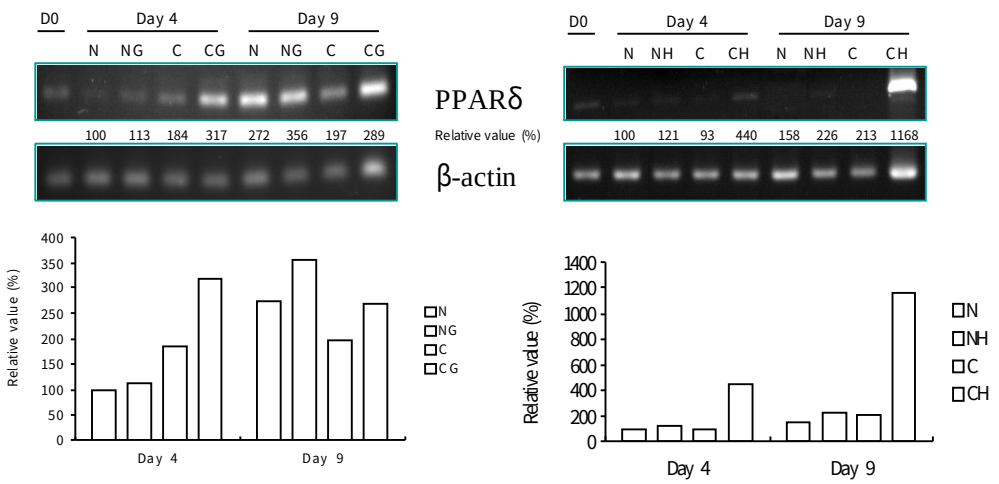

Fig. 17. Effects of CK and G-Rh2 on mRNA expression of PPARδ in 3T3-L1 adipocytes during adipocyte differentiation. After being confluent (D0), 3T3-L1 adipocytes group (N) were cultured in 10% FBS-DMEM. Control group (C) was cultured in 10% FBS-DMEM containing 0.5 mM IBMX, 1 uM DEX, and 1 μg/ml insulin. Test groups were cultured under the same conditions as those of the control group with CK (G) or G-Rh2 (H) 10 μg/ml, respectively. Cells were differentiated in standard condition (10% FBS and insulin 10 μg/ml). Media were changed by every 2 days. NG : N+G, CG : C+G, NH : N+H, CH : C+H, PPAR : peroxisome proliferator activated receptor

유도 혼합제를 처리하지 않은 정상군 (10% FBS)과 분화 유도 혼합제를 처리한 대조군 (0.5 mM IBMX, 1 μM DEX와 10 μg/ml insulin)에 각각 CK와 G-Rh2를 처리하여 분화시킨 후 4일째와 9일째 adipsin, TGFβ, 및 leptin 등의 adipokines 발현 정도를 측정하였다. Adipsin mRNA의 경우 분화 4일째 CK 처리군과 G-Rh2 처리군에서 정상군에 비하여 각각 70%와 8.5배 발현 증가를 보였고 대조군에 비하여는 G-Rh2 처리군에서 2.6배 발현 증가를 보였다. 9일째에는 대조군에 비해 CK 처리군과 G-Rh2 처리군에서 각각 64%와 3.3배의 발현 감소를 보였다 (Fig. 18). TGFβ mRNA의 경우 CK 처리군에서는 4일째 정상군과 대조군에 비하여 57%와 23%의 발현 증가를 보였고, 9일째에는 대조군에 비하여 85%의 발현 감소를 보였다. G-Rh2 처리군에서는 4일째 대조군에 비하여 43%의 발현 증가를 보였고, 9일째에는 정상군에 비하여 4.4배의 발현 증가를, 대조군에 비하여는 4.3배의 발현 감소를 보였다 (Fig. 19). UCP mRNA의 경우 분화 4일째 대조군에 비해 CK 처리군에서 63% 발현 증가를 보였으며, 9일째에는 대조군에 비해 39% 감소하였다. 4일째 G-Rh2 처리군에서 정상군에 비하여 62% 발현 증가하였으며, 9일째에는 정상군에 비하여 발현이 3배 증가하였고 대조군에 비하여는 5배 감소하였다 (Fig. 20). 지방산 산화를 담당하는 ACO mRNA의 경우 G-Rh2을 처리한 군에서 발현 증가가 현저하였으며 4일째와 9일째 대조군에 비해 각각 2.2배와 9.2배 발현이 증가하였다 (Fig. 21). 지방 조직에서 에너지 대사를 총괄적으로 조절한다고 알려진 leptin의 mRNA를 real time RT-PCR로 측정한 결과, 4일째 정상군에 비하여 2.5배, 대조군에 비하여 3.7배 발현이 증가하였으며 9일째에는 대조군에 비하여 43% 발현이 감소하였고 단백질 발현 또한 9일째 대조군에 비해 감소하는 양상을 보였다 (Fig. 22와 23).

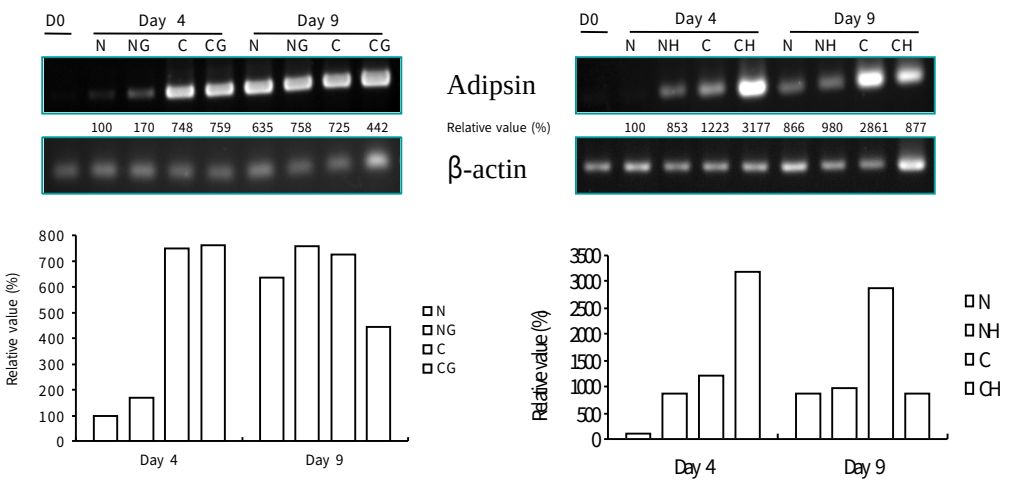

Fig. 18. Effects of CK and G-Rh2 on mRNA expression of adipsin in 3T3-L1 adipocytes during adipocyte differentiation. After being confluent (D0), 3T3-L1 adipocytes group (N) were cultured in 10% FBS-DMEM. Control group (C) was cultured in 10% FBS-DMEM containing 0.5 mM IBMX, 1 uM DEX, and 1 μg/ml insulin. Test groups were cultured under the same conditions as those of the control group except CK (G) or G-Rh2 (H) 10 μg/ml, respectively. Cells were differentiated in standard condition (10% FBS and insulin 10 μg/ml) and medium was changed by every other 2 days. NG : N+G, CG : C+G, NH : N+H, CH : C+H

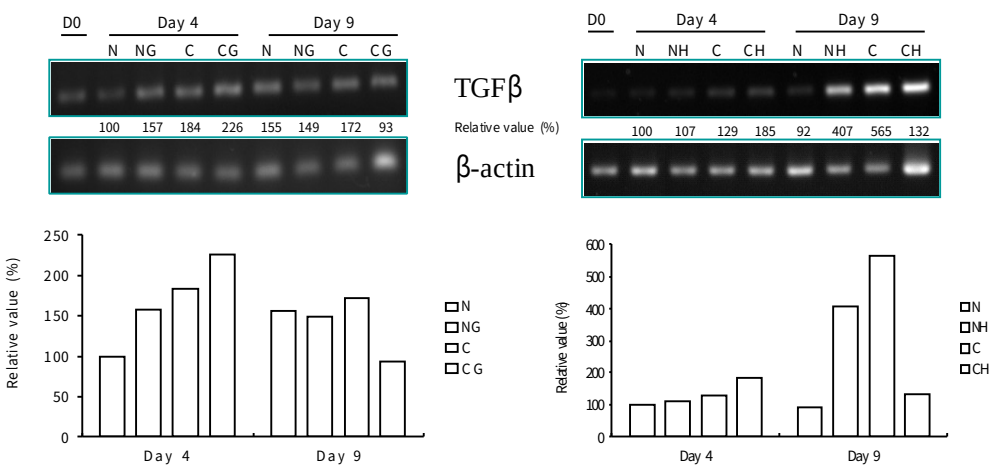

Fig. 19. Effects of CK and G-Rh2 on mRNA expression of TGFβ in 3T3-L1 adipocytes during adipocyte differentiation. After being confluent (D0), 3T3-L1 adipocytes group (N) were cultured in 10% FBS-DMEM. Control group (C) was cultured in 10% FBS-DMEM containing 0.5 mM IBMX, 1 uM DEX, and 1 μg/ml insulin. Test groups were cultured under the same conditions as those of the control group with CK (G) or G-Rh2 (H) 10 μg/ml, respectively. Cells were differentiated in standard condition (10% FBS and insulin 10 μg/ml) and medium was changed by every other 2 days. NG : N+G, CG : C+G, NH : N+H, CH : C+H, TGF : transforming growth factor

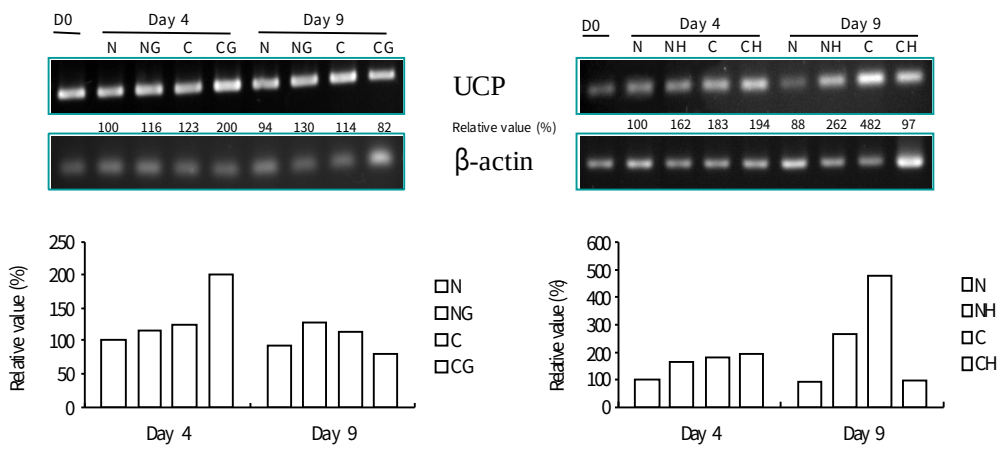

Fig. 20. Effects of CK and G-Rh2 on mRNA expression of UCP in 3T3-L1 adipocytes during adipocyte differentiation. After being confluent (D0), 3T3-L1 adipocytes group (N) were cultured in 10% FBS-DMEM. Control group (C) was cultured in 10% FBS-DMEM containing 0.5 mM IBMX, 1 uM DEX, and 1 μg/ml insulin. Test groups were cultured under the same conditions as those of the control group with CK (G) or G-Rh2 (H) 10 μg/ml, respectively. Cells were differentiated in standard condition (10% FBS and insulin 10 μg/ml) and medium was changed by every other 2 days. NG : N+G, CG : C+G, NH : N+H, CH : C+H, UCP : uncoupling protein

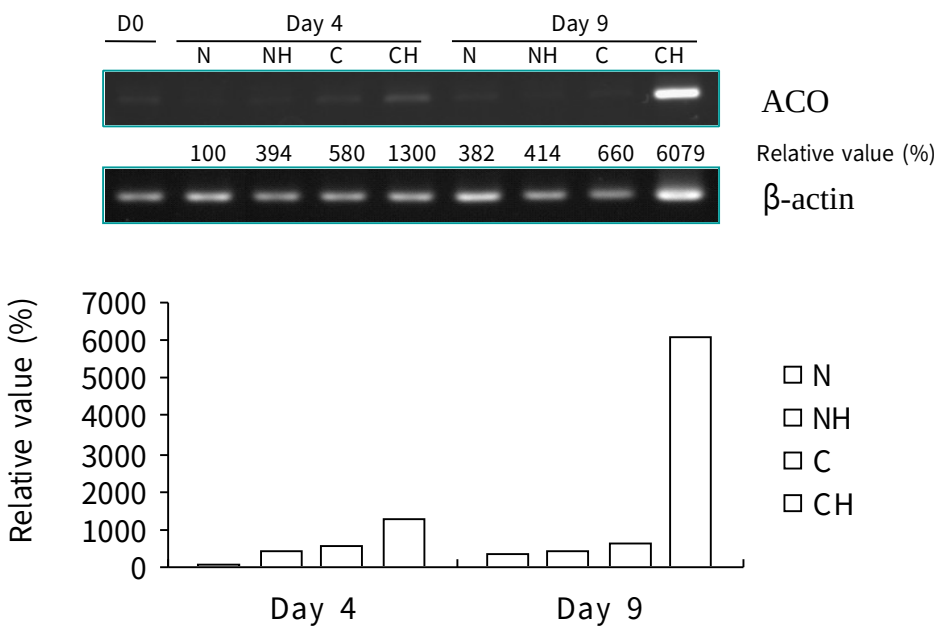

Fig. 21. Effect of G-Rh2 on mRNA expression of ACO in 3T3-L1 adipocytes during adipocyte differentiation. After being confluent (D0), 3T3-L1 adipocytes group (N) were cultured in 10% FBS-DMEM. Control group (C) was cultured in 10% FBS-DMEM containing 0.5 mM IBMX, 1 uM DEX, and 1 μg/ml insulin. Test group was cultured under the same condition as that of the control group with G-Rh2 (H) 10 μg/ml. Cells were differentiated in standard condition (10% FBS and insulin 10 μg/ml) and medium was changed by every other 2 days. NH : N+H, CH : C+H, ACO : acyl CoA oxidase

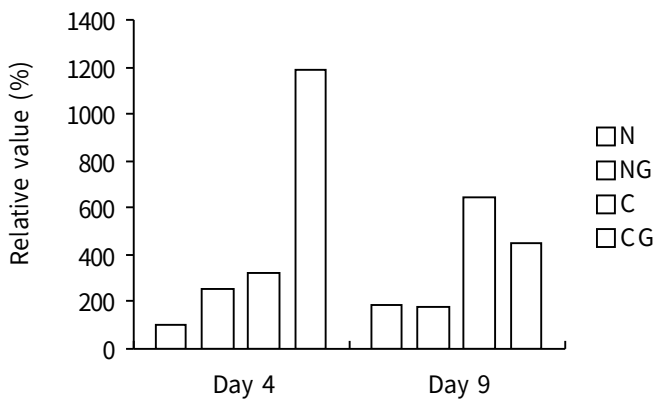

Fig. 22. Effect of CK on mRNA expression of leptin in 3T3-L1 adipocytes during adipocyte differentiation using real time RT-PCR. After being confluent (D0), 3T3-L1 adipocytes group (N) were cultured in 10% FBS-DMEM. Control group (C) was cultured in 10% FBS-DMEM containing 0.5 mM IBMX, 1 uM DEX, and 1 μg/ml insulin. Test group was cultured under the same condition as that of the control group with CK (G) 10 μg/ml. Cells were differentiated in standard condition (10% FBS and insulin 10 μg/ml) and medium was changed by every other 2 days. NG : N+G, CG : C+G

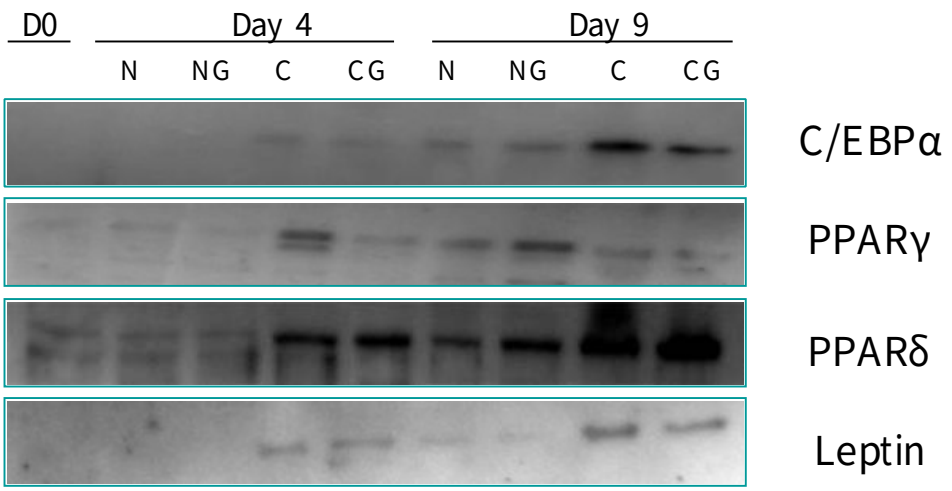

Fig. 23. Effect of CK on protein expression related to differentiation in 3T3-L1 adipocytes. After being confluent (D0), 3T3-L1 adipocytes group (N) were cultured in 10% FBS-DMEM. Control group (C) was cultured in 10% FBS-DMEM containing 0.5 mM IBMX, 1 uM DEX, and 1 μg/ml insulin. Test group was cultured under the same condition as that of the control group with CK (G) 10 μg/ml. Cells were differentiated in standard condition (10% FBS and insulin 10 μg/ml) and medium was changed by every other 2 days. NG : N+G, CG : C+G

4. Ginsenosides가 3T3-L1 adipocytes의 cAMP level에 미치는 영향

분화 및 지방 분해의 초기 신호 인자로 작용한다고 알려진 cAMP의 농도 변화에 미치는 ginsenosides의 영향을 알아보기 위하여 분화 유도 혼합제 처리군 (0.5 mM IBMX, 1 μM DEX와 10 μg/ml insulin)을 대조군으로 하여 cAMP 농도를 측정하였다. 분화 개시 후 2일, 4일, 6일 및 8일 모두 CK 처리군에서 cAMP 농도가 대조군에 비해 9% ~ 63% 증가하였다. 대조군의 경우 분화 2일 대비 4일째 cAMP 농도가 현저히 증가하였고 날짜가 경과함에 따라 감소하는 양상을 보였으며, CK 처리군 역시 2일 대비 4일째 현저한 증가를 보였고 날짜가 경과함에 따라 감소하는 양상을 보였다 (Fig. 24).

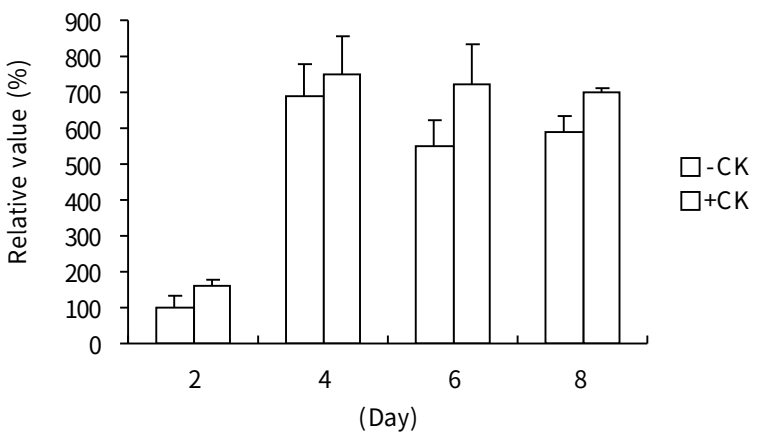

Fig. 24. Effect of CK on cAMP levels in 3T3-L1 adipocytes. Differentiation was induced after cells were grown confluent (D0) by 10% FBS containing 0.5 mM IBMX, 1 uM DEX, and 1 μg/ml insulin with or without CK 10 μg/ml. Cells were differentiated in standard condition (10% FBS and insulin 10 μg/ml). Media were changed by every 2 days. Data are given as the mean ± SD. Bars represent standard deviation of each mean.

IV. 고 찰

최근 현대과학과 의학의 급속한 발달에도 불구하고 동서양을 막론하고 비만 인구가 빠르게 증가하는 추세에 있고 비만 정도가 갈수록 심각해지고 있다. 뿐만 아니라 비만은 제2형 당뇨병, 심장질환, 뇌혈관 질환의 원인이 되어 결국은 사망률을 높이게 한다. 때문에 비만 치료에 대한 관심이 증가하게 되었고 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 최근의 비만에 대한 연구는 많은 유전자들이 그 조절에 관여하는 것으로 보고하고 있다 (Allison과 Heo, 1998). 특히 비만이 되게 하는 지방세포가 에너지 저장소로서의 역할 뿐 아니라 내분비 역할까지 하여 체내 에너지 항상성을 조절한다고 알려진 이후로 지방세포 자체에 대한 조절 뿐 아니라 지방 세포에서 생성되는 산물들의 조절을 통해 비만을 치료하려는 연구가 진행되고 있다.

이러한 배경 하에 이루어진 본 연구에서는 여러 ginsenosides가 지방세포에서 TAG 함량을 감소시키는지 그러한 감소 기전이 지방 세포의 분화과정 및 지방세포 산물들과 연관이 있는지 알아보고자 하였으며 이 영향을 기존의 임상에서 사용되고 있는 비만 및 고지혈증의 치료제로 지방세포 조절 인자인 PPAR family를 활성화시키는 fibrates계 약물의 하나인 gemfibrozil 효과와 비교함으로써 ginsenosides가 fibrates을 대신할 약제 또는 새로운 약제 개발의 표적 물질이 될 수 있는지를 타진해 보고자 하였다. 본 실험에서 사용한 세포주는 3T3-L1 세포주로 이는 분화된 3T3-L1 adipocyte가 *in vivo* adipocytes의 생화학·형태학적 성질들과 사실상 동일하다는 보고 (MacDougald와 Lane, 1995)에 따라 지방 대사를 연구하는데 적절하다고 판단되어 3T3-L1 전구 지방 세포를 분화시켜 사용하였다. 먼

저 분화된 3T3-L1 adipocytes에 여러 농도의 지방산을 처리하였을 때 농도에 비례하여 TAG가 증가하는 결과와 다른 보고들 (Zhou 등, 1997; Shimabukuro 등, 1997)을 참고하여 고지질 조건을 결정하였고 이후 실험엔 2 mM 농도의 지방산을 처리하였다. 또한 적정 고지질 조건에서 TAG의 함량 변화에 대한 적정 배양 시간을 결정하기 위하여 2 mM 지방산과 여러 농도의 G-Rb2를 처리하여 여러 시간대 별로 배양하였을 때 모든 농도군에서 8시간 대에 가장 큰 TAG 함량 차이를 보여 적정 배양 시간은 8시간으로 결정하였다. 여러 ginsenosides의 지질 강하 효능을 농도 별로 비교하여 보았을 때 대부분의 성분들이 대조군에 비해 TAG를 감소시켰고 10 μg/ml을 처리한 농도에서 가장 큰 감소 효과를 나타내어 ginsenosides들의 효능에는 최적농도가 있음을 확인할 수 있었으며 처리 농도에 따라 효과가 달라질 수 있음을 암시하였다. 이러한 결과는 ginsenosides의 농도가 과도하게 높을 때에는 ginsenosides의 detergent 성질 때문에 세포가 다량 파괴되어 그 효과를 비교할 수 없다는 보고 (주충노와 윤수희, 1993)에 의해 뒷받침 되었다. 또한 여러 ginsenosides 중 G-Rh1, -Rh2, 및 CK에서 더 큰 TAG 감소를 보여 ginsenosides의 체내 대사체들이 활성 본체일 것이라는 것이 시사되었다. 특히 ginsenosides에 의한 TAG 감소 효과가 현재 PPAR agonist로 지방산 산화를 촉진함으로써 지질강하제로 사용되고 있는 gemfibrozil과 비슷한 수준임을 나타내는 결과는 ginsenosides이 gemfibrozil을 대체할 수 있는 약제로 개발될 수 있음을 제시하는 것으로 판단된다.

본 실험에서의 모든 mRNA의 발현은 leptin의 발현이 지방 조직에 비해 훨씬 적게 발현되기 때문에 Northern blotting으로는 검출하기 어렵다는 보고 (MacDougald 등, 1995)에 따라 일괄적으로 quantitative

RT-PCR/Southern blot 방법을 사용하여 측정하였는데 측정된 모든 mRNA의 발현 양상은 ginsenosides에 의한 TAG 함량 변화 양상과 유사하였으며 이러한 일관된 결과는 TAG 감소에 이들 유전자들의 발현이 관여하고 있음을 나타내는 것으로 생각되었다. Ginsenosides의 지질 강하 효과가 지방 세포에서 분비되어 식욕 조절과 지방 합성 억제 및 지방 산화 촉진을 통하여 총체적인 체내 지방 대사를 조절하여 (Montague 등, 1997; Soukas 등, 2000; Zhou 등, 1997) 궁극적으로 체중을 조절하는 것으로 알려진 leptin의 발현과 연관이 있는지 알아보기 위하여 시간 경과에 따른 leptin mRNA 발현을 측정해 본 결과 TAG 감소 양상과 leptin 발현 양상이 일치하여 ginsenosides의 TAG 감소 효과에 leptin이 연관되어 있다고 판단되었다. 특히 시간 경과에 따라 증가하던 leptin 발현이 8시간 이후 감소함에도 β-actin 발현은 일정한 것으로 보아 이같은 leptin을 매개한 TAG 감소 효과는 apoptosis에 의한 효과라기보다 지방세포의 dedifferentiation과 TAG 분해 증가에 의한 것으로 생각되었다. 이러한 결과와 leptin의 지질 강하 효과가 식욕 조절 뿐만 아니라 지방 산화 효소의 발현을 증진시키고 열생성을 통한 에너지 소비를 증가시키는 기전으로 일어난다는 보고 (Reidy와 Weber, 2000)를 토대로 ginsenosides가 궁극적으로 지방 산화에 영향을 미치는지 알아보기 위해 지방 산화 효소인 ACO와 에너지 소비 관여 단백질인 UCP의 mRNA 발현을 살펴보았을 때 각각의 발현이 증가하여 ginsenosides가 leptin을 매개로 하여 지방 산화를 촉진시키고 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 adipose tissues에서 발현되는 mitochondrial protein인 UCP가 에너지 균형, 체중 조절 및 thermoregulation에 관여하며 leptin에 의해 그 발현이 증가된다는 보고 (Fleury 등, 1997; Zhou 등, 1997) 및 fatty acid oxidation을 통해 지방을

분해하는 기전에 주요한 효소로 작용하는 acyl CoA oxidase (ACO)와 carnitine palmitoyl transferase-1 (CPT1)들이 leptin에 의해 조절된다는 보고 (Zhou 등, 1999)와 일관되는 결과로서 ginsenosides의 지질 감소 효능에 대한 기전을 설명하여 주었다.

한편, 흥미롭게도 ginsenosides가 지방 합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 지방 합성 효소인 FAS와 지방 합성에 관여하는 주요 전사 인자인 SREBP1의 mRNA 발현을 살펴보았을 때 각 ginsenosides 처리군에서 FAS 및 SREBP1 mRNA 발현이 증가하는 경향을 보여 leptin이 SREBP와 지방 합성 효소들의 발현 억제를 통해 지방 합성을 억제시킨다는 보고 (Soukas 등, 2000)와 일치하지 않아 ginsenosides의 TAG 감소 효과에는 leptin 외 다른 기전이 존재함을 암시하였다. SREBP는 콜레스테롤과 지질 합성을 조절하는 전사인자로 -1a, -1c, -2의 세가지 isoform으로 존재하고 (Osborne, 2000) 각각 지방산 대사와 지질 생합성을 수행하는 유전자들과 콜레스테롤 항상성을 유지하는데 작용하는 유전자들을 선택적으로 활성화 시키며 (Horton 등, 1998) feeding 및 insulin에 의해 SREBP의 발현이 증가되고 그 결과 FAS 등의 지방 합성 효소 발현이 증가한다는 보고 (Semenkovich, 1997) 및 acetyl CoA 전구체로부터 long chain fatty acids로의 생합성을 촉매하는 효소인 FAS가 active lipogenesis 조건일 때 mammary gland, 간, 지방조직에서 높은 수준으로 발현되며 (Boizard 등, 1998) 식이와 호르몬, 세포 내 콜레스테롤 농도에 의하여 그 발현이 조절되고 (Kawabe 등, 1996), 3T3-L1에서 지방세포로 분화될 시 그 활성과 발현이 더욱 증가된다는 보고 (Moustaid와 Sul, 1991)를 비롯하여 leptin 발현이 3T3-L1 preadipocyte가 adipocyte로 분화된 후에 증가한다는 보고 (Slieker 등, 1998) 등을 상기한 본 실험의 결과들과 종합하여 볼 때

ginsenosides가 어떤 경로로든 3T3-L1 preadipocyte의 분화 과정에도 영향을 미칠 것으로 판단되었다. 따라서 본 연구에서는 ginsenosides에 의한 지질 대사 조절의 기전을 계속해서 규명하고자 3T3-L1 전구지방세포의 분화 과정에 미치는 ginsenosides의 영향을 살펴보았다.

3T3-L1 전구 지방 세포를 ginsenosides와 같이 처리하여 분화시켜 보았을 때, ginsenosides를 분화 유도 혼합제와 같이 처리한 군들에서는 대조군에 비하여 일찍 지방구가 형성되기 시작하여 일시적으로 분화를 증진하는 것처럼 여겨졌으나 계속적인 분화의 진행과 더불어 대부분의 인삼 처리군과 gemfibrozil 처리군에서 대조군에 비해 Oil red O의 정량값이 감소하였는데 그 양상이 분화 후 지방산과 ginsenosides를 동시 투여하여 지질 변화를 측정한 위의 실험결과 G-Rg2, -Rh2 및 CK (각 10 μg/ml) 처리군에서 가장 크게 지질이 감소한 패턴과 일치하여 ginsenosides의 지질 감소 효과가 분화 과정과 무관하지 않다는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 total saponin, G-Rb1, -Rg2 및 -Rh2의 분화율이 가장 빠르게 일어나는 경향을 보여, G-Rb1, -Rd, -Rh2가 insulin, DEX 및 IBMX의 존재 하에 3T3-L1 fibroblasts의 adipocytes로의 분화를 증가시켰다는 보고 (Sekiya와 Okuda, 1987)와 거의 일치하였다. 또한 분화 유도 혼합제를 처리하지 않은 정상군과 분화 유도 혼합제를 처리한 대조군에 CK를 처리하여 분화 양상을 살펴보았을 때 역시 분화가 진행되고 있는 시점에서는 분화를 가속화시켰으며 분화가 완결된 후에는 지질량을 감소시키는 양상을 보였다. 흥미롭게도 ginsenosides가 분화를 가속화함에도 불구하고 궁극적으로는 지질량이 감소하는 것을 관찰할 수 있었는데 이러한 현상에 대한 작용 기전을 알아보기 위하여 3T3-L1 adipocytes의 분화를 조절한다고 알려진 전사인자들의 발현과 성숙한 지방세포에서 분비되어 지방세포의 분화 및 에너지 대사를

조절한다고 알려진 adipokines의 발현을 살펴보았다. 분화가 진행되고 있는 시점에서는 ginsenosides에 의하여 분화를 유도하는 것으로 알려진 전사인자 C/EBPα, PPARγ, SREBP1 및 CREB의 mRNA 발현과 단백질 발현이 증가되었으나 완전히 분화가 완료된 시점에서는 이들의 발현이 현저히 감소되었으며, 에너지 소비를 증진시키는 것으로 알려진 PPARδ의 경우에는 모든 군들에 비하여 ginsenosides 처리군에서 그 mRNA 발현과 단백질 발현이 증가되었는데 이러한 전사인자들의 발현 양상은 ginsenosides가 분화 과정 시 지질량에 미치는 영향과 일치하여 ginenosides가 분화 관여 전사인자들의 발현을 조절하여 지방 대사를 조절하고 있음을 제시하였다.

한편, 이러한 지방세포의 분화 산물로 지방 대사를 조절하는 것으로 알려진 adipsin, TGFβ, UCP, 및 leptin의 mRNA 발현 양상도 위와 동일하게 관찰되었는데 분화가 증진된 시점에서는 발현 증가를 완전히 분화된 후 지질이 감소된 시점에서는 발현 감소를 보였으며 지방산 산화 효소인 ACO의 mRNA 발현 역시 지질량이 감소한 군에서 그 발현이 현저하게 증가되어 있어 이상의 결과로 보아 ginsenosides가 3T3-L1 adipocytes의 분화 과정에서 초기에는 분화 유도 관여 전사인자들의 발현을 증가시켜 분화를 가속화 시키고 이로 인해 leptin 등의 에너지 조절 adipokines 및 에너지 산화 관여 효소와 전사인자 들의 발현을 증진시켜 이들의 작용으로 지방 분해가 증진될 뿐 아니라 성숙한 지방세포의 dedifferentiation을 유도하여 궁극적으로 지질량을 감소시키는 것으로 생각되었다. 실제로 leptin 발현 증가가 PPARγ의 발현을 억제하여 지방 합성을 저해하고 에너지 산화를 촉진시켜 에너지 소비를 증진시킨다는 많은 보고들 (Ceddia 등, 2000; Wang 등, 1999; Zhou 등, 1999)이 있으며, adipsin이 TAG 합성을 저해한다는 보고 및 TGF famlily 중 하나인 myostatin을 0.1% trifluoroaceticacid (TFA)

에 용해시켜 투여하면 투여하지 않은 군에 비해 GPDH 활성과 Oil red O 염색으로 살펴본 형태학적인 분화가 크게 억제되고 C/EBPα와 PPARγ의 전사 발현 수준이 크게 감소되어 myostatin이 3T3-L1의 지방세포분화를 억제한다는 것이 보고된 바 있다 (Kim 등, 2001).

이러한 지방세포 분화와 지방 산화에 미치는 ginsenosides의 효능이 발휘되도록 매개하는 신호인자를 찾기 위해 지방 세포의 분화 과정과 지방 분해 과정을 매개하는 초기 신호 인자로 알려져 있는 cAMP 농도 변화에 미치는 ginsenosides의 영향을 살펴보았다. 분화 유도 혼합제를 처리한 대조군에 비하여 측정한 모든 날짜에서 ginsenosides 성분에 의하여 cAMP 농도가 증가되어 있었는데 분화 2일째에 비하여 지방구 형성이 관찰되기 시작하는 4일째에 대조군과 ginsenosides 처리군에서 그 농도가 현저히 증가하는 것으로 보아 cAMP agonists가 growth factor-induced adipogenesis를 가능하게 한다는 보고 (Yarwood 등, 1998) 및 insulin과 cAMP agonist가 CREB 발현을 통해 분화를 일으킨다는 보고 (Reusch 등, 2000)처럼 ginsenosides가 cAMP를 매개하여 분화를 조절할 것으로 생각되었다. *In vitro* 상 전구지방 세포의 증식 및 분화는 여러 호르몬, 성장 인자 및 사이토킨 등에 의해 조절되는데 분화를 증진시키는 인자들로는 ascorbate, cAMP, insulin, IGF-1, 성장호르몬, hemin, IBMX, prostagladin F2α, cadmium과 corticosterone 등이 있으며, 이와는 반대로 분화를 억제시키는 물질로는 TNFα, TGFβ, retinol, retinoic acid, vitamin D group, vitamin E, nicotinamide, phorbol ester, dihydroteleocidin B, myostatin, lithium, actinomycin D와 bromodeoxuridune 등이 있다는 보고 (Eun 등, 1993)에 따라 ginsenosides에 의한 cAMP의 증가가 분화를 가속화한 것으로 판단되었다. 한편, 분화의 진행과 더불어 전체적인 cAMP 농도는 감소

되었지만 동일한 시간대에서 ginsenosides 처리군이 대조군에 비하여 지속적으로 cAMP 농도가 증가하는 것으로 보아 분화 후 증가되는 cAMP는 cAMP-매개 지방 분해(cAMP-mediated lipolysis)를 매개하는 것으로 생각되었고 분화 완료 후 지방 산화 효소와 에너지 소비 관여 유전자들의 발현이 증가하는 본 실험의 결과가 이를 지지해 주었다. 이와 같은 인삼에 의한 지질량 감소 효과에 대해 실험 동물에서 홍삼복합체를 투여하여 유의한 체지방 감소를 보였다는 보고 (주종재, 1998)와 비만 환자를 대상으로 홍삼복합체를 4주간 투여한 결과 부작용 없이 체지방의 감소를 볼 수 있었다는 보고 (오승준 등, 1999) 및 홍삼복합체를 비만 환자를 대상으로 투여하였을 때 선택적인 체지방 감소가 나타났는데 이는 cAMP 증가와 β-adrenergic receptor를 통한 지방 분해 촉진 작용일 가능성이 크다는 보고 (오승준 등, 2000)가 있어 본 실험이 그에 대한 명확한 기전을 설명할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 G-Rb1을 rat에 투여하였을 때 Rb1이 cAMP의 생성을 증가시킴으로 간의 TAG와 콜레스테롤 수치를 감소시켰다는 보고 (Park 등, 2002)와 ginsenosides의 분화 증진 영향과 관련하여 G1/S phase에서 세포주기를 중지시킴으로 HL-60 cells의 분화를 유도한다는 보고 (Kim 등, 1998), 및 ginsenosides와 glucocorticoid hormone이 비슷한 화학적 구조를 가지고 있어서 ginsenosides가 glucocorticoid receptor 또는 그의 analogous nuclear receptor와 결합하여 G-Rh1과 -Rh2가 F9 cell의 분화를 유도한다는 보고 (Lee 등, 1996) 등으로 보아 ginsenosides가 glucocorticoid receptor 등의 receptor를 통하여 cAMP 발현을 증가시킴으로 3T3-L1 adipocytes의 지질 대사를 조절하는 것으로 사료되었다.

이상으로 본 연구에서 여러 ginsenosides가 고지질 조건으로 배양한 지방세포 및 완전히 분화된 지방세포의 TAG 함량을 감소시키는 것을 확인

할 수 있었으며 그러한 효과는 cAMP 농도 증가에 기인한 지방세포 분화를 조절하는 전사인자들의 발현과 leptin 등의 에너지 대사 조절 adipokines 및 지방 산화 효소들의 발현 증가와 연관되어 있음을 확인할 수 있었다. 본 연구에 대조군으로 사용된 gemfibrozil은 지질강하제로서 가장 많이 사용되는 fibrate계의 약물로서 LPL의 활성을 증가시키는 작용을 하며 지방 분화와 렙틴 발현을 조절하는 전사인자인 PPAR을 활성화하여 (Cabrero 등, 2001) TAG의 가수분해와 β-oxidation, TAG-rich particle의 clearance에 관여하는 효소들의 발현을 증진시키고 지방산 및 TAG의 합성과 VLDL 분비에 관여하는 효소들의 발현을 억제하여 체내 지질을 감소시키는 것 (Schoonjans 등, 1996)으로 알려져 있는데 장기 사용할 시 독성이 있어 복통, 설사, 두통 등의 여러 부작용을 나타내기 때문에 본 실험에서 보여지는 것과 같이 gemfibrozil과 동일한 작용 메카니즘을 가지고 동일한 수준의 지질 감소 효능을 가지나 독성이 거의 없는 것이 특성이며 복용 및 사용에 따른 부작용이 거의 문제가 되지 않는 ginsenosides를 그 대체 약제 및 새로운 비만 치료제와 지질강하제로 개발하는 것이 중요한 일인 것으로 판단되었다.

V. 결 론

비만치료제 신약 개발과 관련하여 ginsenosides가 생체 에너지 조절의 대부분을 담당하는 지방세포의 대사에 어떠한 영향을 미치는지 또한 그 기전은 무엇인지 규명하고자 분화 및 지방세포 산물들에 미치는 영향을 분화 전후와 고지질 조건에서의 지질량 변화 및 관여 유전자 발현 변화를 중심으로 수행한 본 연구의 결과로 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 인삼 사포닌 및 ginsenosides은 고지질 조건으로 배양한 3T3-L1 adipocytes의 TAG 함량을 감소시켰으며 이러한 효과는 현재 사용되고 있는 지질 강하제인 gemfibrozil의 수준과 비슷하였다.
2. Ginsenosides에 의한 지질 감소 양상과 비슷하게 총체적인 지방 대사 조절 호르몬인 leptin과 그의 조절을 받는 ACO 및 UCP mRNA 발현이 증가하는 것으로 보아 ginsenosides의 TAG 감소 효과는 이들의 전사적 활성화에 기인한 TAG 산화 증가와 에너지 소비에 의한 것으로 판단되었다.
3. Ginsenosides는 SREBP와 FAS 같은 지방 합성 관여 유전자의 발현도 증가시켰다.
4. 인삼 사포닌 및 ginsenosides는 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 과정을 가속화 시켜 궁극적으로 지질량을 감소시켰으며 이러한 효과는 고지질 조건에서의 TAG 감소 효과 양상과 동일하여 같은 기전에 의한 효과일 것으로 판단되었다.
5. Ginsenosides는 C/EBPα, PPARγ, SREBP1, 및 CREB와 같은 분화 조절 전사인자들의 발현에 영향을 주어 분화 과정을 조절하는 것으로 판단되었다.

6. Ginsenosides는 adipsin, leptin, 및 TGFβ 등의 adipokines의 발현을 증가시켜 지방 대사를 조절하는 것으로 판단되었다.
7. 이러한 ginsenosides의 분화 조절 및 지방 함량 조절 효과는 지방세포 분화 과정과 지방 분해 신호를 매개하는 cAMP의 농도 증가에 기인하는 것으로 판단되었다.

이러한 결과는 인삼 성분들이 지질 강하 및 비만 억제 효과를 가지고 있음을 보여주어 현재 많이 사용되고는 있지만 부작용이 많은 gemfibrozil 등 기존 지질강하제의 대체 약제 및 새로운 약제로서 ginsenosides의 사용 가능성을 제시하는 것이며 leptin과 PPARδ 등 새로운 비만치료제의 target으로 부상하고 있는 물질들에 대한 긍정적인 효능을 보여주어 ginsenosides 성분을 부작용이 없는 비만증 치료제로 개발함에 있어 그 분자 생물학적 근거를 제시하고 있는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

Akao T., Kida H., Kanaoka M., Hattori M., and Kobashi K. Intestinal bacterial hydrolysis is required for the appearance of compound K in rat plasma after oral administration of ginsenoside Rb1 from Panax ginseng. *J. Pharm. Pharmacol*. 1998; 50(10): 1155-60

Allison and Heo. Meta-Analysis of Linkage Data under Worst-Case Conditions: A Demonstration Using the Human OB Region. *Genetics*, 1998; 148: 859-866

Andrea MI., Felice S., Michele M., Massimisiano C., Antonio A., Costanzo M., Gaetano F., Giuseppe R., and Andrea F. Leptin and Aging. Correlation with endocrine changes in male and female healthy adult populations of diffent body weight. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85: 1954-1962

Ashima RS., and Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol. Metab*., 2000; 11: 372-332

Boizard M., Liepvre XL., Lemarchand P., Foufelle F., Ferre P., and Dugail I. Obesity-related overexpression of fatty acid synthase gene in adipose tissue involves sterol regulatory element-binding protein

transcription factors. *J. Biol. Chem*. 1998; 273(44): 29164-29171

Boss O., Hagen T., and Lowell BB. Uncoupling proteins 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism. *Diabetes.* 2000; 49(2): 143-156

Bray GA. In *Handbook of obesity* (Bray GA.; Bouchard C.; James WPT. Eds) Marcel Dekker, New York, Basel, HongKong, 1998; 31-40

Cabrero A., Alegret M., Sanchez RM., Adzet T., Laguna JC., and Vazquez M. Bezafibrate reduces mRNA levels of adipocyte markers and increases fatty acid oxidation in primary culture of adipocytes. *Diabetes*. 2001; 50(8): 1883-1890

Camp HS., Ren D., and Leff T. Adipogenesis and fat-cell function in obesity and diabetes. *Trends in molecular Medicine*. 2002; 8(9): 442-447

Cassard-Doulcier AM., Gelly C., Fox N., Schrementi J., Raimbault S., Klaus S., Forest C., Bouillaud F., and Ricquier D. Tissue-specific and beta-adrenergic regulation of the mitochondrial uncoupling protein gene: control by cis-acting elements in the 5'- flanking region. *Mol. Endocrinol.* 1993; 7(4): 497-506

Ceddia RB., William WN. Jr., Lima FB., Flandin P., Curi R., and

Giacobino JP. Leptin stimulates uncoupling protein-2 mRNA expression and Krebs cycle activity and inhibits lipid synthesis in siolated rat white adipocytes. *Eur. J. Biochem.* 2000; 267(19): 5952-5958

Champigny O., Ricquier., Blondel O., Mayers RM., Briscoe MG., and Holloway BR. ß$_3$-Adrenergic Receptor Stimulation Restores Message and Expression of Brown-Fat Mitochondrial Uncoupling Protein in Adult Dogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991; 88(23): 10774-10777

Clifford GM., Londos C., Kraemer FB., Vernon RG., Yeaman SJ. Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(7): 5011-5015

Cummings DE., Brandon EP., Planas JV., Motamed K., Idzerda RL., and McKnight GS. Genetically lean mice result from targeted disruption of the RII beta subunit of protein kinase A. *Nature*. 1996; 382: 622-626

Cummings DE., and Schwartz MW. Genetics and pathophysiology of human obesity. *Annu. Rev. Med.*, 2003; 54: 453-471

Della-Fera MA., Qian Hao., and Baile CA. Adipocyte apoptosis in the regulation of body fat mass by leptin. *Diabetes, Obe. Met*. 2001; 3: 299-310

Eun JS., Hong JS., and So JN. Effects of the extracts from hoelen alba, alismatis rhizoma and atractylodes rhizoma on proliferation and differentiation of 3T3-L1 cells. *Kor J Pharmacon*. 1993; 24(2): 131-139

Erlanson-Albertsson C. Uncoupling proteins-a new family of proteins with unknown function. *Nutr. Neurosci.* 2002; 5: 1-11

Erlanson-Albertsson C. The role of uncoupling proteins inthe regulation of metabolism. *Acta. Physiol. Scand.* 2003; 178: 405-412

Fleury C., Neverova M., Collins S., Raimbault S., Champigny O., Levi-Meyrueis C., Bouillaud F., Seldin MF., Surwit RS., Ricquier D., and Warden CH. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nature Genet*. 1997; 15: 269-272

Flier JS. Leptin expression and action: new experimental paradigms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.. 1997; 94: 4242-4245

Friedman JM., and Halaas KL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 1998; 395: 763-770

Gregoire FM., Smas CM., and Sul SH. Understanding adipocyte differentiation. *Physiological reviews*. 1998; 78(3): 783-809

Halaas JL., Gajiwala KS., Maffei M., Cohen SL., Chait BT., Rabinowitz D., Lallon RL., Burley SK., Friedman JM. Weight reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science.* 1995; 269: 543-546

Holm C. Molecular mechani는 regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. Biochemical Society Transactions. 2003; 31: 1120-1124

Horton JD., Shimomura I., Brown MS., Hammer RE., Goldstein JL. and Shimano H. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Clin. Invest*. 1998; 101: 2331-2339

Hu E., Kim J., Sarraf P., Spiegelman B. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPAR gamma. *Science*. 1996; 274: 2100-2103

Hurst H. Transcription factors 1: bZIP proteins. *Protein Profile* 1994; 1: 123

Hwang CS., Loftus TM., Mandrup S., and Lane D. Adipocyte differentiation and leptin expression. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 1997; 13: 231-259

Issemann I., and Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 1990; 347: 645-649

Karikura M., Miyase T., Tanizawa H., Taniyama T., Takino Y, Studies on absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. VII. Comparison of the decomposition modes of ginsenoside-Rb1 and -Rb2 in the digestive tract of rats. *Chem. Pharm. Bull.* 1991; 39: 2357-2361

Kawabe Y., Sato R., Matsumoto A., Honda M., Wada Y., Yazaki Y., Endo A., Takano T., Itakura H. and Kodama T. Regulation of fatty acid synthase expression by cholesterol in human cultured cells. *Biochem. Biophys. Res. Com*. 1996; 219: 515-520

Kim JB., and Spiegelman MB. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differntiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev*. 1996; 10: 1096-1107

Kim YS., and Choi YK. Adipose tissue and fat cell metabolism. *J. Kor Sor Study Obesity.* 1992; 1(1): 48-52

Kim YS., Kim DS., and Kim SI. Ginsenoside Rh2 and Rh3 induce differentiation of HL-60 cells into granulocytes: modulation of protein

kinase C isoforms during differentiation by ginsenoside Rh2. *Int. J. Biochem. Cell. Biol*. 1998; 30: 327-338

Kim JC., and Kang SA. Effect of hight carbohydrate diet on werum leptin and lipids consentratin in rat. *Korean J Nutration.* 2001; 34(2): 123-131

Klaus S. In *Adipose tissues* (Klaus S. Ed.) Eurekha.com/ Landes Bioscience, Medical intelligence Unit, Austin, Texas USA. 2001; 1-10

Klaus S. Adipose tissue as a regulator of energy balance. *Current Drug Targets.* 2004; 5: 241-250

Kopelman PG., and Stock MJ. Clinical obesity. *Blackwell Oxford*. 1998

Kozak UC., Kopecky J., Teisinger J., Enerback S., Boyer B., and Kozak LP. An upstream enhancer regulating brown-fat-specific expression of the mitochondrial uncoupling protein gene. *Mol. Cell. Biol.* 1994; 14: 59-67

Kumar MV., Moore RL., and Scarpace PJ. β3-adrenergic regulation of leptin, food intake, and adiposity is impaired with age. *Pflugers Arch*. 1999; 438: 681-688

Lee YN., Lee HY., Chung HY., Kim SI., Lee SK., Park BC., and Kim KW. In vitro insuction of differentiation by ginsenosides in F9 teratocarcinoma cells. *Eur. J. Cancer*. 1996; 32A(8): 1420-1428

Lin J., Wu Hai., Tarr PT., Zhang CY., Wu Z., Boss O., Michael LF., Puigserver P., Isotani E., Olson EN., Lowell BB., Bassel-Duby R., and Spiegelman BM. Transcriptional co-activator PGC-1α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*. 2002; 418: 797-801

Long SD., and Pekala PH. Regulation of GLUT4 gene expression by arachidonic acid. Evidence for multiple pathways, one of which requires oxidation to prostaglandin E_2. *J. Biol. Chem*. 1996; 271: 1128-1144

MacDougald OA., Hwang C., Fan H., and Lane MD. Regulated Expression of the Obese Gene Product (Leptin) in White Adipose Tissue and 3T3-L1 Adipocytes. P*roc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92: 9034-9037

MacDougald OA., and Lane MD. Transcriptional Regulation of Gene Expression During Adipocyte Differentiation. *Annu. Rev. Biochem*. 1995; 64: 345-373

Minokoshi Y., Carling D., and Kahn BB. Leptin stimulates fatty-acid oxidaion by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*. 2002; 415:

339-343

Montague CT., Prins JB., and O'Rahilly S. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*. 1997; 387: 903-908

Moustaid N., and Sul HS. Regulation of expression of the fatty acid synthase Gene in 3T3-L1 cells by differentiation and triiodothyronine. *J. Biol. Chem*. 1991; 266: 18550-18554

Osborne TF. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J. Biol. Chem*. 2000; 275: 32379-32382

Palou A., Pico C., Bonet L., and Oliver P. The uncoupling protein, thermogenin. *Biochemistry and Cell Biology.* 1998; 30: 7-11

Park KH., Shin HJ., Song YB., Hyun HC., and Cho HJ. Possible role of ginsenoside Rb1 on regulation of rat liver triglycerides. *Biol. Pharm. Bull*. 2002; 25: 457-460

Porras A., Alvarez AM., Valladares A., and Benito M. TNF-α induces apoptosis in rat fetal brown adipocytes in primary culture. *FEBS Lett*. 1997; 416: 324-328

Puigserver P., Wu Z., Park CW., Graves R., Wright M., and Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*. 1998; 92: 829-839

Qian H., Azain MJ., Compton, MM., Hartzell DL., Hausman GJ., and Baile CA. Brain administration of leptin causes deletion of adipocytes by apoptosis. *Endocrinology*. 1998; 139: 791-794

Reddy P., and Chow MSS. Focus on orlistat: A nonsystemic inhibitor of gastrointestinal lipase for weight reduction in the management of obesity. *Formulary*. 1998; 33: 943-959

Reidy SP., and Weber JM. Leptin: An essential regulator of lipid metabolism. *Comparative Bio Chem Phys Part A*. 2000; 125: 285-297

Reusch JEB., Colton LA., and Klemm DJ. CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Mol. Cell. Biol.* 2000; 20: 1008-1020

Ricquier D., and Bouillaud F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J.* 2000; 345(pt 2): 161-179

Schoonjans K., Staels B., and Auwerx J. The peroxisome proliferator activaated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and

adipocyte differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1996; 1302: 93-109

Sekiya K., and Okuda H. Enhancement of adipose differentiation of mouse 3T3-L1 fibroblasts by ginsenosides. *Phytotherapy research.* 1987; 2: 58-60

Semenkovich CF. Regulation of fatty acid synthse (FAS). *Prog. Lipid. Res*. 1997; 36: 43-53

Shimabukuro M., Newgard CB., and Unger RH. Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997; 94: 4637-4641

Slieker LJ., Sloop KW., and Surface PL. Differntiation method-dependent expression of leptin in adipocyte cell line. *Biochem. Biophy. Res. Com*. 1998; 251: 225-229

Soukas A., Cohen P., Socci ND., and Friedman JM. Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes & Development*. 2000; 14: 963-980

Souza S., Muliro K., Liscum L., Lien P., Yamamoto Y., Schaffer J., Dallal G., Wang X., Kraemer F., Obin M., Greenbergg A. Modulation of

hormone-sensitive lipase and protein kinase-A-mediated lipolysis by perilipin A in an adenoviral reconstituted system. *J. Biol. Chem.* 2001; 277: 8267-8272

Susulic VS., Frederich RC., Lawitts J., Tozzo E., Kahn BB., Harper ME., Himms-Hagen J., Flier JS., and Lowell BB. Targeted Disruption of the β-Adrenergic Receptor Gene. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 29483-29492

Student AK., Hsu RY., and Lane MD. Induction of fatty acid synthetase synthesis in defferentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem*. 1980; 255: 4745-4750

Walczak R., and Tontonoz P. PPARadigms and PPARadoxes: expanding orles for PPARγ in the control of lipid metabolism. *J. Lipid. Res.* 2002; 43: 177-186

Wang MY., Lee Y. and Unger RH. Novel Form of Lipolysis Induced by Leptin. *J. Biol. Chem*. 1999; 274: 17541-17544

Wang YX., Lee C., Tiep S., Yu RT., Ham JJ., Kang H., and Evans R. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 2003; 113: 159-170

Wu Z., Puigserver P., Andersson U., Zhang C., Adelmant G., Mootha V., Troy A., Cinti S., Lowell B., Scarpulla RC., and Spiegelman BM. Mechanism controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*. 1999; 98: 115-124

Yamamoto M., and Uemura T. Long-term ginseng effects on hyper lipidemia in man with further study of its action on atherogenesis and fatty liver in rats. *Proc. 4th Int"l Ginseng Symp.* 1984; 13-20

Yarwood SJ., Kilgour E., and Anderson NG. Cyclic AMP potentiates growth hormone-dependent differentiation of 3T3-F442A preadipocytes: possible involvement of the transcription factor CREB. *Mol. Cell. Endocrinol*. 1998; 138: 41-50

Yeh WC., Cao Z., Classon M., and McKnight SL. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev*. 1995; 9(2): 168-181

Yokozawa T., et al. Studies on the mechanism of the hypoglycemic activity of ginsenoside-Rb in streptozotocin-diabetic rats. *Chem. Pharm. Bull*. 1985; 33: 869-872

Zhou YT, Newgard CB and Unger RH. Induction by leptin of uncoupling protein-2 and enzymes of fatty acid oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997; 94: 6386-6390

Zhou YT., Shimabukuro M., Lee Y., Koyama K., Trieu F., and Unger RH. Leptin normalizes the impaired response of proinsulin mRNA to long chain fatty acids in heterozyous Zucker diabetic fatty rats. *J. Biol. Chem*. 1997; 272: 25648-25651

Zhou YT., Wang ZW., Higa M., Newgard CB., and Unger RH. Reversing adipocyte differentiation: Implications for treatment of obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96: 2391-2395

송영득. 지방세포의 분포와 생리. 대한비만학회지. 1999; 8(1)

성종환, 소남우, 전보현, 장재철. 백삼 및 홍삼추출물이 고지방 식이 급여 흰쥐의 혈청 지질 함량에 미치는 영향. *G. Ginseng. Res.* 2004; 28(1): 33-38

오승준, 김영설, 박철영, 김성운, 양인명, 김진우, 최영길, 팽정령, 신현대. 홍삼 복합체의 체지방 감소 작용 기전의 연구. *대한비만학회지*. 2000; 9(4): 209-218

오승준, 정인경, 김영설, 최영길, 팽정령, 배정환, 신현대. 비만증에서 홍삼 복합 제품의 체지방 감소효과의 연구. *경희의학*. 1999; 15: 157-165

이홍규. 비만과 관련된 질환. *대한비만학회지.* 1992; 1: 34-39

주종재. 항비만성 천연물 거맥 및 복합처방제의 체지방 감소 효과에 관한 연구. *한국인삼연초연구원 연차보고서*. 1998

주충노. Biochemical studies on ginseng saponins. The effect of ginseng asponin on hypercholessterolemia induced by prolonged cholesterol feeding in rabbits. *Korean Biochem. J.* 1980; 13(1): 51-59

주충노, 윤수희. 인삼사포닌의 고콜레스테롤 혈증 강화작용에 관한 연구. *Korean J. Ginseng sci.* 1993; 17: 1-12

주충노, 이희봉, 김두식. 한국산 인삼 사포닌의 지질대사에 미치는 영향. *Korean Biochem. J.* 1977; 10: 71-84