



## 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

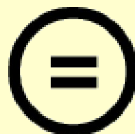
다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 



理學碩士 學位論文

Investigation of adipocyte differentiation  
mechanism of antiobesity regulatory  
compound widdrol

指導教授 金 昞 祐

2009 年 2 月

東 義 大 學 校 大 學 院

生 命 應 用 學 科

朴 志 焄



理學碩士 學位論文

Investigation of adipocyte differentiation  
mechanism of antiobesity regulatory  
compound widdrol

指導教授 金 昞 祐

이 論文을 理學 碩士學位論文으로 提出함

2008 年 12 月

東 義 大 學 校 大 學 院

生 命 應 用 學 科

朴 志 焄

朴 志 焄의 理學碩士 學位論文을 認准함

主審 김 광 현 ㉠

委員 권 현 주 ㉠

委員 김 병 우 ㉠

2008 年 12 月

東 義 大 學 校 大 學 院

# *Sesquiterpene*계 천연물 widdrol의 항비만 작용기작 규명

박 지 훈

동의대학교 대학원 생명응용학과

## 요 약

비만 및 당뇨병, 고혈압, 동맥경화증 등 대사증후군의 발생은 지방 조직 뿐만 아니라 체내 다양한 조직에 지방이 축적되는 세포 내 지방 과부하가 공통적인 기전으로 알려져 있다. 지방세포 내 지방 과부하, 즉 지방세포 분화를 저해시켜 새로운 비만치료제를 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 또한 지금까지 외국에서 개발되어 시판되고 있는 비만치료제의 대부분은 화학적으로 제조된 의약품인 반면 우리나라에서는 천연물로부터 비만치료제를 개발하려는 연구가 활발히 진행 중이다. 천연물 의약은 합성의약품에 비해 상대적으로 부작용 및 독성이 적고 우리나라의 경우 전통의약 관련 전통지식이 다양하게 축적되어 있으므로 외국에 비해 천연물로부터 비만치료제의 개발에 유리한 입장이라 할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 *sesquiterpene*계 천연물인 widdrol을 이용하여 지방세포에서의 lipolysis와 지방세포 분화억제를 확인하고 그 mechanism을 밝히고자 하였다. Preadipocyte인 3T3-L1을 완전한 adipocyte로 분화시킨 뒤 Oil Red O staining과 glycerol 방출량 측정 등으로 widdrol이 지방세포에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. 그 결과 지방세포에 축적되는

triglyceride양이 현저하게 줄어들었으며, glycerol 방출량이 증가하여 widdrol이 lipolysis를 일으킴을 확인하였다. 또한 microarray를 통해 지방세포 분화관련 유전자의 발현 변화를 확인하였고 단백질 발현 양상을 확인하기 위해 western blot을 시행하였다. 그 결과 지방세포분화에 중요하게 작용하는 C/EBP family와 PPAR<sub>γ</sub>의 발현 저하를 확인하였다. 또한 지방세포 분화에 관여하는 세포주기 조절 전사인자인 E2F, pRb의 단백질 발현 저하와 p21의 단백질 발현 증가도 함께 확인하였다. 따라서 본 연구 물질인 *sesquiterpene*계 천연물인 widdrol은 축적된 triglyceride를 분해시켜 lipolysis를 일으킴과 동시에 지방세포분화관련 유전자인 C/EBP family와 PPAR<sub>γ</sub>, E2F, pRb 등의 제어함으로써 differentiation inhibition을 일으키는 물질로서 비만치료제로 개발이 가능할 것으로 사료된다.

## 목 차

1. 초록 .....	i
2. 목차 .....	iii
3. 그림목차 .....	v
4. Schem 목차 .....	vii
5. Table 목차 .....	viii
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	21
1. Cell culture .....	21
2. Differentiation of 3T3-L1 preadipocyte .....	21
3. 재료 구입 및 분리 .....	21
4. Oil Red O staining .....	22
4.1. Lipolysis .....	22
4.2. Differentiation inhibition .....	22
5. Glycerol 방출량 측정 .....	23
6. Microarray 분석 .....	23
7. Western blot analysis .....	24
III. 결과 및 고찰 .....	26
1. <i>Juniperus chinensis</i> 활성물질 분리 .....	26
2. Oil Red O staining에 의한 <i>Juniperus chinensis</i> 추출물 활성 효과 확인 .....	28
3. Widdrol 분리 .....	31
4. Widdrol의 triglyceride 분해 효과 .....	34

5. Widdrol의 lipolysis 효과 .....	37
6. Widdrol의 diferentiation inhibition 효과 .....	39
7. Microarray .....	42
7.1. Lipolysis .....	42
7.2. Differentiation inihbition .....	44
8. Western blot analysis .....	46
 IV. 결론 .....	 48
V. 참고 자료 .....	54
VI. Abstract .....	60



## 그림 목 차

Fig. 1. The world population of obesity. ....	2
Fig. 2. The patent application rate of material of a natural substance obesity drug. ....	4
Fig. 3. The patent application rate of effect of a natural substance obesity drug. ....	6
Fig. 4. Triglyceride accumulation of adipocyte. ....	7
Fig. 5. Differentiation of 3T3-L1 preadipocyte. ....	8
Fig. 6. Program of adipocyte differentiation. ....	11
Fig. 7. Analysis gene expression by adipocyte differentiation program a step. ....	12
Fig. 8. Schematic presentation of the pathway in clonal expansion. ....	17
Fig. 9. Schematic presentation of the lipolysis pathway. ....	19
Fig. 10. photographs of triglyceride contents changes of 3T3-L1 cells after <i>Juniperus chinensis</i> extract treatment 48 hours followed by Oil Red O staining. ....	29
Fig. 11. Triglyceride contents was determined by Oil Red O staining after treatment of <i>Juniperus chinensis</i> extract for 48 hours. ..	30
Fig. 12. Structure of widdrol. ....	33
Fig. 13. Photographs triglyceride contents changes of 3T3-L1 cells after widdrol treatment 48 hours followed by Oil Red O staining. ..	35
Fig. 14. Dose-dependence of widdrol treatment on triglyceride contents. ....	36
Fig. 15. Glycerol release was determined treatment of widdrol for 48 hours. ....	38
Fig. 16. Photographs triglyceride accumulation changes of 3T3-L1 cells	

adipocyte differentiation treatment followed by Oil Red O staining. ....	40
Fig. 17. Triglyceride accumulation was determined by Oil Red O staining after treatment of widdrol for adipocyte differentiation. ....	41
Fig. 18. Effects of widdrol on differentiation inhibition protein expression in 3T3-L1 cells. ....	47
Fig. 19. Schematic presentation of the lipolysis pathway. ....	50
Fig. 20. Schematic presentation of differentiation inhibition of the PPAR <sub>γ</sub> pathway. ....	52
Fig. 21. Schematic presentation of the differentiation pathway in clonal expansion. ....	53

## Schem 목 차

Schem 1. Procedure of extracting from the <i>Juniperus chinensis</i> . ....	27
Schem 2. Widdrol extraction from <i>Juniperus chinensis</i> . ....	32

## Table 목 차

Table 1. List of related lipolysis genes in 3T3-L1 cell treated with widdrol 15 $\mu$ g/ml .....	43
Table 2. List of related adipocyte differentiation genes in 3T3-L1 cell treated with widdrol 15 $\mu$ g/ml .....	45

## I. 서 론

현대인의 사망원인으로 상위그룹을 차지하는 질환들은 식생활을 포함한 생활습관의 불균형에 의한 것으로 보고되고 있다. 올바른 식생활에 의해 섭취된 영양은 무엇보다도 중요하며 영양 상태에 따라서 질병이환율의 감소 및 질환의 치유가 가능하다. 그 중 비만은 보통 BMI가  $30\text{kg/m}^2$ 인 경우, 체지방량이 남자의 경우 체중의 25% 이상, 여자의 경우 체중의 30% 이상인 경우로 정의할 수 있다. 비만은 생활습관의 변화 등으로 인해 우리나라를 비롯하여 전 세계적으로 빠르게 확산되고 있는 대사성 질환으로서 세계보건기구(WHO)는 비만을 1996년에 이미 질병으로 규정한 바 있으며 2005년 4억 명인 세계 비만 인구가 2015년에는 7억 명에 이를 것으로 추산하고 있다 (Fig. 1.)(1-3).

비만의 원인으로는 유전적 요인, 식습관, 생활습관, 에너지 대사의 불균형 등이 있고 비만의 문제는 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 심장질환, 관절염, 호흡기질환, 성기능장애, 암 발생 등 각종 질환의 발생 가능성을 증가시키는 위험요소로서 국민 건강을 위협할 뿐만 아니라 이로 인한 막대한 사회적 비용 지출을 초래하여 국가 경쟁력에 타격을 주는 심각한 문제로 인식되고 있다 (1,4-14). 비만치매에 대한 사회적 관심 고조와 더불어 비만치료제 분야의 큰 시장 잠재력으로 인하여 국내외 제약업체들에 비만치료제 개발에 많은 관심을 기울이고 있다. 비만치료제는 2010년에 전 세계적으로 약 20억 달러, 우리나라의 경우 약 700억 원 규모의 시장을 형성할 것으로 예상되며 향후 시장규모가 지속적으로 증가할 것으로 전망된다. 이러한 경향은 전체 의료비의 5~10% 가량이 비만 분야에 사용되는 산업화된 국가들을 중심으로 빠르게 확산되고 있으나 현실적으로 수요를 충족시켜 줄만한 효과적인 제품이 시장에 나와 있지는 못한 상태이다.

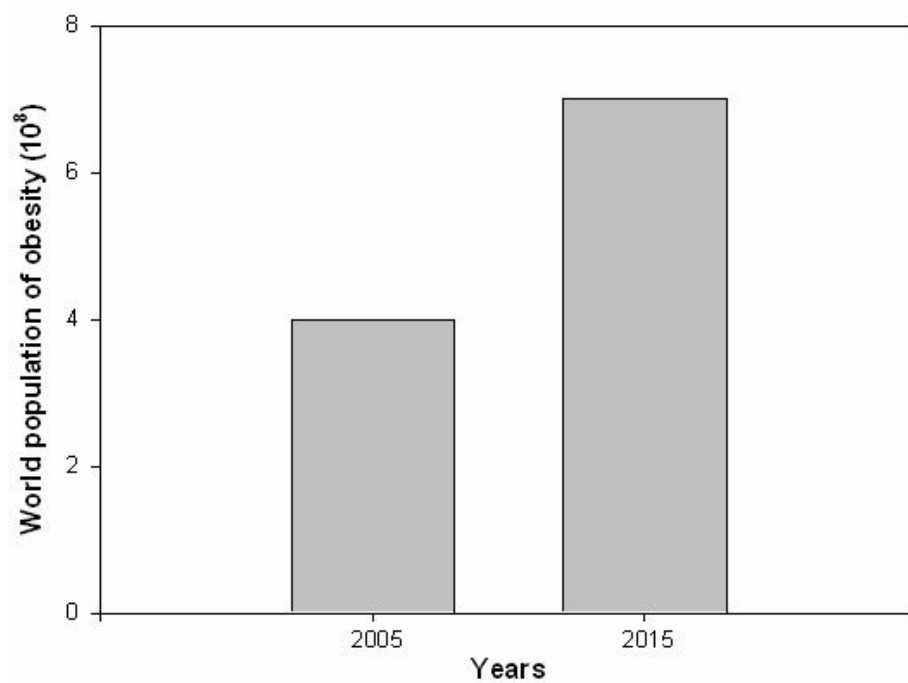


Fig. 1. The world population of obesity.

현재 비만치료제는 비만의 원인인 지방의 소화·흡수를 억제하는 orlistat 제제 (상품명 : 제니칼)와 식욕을 억제하여 음식물 섭취를 줄이고 에너지 소비를 증가시키는 sibutramine (상품명 : 리덕틸)이 시장을 양분하고 있으며 생명공학 기술의 발전에 따라 새로운 비만 치료 기전이 밝혀지면서 다양한 활성물질이 개발되고 있다. 지금까지 외국에서 개발되어 시판되고 있는 비만치료제의 대부분은 화학적으로 제조된 의약품인 반면 우리나라에서는 천연물로부터 비만치료제를 개발하려는 연구가 활발히 진행 중이다. 천연물 의약은 합성 의약품에 비해 상대적으로 부작용 및 독성이 적고 우리나라의 경우 전통의약 관련 전통지식이 다양하게 축적되어 있으므로 외국에 비해 천연물로부터 비만치료제의 개발에 유리한 입장이라 할 수 있다.

특허청 자료에 의하면 지난 10년간 (1998년~2007년) 천연물 비만치료제 관련 특허출원은 총 178건으로서 2000년에 5건에 불과하던 출원건수가 2007년에는 31건으로 크게 증가하였다. 천연물 소재별 출원동향을 살펴보면 식물 추출물에 관한 출원이 전체 출원의 92%로서 광물 (2%) 및 동물, 미생물 추출물 (6%)에 비해 압도적으로 많았고 각 출원에 기재된 천연물 소재가 대부분 상이한 것으로 보아 다양한 천연물 소재로부터 비만치료제를 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있음을 알 수 있다(Fig. 2.)(15).

이러한 이유로 본 연구에서도 다양한 약용식물로부터 비만 활성물질을 탐색하던 중 후보물질로 향나무 (*Juniperus chinensis*)를 선정하였고 이 향나무 (*Juniperus chinensis*)에서 유효물질로서 항 비만후보 물질을 찾고자 하였다. *Juniperus chinensis*는 측백나뭇과로 한국, 일본, 중국 및 몽골에 분포한다(16). 주로 향료, 관상으로 쓰이고 약용으로는 주로 비듬, 백설피, 습진, 무좀 등에 이용된다.

*Juniperus chinensis*에서 항 산화물질인 quercetin, naringenin, taxifolin, aromadendrin, isoquercetin이 *Juniperus chinensis*의 심재에서부터 분리되었다. 그리고 podophyllotoxin이 포함된 *Juniperus chinensis*의 잎은 lignan과 함께 항 진균활성을 가지고 있다(17-20). 하지만 항 비만치료제로서의 *Juniperus chinensis*의 생물학적인 기능과 비만과 관련된 연구는 아직 없다.

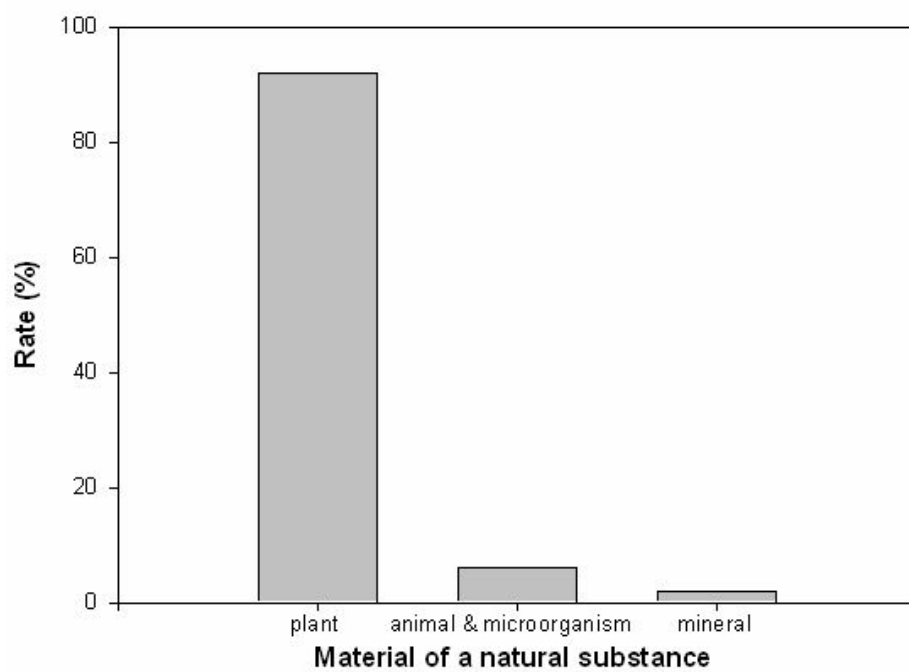


Fig. 2. The patent application rate of material of a natural substance obesity drug.



또한 수많은 식품소재 및 천연물질이 비만 효능을 나타내는 것으로 보고되고 있으나 이러한 천연물질로 인한 지방 세포내의 수많은 유전자들 및 단백질들의 변화를 관찰하는 연구 보고들이 드물다. 따라서 본 연구에서는 *Juniperus chinensis*에서 분리한 유효물질의 항 비만활성은 물론 그 작용 메커니즘까지 규명하고자 하였다.

특허청 자료에 비만치료제의 작용기전별 출원동향을 살펴보면 지방 등의 소화흡수 저해제 (24%), 지방세포분화 저해제 (12%), 호르몬 조절제 (10%), 열 대사 촉진제 (4%), 식욕 억제제 (3%), 지방산 생성 억제제 (2%), 혈관 신생 억제제 (2%) 등 생명공학기술의 발전을 통해 규명되고 있는 다양한 비만 발생 기전을 활용하여 새로운 비만치료제를 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있음을 알 수 있다(Fig. 3.)(15). 본 연구에서는 지방세포 분화 저해제를 통한 비만 치료제를 찾고자 하였다.

에너지 균형 면에서 볼 때 우리가 사용하는 에너지보다 더 많은 에너지를 섭취하여 칼로리의 잉여상태가 지속되면 체중이 증가하면서 비만이 초래된다. 과잉 에너지의 대부분은 지방산을 거쳐 triglyceride의 형태로써 지방세포에 축적된다(Fig. 4.)(21, 22).

비만은 지방세포와 밀접한 관련이 있으며 이러한 지방형성에 관여하는 지방세포의 생성과 분화 과정 및 이를 조절하는 기전에 대한 연구는 오래 전부터 있어왔다.

일반적으로 지방합성은 다양한 조직으로 분화 가능한 중배엽성 줄기세포를 성숙한 지방세포로 분화시키는 과정으로 이것은 극단적인 조절과 유기적인 전사인자의 cascade반응을 포함한다(22, 23). 유기적인 전사인자에는 peroxisome proliferator activated receptors (PPARs), CCAAT/enhancer binding protein (C/EBPs) 그리고 sterol regulatory element binding protein (SREBP) family 등이 있다(23, 24). 이처럼 지방세포로 분화 되어질 때 많은 유전자들이 관여한다(Fig. 5.).

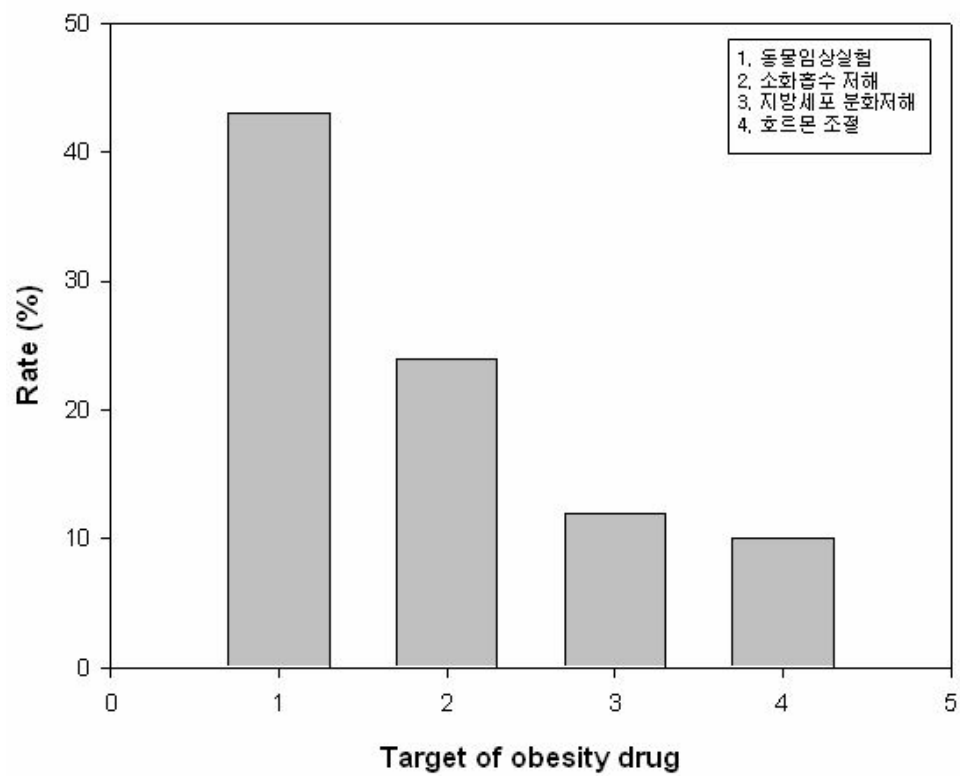


Fig. 3. The patent application rate of effect of a natural substance obesity drug.

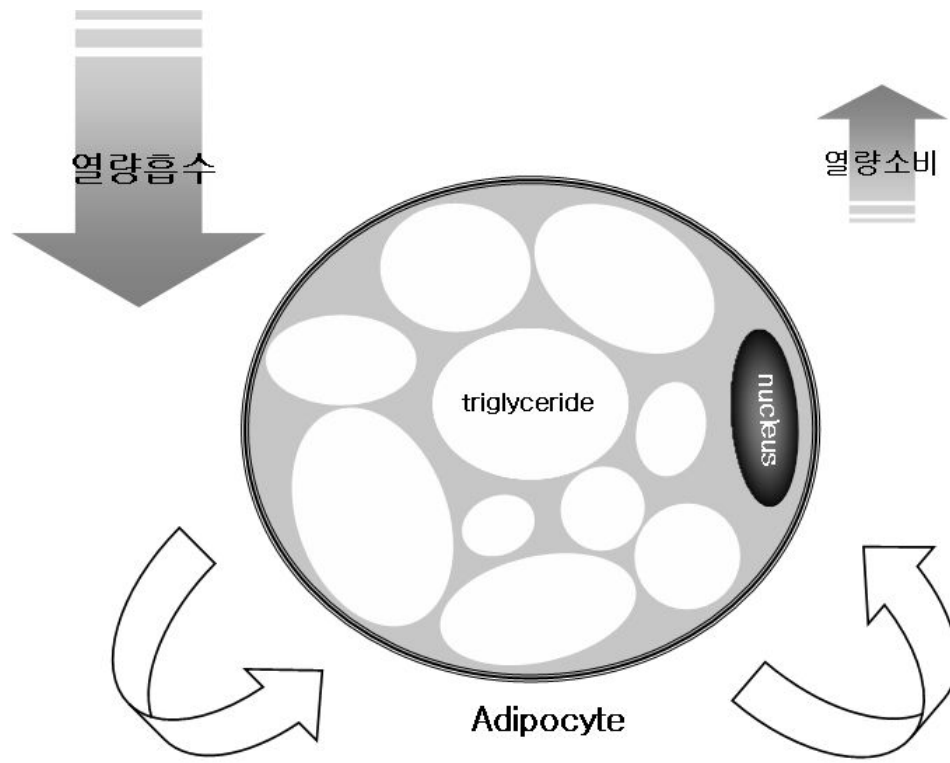


Fig. 4. Triglyceride accumulation of adipocyte.

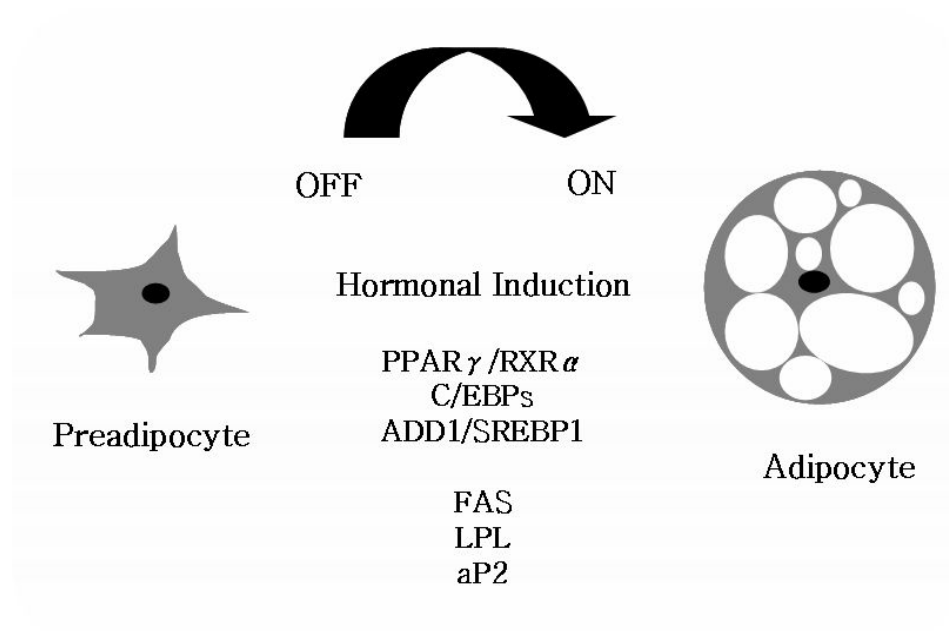


Fig. 5. Differentiation of 3T3-L1 preadipocyte.

3T3-L1을 지방전구세포주로서 인슐린이나 유도물질의 존재 하에 지방세포로 분화하는 특징을 가지고 있고 분화 시 여러 가지 면에서 포유류 지방조직의 성장과 유사한 것으로 알려져 비만에 대한 효과 검증을 위한 실험에 주로 쓰이는 세포주이다(25, 26).

지방세포의 분화는 근육세포나 신경세포 분화와는 달리 여러 호르몬과 다양한 전사인자들의 상호작용을 통하여 매우 복잡하게 이루어진다. 지방세포의 분화과정은 confluence, hormonal induction, clonal expansion, growth arrest와 terminal differentiation 단계로 일어난다(Fig. 6.)(27, 28).

먼저 지방전구세포는 confluence 상태가 되면 세포주기 G0/G1 시기가 되어 growth arrest가 일어난다. 이 후, 적당한 분화자극과 C/EBP $\beta$ 와 C/EBP $\delta$ 의 발현에 의해 한 번 혹은 두 번의 세포분열이 일어나는 clonal expansion 단계에 들어간다(29-31). Clonal expansion 시기에 활성화되어 세포주기를 억제하는 전사인자는 단순히 증식만을 억제하는 것이 아니고 C/EBP family나 PPAR $\gamma$ 와 상호작용하는 것으로 정상적인 분화 프로그램이 진행되고 있는 것으로 보인다(32). 세포주기를 제어하는 전사인자 중에 E2F, Foxo1, Rb, cycline D1이 지방세포 분화에 관여하는 것으로 보고되고 있다(33).

Clonal expansion 시기에는 C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$ 의 발현이 유도됨과 함께 cycline 의존성 kinase (cycline dependent kinase ; CDK)가 활성화되지만 CDK로 인산화된 Rb는 전사인자 E2F로 해리됨으로써 E2F가 활성화되어 DNA 합성에 관여하는 유전자가 발현된다(Fig. 7.)(34-36). E2F 1은 PPAR $\gamma$ 1의 전사를 항진하고 지방세포 분화를 촉진한다. 실제 E2F 1 결손 마우스에서 얻어진 섬유아세포는 지방세포로의 분화능이 저하되어 있다. 또 E2F 4가 결손된 마우스에서 얻어진 섬유아세포는 지방세포로의 분화능이 저하되어 있어서 E2F 4에 의해 PPAR $\gamma$ 1의 전사활성이 억제되어 있는 점에서 E2F 4는 지방세포 분화에 억제적으로 작용하는 것으로 보고 있다. E2F 4는 증식에서 분화에의 스위치에 관여하는 전사인자로 보여 진다. 간장이나 췌장에서 인슐린에 의한 전사조절 mediator인 Foxo1은 CDK inhibitor인 p21 전사를 제어하는 것으로 전구지방세포 증식에 관여하고 있는 것으로 보고 있어 인슐린에 의해 지방세포 분화 유도 기능의 일부를 담당하고 있는 것으로 보고

있다. 그 외에도 세포주기 진행에 중요한 Rb와 C/EBP family, PPAR $_{\gamma}$ 과의 상호작용 cyclin D1과 PPAR $_{\gamma}$ 과의 상호작용의 보고가 있다.

이어 PPAR $_{\gamma}$ 와 C/EBP $_{\alpha}$ 의 발현을 통하여 지방전구세포는 완전한 분화의 형태를 보이기 직전의 단계인 growth arrest의 시기로 접어들게 된다. PPAR $_{\gamma}$ 와 C/EBP $_{\alpha}$ 에 의해 이러한 변화를 보이는 정확한 기작이 밝혀지진 않았다.

Confluent하지 않은 3T3-L1세포에서는 PPAR $_{\gamma}$ 의 활성화가 세포 성장에 관련된 여러 유전자들의 전사를 조절하는 E2F/DP의 전사인자의 DNA 결합능력을 감소시킨다. 전사인자인 E2F family는 다양한 세포의 성장 혹은 분화의 모델에서 세포분열을 촉진하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다(37). 이러한 E2F/DP의 DNA 결합력의 변화는 PPAR $_{\gamma}$ 가 단백질 탈 인산화효소인 PP2A양을 감소시켜 DP-1의 인산화가 증가하면서 나타난다. 또한 NIH-3T3 섬유아세포의 경우 PPAR $_{\gamma}$ 가 발현되면 p18, p21과 같은 cyclin-dependant kinase inhibitor (CDK inhibitor)를 유도하고 C/EBP $_{\alpha}$ 는 p21의 발현을 촉진하거나 안정화시킨다. 실제로 3T3-L1 지방전구세포가 growth arrest를 거쳐 지방세포로 분화함에 따라 p18 (INK4c), p21 (Waf/Cip1), p27 (possibly, Kip1) 등을 포함하는 여러 가지 CDK inhibitor가 활성화되는 것으로 알려져 있다.

마지막 단계인 terminal differentiation은 수일에서 수주의 시간이 걸린다. 즉 지속적인 growth arrest가 일어나면 성숙된 지방세포의 특징이 점차 나타나게 된다. 분화 초기에 섬유아세포와 유사했던 지방전구세포는 형태적으로 둥글게 (morphological rounding-up)되고 lipoprotein lipase 등의 mRNA가 발현되기 시작하며 전사인자인 C/EBP $_{\beta,\delta}$ 의 transient induction이 일어난다. 이 후, PPAR $_{\gamma}$ 와 C/EBP $_{\alpha}$ 가 발현되어 실제로 지방세포의 표현형을 결정짓는 대부분의 유전자들을 조절하거나 그 발현을 활성화시킨다. 이들 유전자들로는 glycerophosphate dehydrogenase (GPDH), acetyl-CoA carboxylase (ACC), malic enzyme (ME), Glut, insulin recetor(IR), adipocyte selective fatty acid binding protein (aP2) 등이 있다(Fig. 8.). 이러한 과정을 통해서 지질 방울 (lipid droplet)들이 세포질에 나타나게 되고, 시간이 지남에 따라 커지고 또 합쳐지면서 하나 혹은 몇 개의 큰 방울

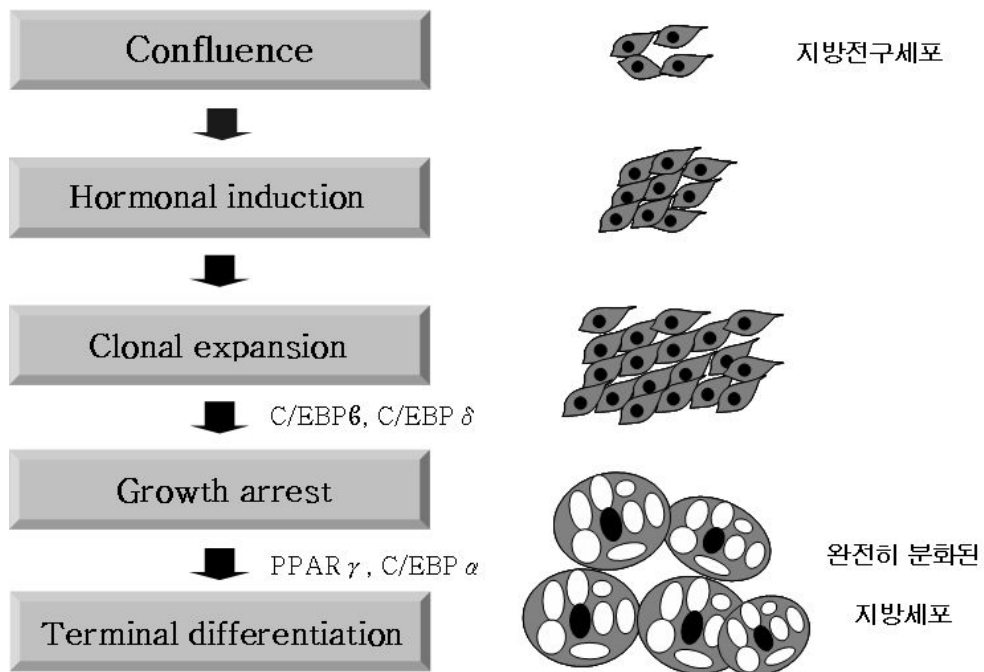


Fig. 6. Program of adipocyte differentiation.

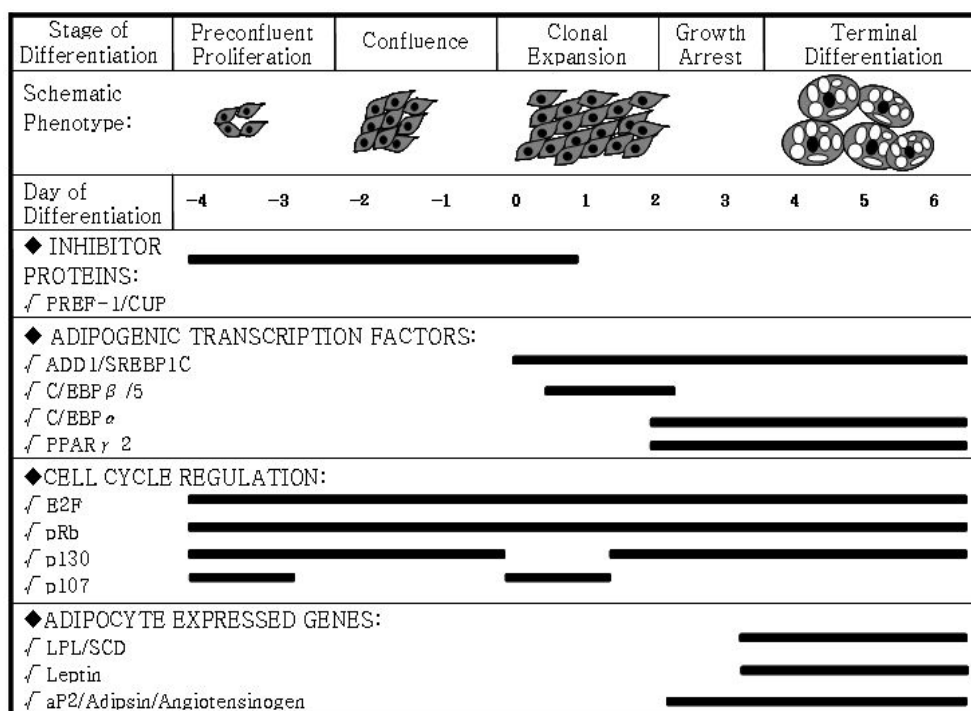


Fig. 7. Analysis of gene expression by adipocyte differentiation program a step.



(droplet)이 된다(38).

일생을 통해 지방전구세포에서 지방세포로 지속적으로 전환되는데 hormonal induction과 같은 많은 외부자극과 복잡한 유전자발현 조절과정을 통하여 일어난다. 지난 10여 년간 이루어진 일련의 연구 결과들에 의하면 이러한 외부 신호는 지방세포 특이적인 유전자 발현 조절 경로를 통하여 조절된다고 알려져 있다. 지방세포 분화를 유도하는 외부 신호 중 인슐린은 가장 널리 알려져 있는 호르몬으로 지방세포의 대사조절에 중추적인 역할을 담당하고 있다. 지방전구세포는 인슐린 자극에 의해 지방세포로 분화를 시작한다(39). 인슐린은 또한 당질의 흡수와 중성지방의 합성을 증가시키는 등의 복잡한 기전을 통해 지질의 형태로 에너지를 저장하고 lipoprotein lipase를 활성화시킴으로써 혈액 내에 순환하는 lipoprotein에서 유래된 지방산 흡수를 촉진시키기도 한다. 지방세포에서 인슐린의 이러한 광범위한 영향은 인슐린에 의해 조절되는 유전자의 전사 증가에 의한 것뿐만 아니라 특정 단백질의 인산화 및 이로 인한 단백질의 신속한 활성화를 수반하여 일어나게 된다. 인슐린에 의해 지방세포 분화가 유도되는 동안 PPAR $\gamma$ , C/EBP family 등의 전사인자들의 전사 발현이 증가하게 된다. 이들 전사인자들은 상호 전사를 유도함으로써 지방세포 분화를 유도하는 것으로 알려져 있다. 이들 전사인자는 지방세포의 분화과정 중 각기 다른 시점에서 발현이 유도되며 서로 상호작용을 통하여 여러 지방세포 특이 유전자들의 발현을 조절하고 지방대사의 활성화와 지방세포 분화를 점진적으로 유도해 나간다.

Peroxisome proliferator activated receptors (PPARs)는 핵수용체 (nuclear hormone receptor) superfamily에 속하며 세 가지 PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ 와 PPAR $\delta$ 가 존재한다. 이 PPAR 전사인자들은 다른 핵수용체인 retinoid X receptor (RXR)와 이성질체 (heterodimer)를 형성하여 표적 유전자의 promoter 또는 enhancer에 존재하는 PPARs response element (PPRE)에 결합한다. PPAR 전사인자들의 경우는 각각 다른 조직에서 특이적으로 발현이 되면 리간드 특이성, cofactor recruitment 등에 의해 서로 다른 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다.

PPAR $\alpha$ 는 간에서 주로 발현되며 지방산의 산화나 독성물질의 중화에 관하

여 염증반응에 연관이 있다. PPAR $\delta$ 는 고루 분포하며 정확한 작용은 아직 밝혀지지 않았다. PPAR $\gamma$ 는 지방조직에서 주로 발현되며 결장, 신장, 근육, 간에도 소량 존재한다. PPAR $\gamma$ 의 isotype인 PPAR $\gamma_1$ 과 PPAR $\gamma_2$  모두 white adipose tissue (WAT)에 존재하기 때문에 PPAR $\gamma$ 는 지방조직생성과 많은 관련이 있으며, 제 2형 당뇨병 치료제로 널리 사용되는 약물인 thiazolidinediones (TZDs)가 PPAR $\gamma$ 의 합성 ligand로 밝혀짐으로써 PPAR $\gamma$ 는 인슐린민감성을 증진시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. PPAR $\gamma$  ligand인 TZDs에는 troglitazone (Rezulin), rosiglitazone (Avandia), pioglitazone (Actos) 등이 있으며 제 2형 당뇨병의 여러 동물모델에서 혈중 glucose, insulin, free fatty acid, triglyceride, 그리고 ketone body 농도를 개선시키는데 효과적이다.

PPAR $\gamma$ 는 지방조직에서 주로 발현되므로 PPAR $\gamma$  target gene은 지방조직에 집중되어 있고 지방조직생성과 lipid 저장에 중요한 역할을 담당한다. PPAR $\gamma$  target gene에는 지방-특이적 표지 유전자 (fat-specific marker gene)인 adipocyte fatty acid binding protein (aP2), LPL, leptin 그리고 TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) 유전자 등이 있다. PPAR $\gamma$  agonist인 TZDs는 당뇨병 치료제로써 혈중 glucose level를 낮추는 효과뿐만 아니라 혈중 지방산의 농도를 낮추고 세포배양 시 지방조직 생성을 유도하였다. 이와 같은 연구결과에 의하면 PPAR $\gamma$ 는 lipid와 glucose 대사 및 지방조직 생성을 조절하는데 중요한 역할을 한다.

지방조직 생성 (adipogenesis)은 지방전구세포 (preadipocyte)가 증식과 분화과정을 거쳐 성숙한 지방세포 (adipocyte)로 되는 것으로써 이때 지질이 축적되고 aP2, LPL, 그리고 adipsin과 같은 지방조직에 특이적인 유전자 (adipose specific gene)가 발현되는데, 이러한 유전자는 PPAR $\gamma$ 와 CCAAT enhancer-binding proteins (C/EBPs)에 의해 조절된다.

Troglitazone이 처리된 분화배지로 3T3-L1 peradipocyte를 배양하면 성숙한 지방세포로 분화되었으며 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  유전자의 발현으로 aP2의 활성이 증가되었다. Troglitazone이 처리된 Zucker rat은 처리되지 않은 rat에 비해 WAT에서 크기가 작은 지방세포의 수는 증가되었고 큰 지방세포의

수는 감소되었으며 세포자연사 (apoptosis)가 일어난 핵이 증가됨으로써 troglitazone에 의해 유도된 PPAR $\gamma$ 는 지방세포의 증식을 유도하였다. Tontonoz 등 (1994)의 연구결과에 의하면 in vitro와 in vivo 실험 모두에서 PPAR $\gamma$  발현은 지방조직이 생성되는 동안 증가되었고 지방조직에 특이적이었으며, 지방세포에 특이적인 유전자 (adipocyte-specific gene)인 aP2의 발현도 증가되었다. 이러한 연구 결과들은 PPAR $\gamma$ 의 활성이 지방조직생성을 유도하는데 필수적인 요소임을 제시하였다.

PPAR $\gamma$ 는 지방조직 생성뿐만 아니라 지방생성 (lipogenesis)에도 중요한 역할을 한다. PPAR $\gamma$ 는 지방조직에서 LPL, ACS, CD36/FAT, 그리고 FATP의 발현을 조절함으로써 지방세포로의 지방산 유입을 조절한다. PPAR $\gamma$  agonist인 BRL49643이 처리된 rat은 처리되지 않은 rat에 비해 brown adipose tissue (BAT)의 무게가 증가하며 BAT에 특이적으로 발현되는 UCP1 유전자 발현이 증가된다. PPAR $\gamma$  agonist인 GW1929가 처리된 Zucker diabetic fatty rat은 acetyl-CoA carboxylase, fatty acid synthase, 그리고 ATP-citrate lyase와 같은 지방생성에 관여하는 유전자의 발현이 증가되고, 이러한 유전자의 발현은 sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP-1)에 의해 촉진된다. 내재성 ligand에 의해 활성화된 PPAR $\gamma$ 는 SREBP-1의 발현을 촉진시켜 SREBP-1에 의해 PPAR $\gamma$ 의 발현도 증가된다. 이러한 결과는 PPAR $\gamma$ 와 SREBP-1이 서로의 활성을 촉진시켜 지방조직의 생성을 촉진한다는 것을 암시한다. 또한 PPAR $\gamma$ 는 leptin 유전자의 발현을 감소시켜 leptin에 의해 유도되는 지방분해 (lipolysis)와 지방산 산화를 제한함으로써 지방생성을 촉진한다. 이러한 연구 결과들을 기초로 할 때 ligand에 의해 활성이 유도된 PPAR $\gamma$ 는 지방조직생성 및 지방생성을 조절하는 주요한 인자임을 암시한다.

CCAAT enhancer binding protein (C/EBP)은 basic-leucine zipper motif를 가진 전사인자로 6가지 isoform이 존재한다. 이들은 모두 상당히 잘 보존된 bZIP domain 부분을 이용하여 homo 혹은 heterodimer를 형성하여 작용한다(40-42). 이들은 지방세포에 한정되어 발현되지는 않으며 granulocyte나 간세포에서도 발현하여 이 세포들의 최종분화에 중요한 기능을 담당하는 것

으로 잘 알려져 있다. 또한 C/EBP는 다양한 표적유전자를 활성화시키는 것 이외에도 감염에 대한 저항성 또는 상처에 대한 조직반응에도 중요한 역할을 한다(43-47).

C/EBP $_{\alpha}$ 와 C/EBP $_{\beta}$ 의 발현은 in vitro에서 잘 알려진 지방세포 분화의 유도 인자이며 대부분의 분화촉진물질들의 구성요소인 cAMP에 의해 증가된다. C/EBP는 전사수준이외에도 다양하게 조절된다. Alternative translational start site로 인해 C/EBP $_{\alpha}$ 와 C/EBP $_{\beta}$ 를 포함한 몇 가지 C/EBP의 isoform이 나타난다. C/EBP isoform 가운데 42kDa C/EBP $_{\alpha}$  isoform은 30kDa isoform보다 강력한 전사 활성화 인자이다(48, 49). p42/p30의 비율은 지방세포 분화가 진행됨에 따라 증가한다. 이와 유사하게 C/EBP $_{\beta}$ 의 20kDa inhibitory isoform은 38kDa active isoform과 비교해서 지방세포 분화 동안 감소한다. 마지막으로 C/EBP의 활성은 다른 family member의 존재에 의해 조절된다. 예를 들어 C/EBP $_{\delta}$ 는 혼자서는 DNA에 결합하지는 못하지만 다른 C/EBP와 dimerization하여 C/EBP의 natural한 dominant-negative inhibitor로서 작용한다.

여러 가지 C/EBP 단백질들은 지방세포의 분화 동안 특이적인 발현 양상을 보인다. 최근의 gain- 혹은 loss-of-function 연구에 따르면 이들 단백질들이 지방세포 분화에 중요한 역할을 담당한다. 분화가 유도된 지방전구 세포주에서 C/EBP $_{\beta,\delta}$  mRNA 및 단백질의 수준은 분화초기에만 잠시 동안 올라간다. 반면 C/EBP $_{\alpha}$ 는 분화가 일어나는 후기 부분 즉 지방세포의 end-product gene의 대부분이 유도되기 바로 직전에 나타난다. C/EBP $_{\beta,\delta}$ 의 pro-adipogenic한 역할은 in vitro 상에서 gain-of-function 연구를 통해 확인되었다. C/EBP $_{\beta}$ 의 ectopic하게 발현시키는 경우 3T3-L1 지방전구 세포가 hormonal inducer 없이도 분화가 유도된다. 또한 C/EBP $_{\delta}$ 로 유사한 실험을 한 결과 분화유도 물질들이 필요하기는 하지만 지방세포 분화가 촉진되었다. C/EBP $_{\beta}$ 는 지방세포 분화를 촉진할 뿐만 아니라 adipocytic lineage로 determination하는데 관여하는 것으로 보인다.

지방세포 분화에 관한 C/EBP $_{\alpha}$ 의 기능을 살펴보기 위해 in vitro에서 C/EBP $_{\alpha}$ 를 3T3-L1 지방전구세포에 과발현 시킨 경우 지방세포 분화가 촉진

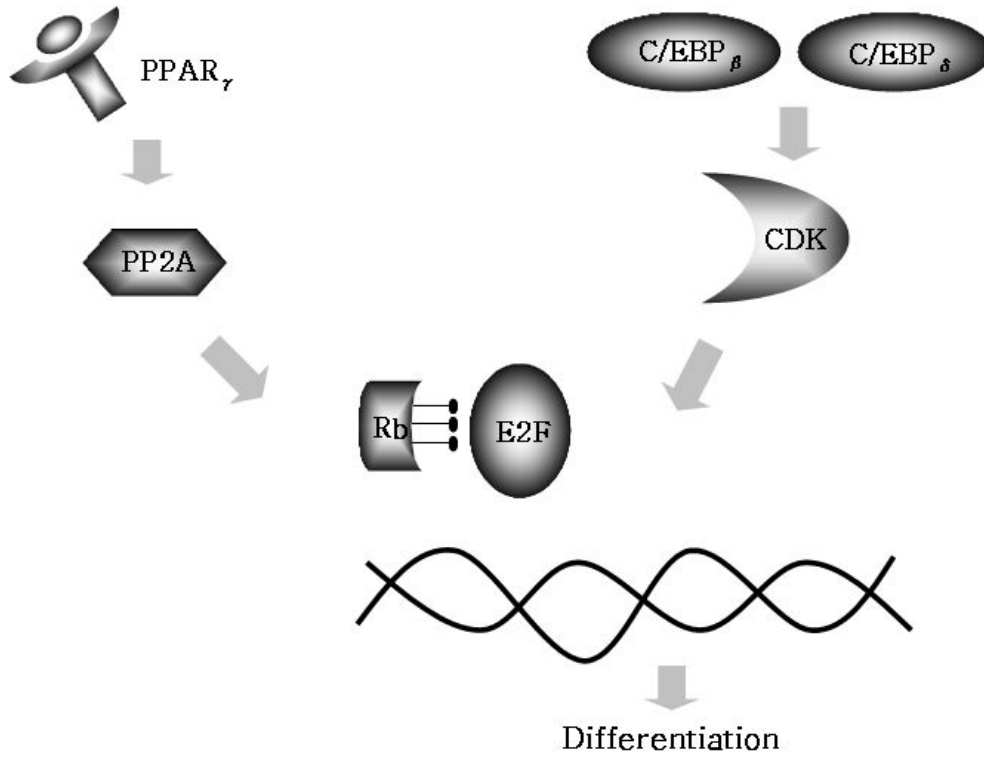


Fig. 8. Schematic presentation of the pathway in clonal expansion.

되며 C/EBP $\alpha$ 의 antisense mRNA를 처리하게 되면 분화가 억제된다.

C/EBP $\alpha$ 가 homozygous하게 결손된 쥐의 경우 백색지방과 갈색지방에서 lipid 축적이 급격히 감소한다. 그러나 이들 쥐의 경우에는 간에서 gluconeogenesis가 활성화되지 않기 때문에 태어난 후 일주일 이내에 hypoglycemia에 걸린다. 따라서 이들 쥐의 비만도가 감소된 것은 심각한 대사 이상에 의한 것이라고 볼 수 있다.

또한 adipocyte가 분화할 때 분화 억제, 즉 differentiation inhibition을 target으로 하여 비만치료제를 연구·개발하는 것 이외에도 lipolysis라고 하는 지방분해에 의해서도 비만치료제의 접근이 가능하다.

Lipolysis는 preadipocyte가 완전히 분화된 adipocyte내에 축적된 triglyceride가 분해되는 것으로 분해된 triglyceride는 fatty acid와 glycerol로 되며 계속적으로 triglyceride가 분해되면 glycerol은 세포 밖으로 방출된다(50). Lipolysis가 일어나는 mechanism은 아직 많이 밝혀지지 않았지만 대부분 protein kinase A (PKA) pathway에 의해 lipolysis가 일어난다(51). Lipolysis signal이 오게 되면 G- protein을 거쳐 adenylylate cyclase (AC)가 활성화된다. 활성화된 adenylylate cyclase는 ATP (adenosine triphosphate)를 cAMP (cyclic adenosine monophosphate)로 전환시킴으로 adenylylate cyclase가 활성화되면 세포 내에 cAMP농도가 증가하게 된다(52). 세포 내 cAMP의 농도가 증가하면 여러 hormone의 활성화가 이루어진다. 먼저 protein kinase A가 활성화되며 hormone sensitive lipase (HSL)과 perilipin A에 인산화가 일어나면서 활성화 된다. 이러한 hormone sensitive lipase의 활성화로 인해 triglyceride는 세포질에서 fatty acid와 glycerol로 분해되며 계속적인 lipolysis 자극이 오면 glycerol은 세포 밖으로 방출된다(Fig. 9). 이러한 lipolysis factors에는  $\beta$ -adrenergic agonists가 있으며 반대로 antilipolytic factors에는 insulin이나 adenosine 등이 있다.

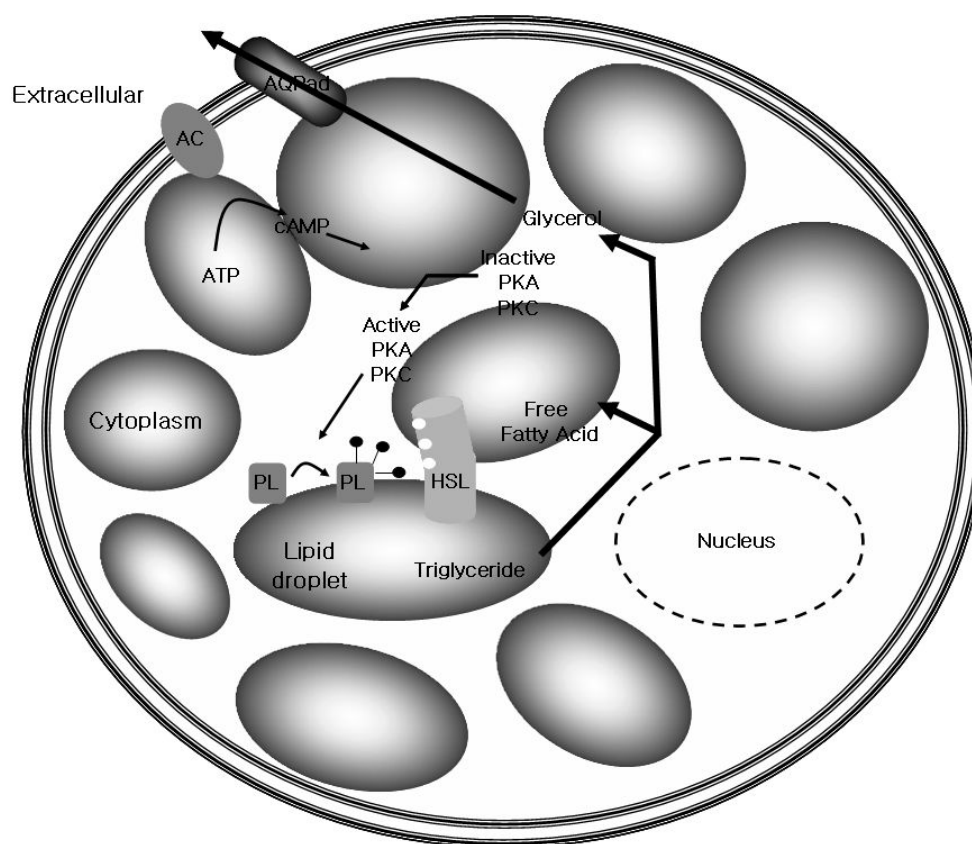


Fig. 9. Schematic presentation of the lipolysis pathway.

이에 본 연구는 지방세포 분화에 중요한 역할을 하는 전사인자 PPAR $\gamma$ , C/EBP family와 E2F family, Rb 등 전사인자에 의해 조절되는 유전자들을 target으로 하여 3T3-L1에서 항 비만기작을 연구하였다. 또한  $\beta$ -adrenergic agonists와 같은 lipolysis를 일으키는 항 비만활성을 가지는 물질을 찾고자 하였다.



## II. 재료 및 방법

### 1. Cell culture

Mouse embryo 3T3-L1 지방전구세포는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하였으며 10% bovine calf serum (BCS), 0.1% gentamycin이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였다.

### 2. Differentiation of 3T3-L1 preadipocyte

3T3-L1 지방전구세포를 12 well plate에 10% fetal bovine serum (FBS), 0.1% gentamycin이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 배양하여 confluent 상태가 되게 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 배양하였다. Confluent 상태로 2일 더 배양하여 2일 후에는 분화배지 (10% FBS, 0.1% gentamycin, 10 $\mu$ g/ml insulin (SIGMA), 0.5 $\mu$ M dexamethasone, 0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma-Aldroch Chemie Gmbht, Riedstr.2, D-89555, Steinheim, Germany), (MDI))로 교환하여 2일간 배양하였다. 지방세포로의 분화를 촉진하기 위해 10% FBS, 0.1% gentamycin, 10 $\mu$ g/ml insulin이 포함된 DMEM배지에 3일간 배양하였다. 3일간 배양 후 완전히 분화시키기 위해 DMEM배지에 10% FBS, 0.1% gentamycin을 첨가하여 2일간 더 배양하였다.

### 3. 재료의 구입 및 분리

향나무 (*Juniperus chinensis*)는 한약도매협회 흥환약업사 (서울)에서 구입하였으며, 자연 건조 시킨 뒤 잘게 세절하여 사용하였다. 향나무(*Juniperus chinensis*)에서 활성성분을 찾기 위해 향나무 1 kg을 MeOH을 이용하여 추출하여 감압농축을 하여 추출물 67.29 g을 얻었다.

이를 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O를 1:1 비율로 녹여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>층을 분획하였다. 이를 감압

농축한 후 용매  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , MeOH, hexane 등의 유기용매를 이용하여 silicagel column을 시행하여 유효성분을 분리하였다. 분리한 widdrol은 silicagel TLC plate와 50%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 를 이용하여 thin layer chromatography를 시행하여 순수물질임을 확인하였다. 이를 2D-NMR과 mass를 이용하여 widdrol 구조를 규명하였다.

## 4. Oil Red O staining

### 4.1. Lipolysis

Triglyceride 함량을 측정하기 위해 Oil Red O staining을 시행하였다(53). 3T3-L1 지방전구세포를 12 well plate에 분주한 후 완전히 분화가 되도록 10~12일간 배양하였다. 완전히 분화가 되면 widdrol을 농도별로 처리하여 48시간 반응하였다. 48시간 뒤에 배지를 제거하고 차가운 phosphate buffered saline (PBS)에 2번 washing 한 후 10% formalin을 처리하여 실온에서 1시간 고정시켰다. 고정시킨 뒤 formalin을 제거하고 60% isopropanol로 행군 뒤 Oil Red O working solution (SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH P.O. 1120, 89552 Steinheim, Germany)을 실온에서 20분간 염색하였다. 이 때 Oil Red O working solution은 0.7 g Oil Red O를 200ml isopropanol에 녹인 뒤 다시 6:4로 희석하여 필터 후 사용하였다. 염색 후 Oil Red O working solution을 제거하고 물로 3회 washing한 뒤 100% isopropanol에 용출시켜 spectrophotometer를 이용하여 500nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 4.2. Differentiation inhibition

Mouse embryo 3T3-L1 지방전구세포가 지방세포로 분화할 때 widdrol의 differentiation inhibition을 알아보기로 Oil Red O staining을 시행하였다. 먼저 3T3-L1 지방전구세포를 12 well plate에 배양한 뒤 confluent 상태가 되게 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  incubator에 배양하였다. Confluent 상태로 10% FBS, 0.1% gentamycin이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 2일 더 배양하였다. 그리고 그 후 분화배지 (10% FBS, 0.1% gentamycin,

10 $\mu$ g/ml insulin (SIGMA), 0.5 $\mu$ M dexamethasone, 0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Riedstr.2, D-89555, Steinheim, Germany), (MDI))로 교환할 때 widdrol을 함께 처리하였다. 3일 배양 후에도 역시 10 $\mu$ g/ml insulin이 포함된 DMEM배지에 widdrol을 처리하여 3~5일간 배양하였다. 그리고 난 후 생성된 triglyceride의 함량을 측정하기 위하여 위의 방법과 동일한 방법으로 Oil Red O staining을 시행하였다.

## 5. Glycerol 방출량 측정

Lipolysis를 확인하기 위해 배지에 방출되는 glycerol량을 측정하였다. 3T3-L1 지방전구세포를 12 well plate에 분주한 뒤 2의 방법으로 분화를 유도하였다. 분화가 완전히 유도된 지방세포에 widdrol을 농도별로 처리하여 48시간 배양하였다. 그리고 enzymatic reagent를 사용하여 배지에 방출되는 glycerol량을 측정하였다. Glycerol 방출량은 glycerol-3-phosphate oxidase (GPO) -TRINDER kit (Sigma)를 사용하였다. 먼저 Free Glycerol Reagent를 3차 멸균수 40ml에 녹인 후 조심스럽게 inverting하여 녹였다. 그리고 나서 widdrol을 처리한 배양액을 10 $\mu$ l와 37 $^{\circ}$ C로 따뜻하게 데운 Free Glycerol Reagent 800 $\mu$ l를 조심스럽게 혼합하였다. 그리고 난 후 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 배양하였다. 배양한 후 판독기 (ELISA, Enzyme linked immunosolvent assay)를 이용하여 540nm에서 측정하였다.

## 6. Microarray 분석

(주)지노텍에서 제작된 NimbleGen Whole Oligo 4-plex chip을 사용하여 widdrol을 처리한 3T3-L1 세포와 처리하지 않은 대조군 3T3-L1 세포의 유전자 발현의 차이를 확인하였다. 실험에 사용된 total RNA sample은 (주)지노텍에서 RNA를 추출하고 quality check를 실시한 후 진행되었다. Total RNA sample은 reverse transcription 과정을 통하여 cDNA를 합성하는 과정에서 fluorescent dye를 이용하여 cDNA labelig을 진행하여 이것을 NimbleGen Mouse Genome Oligo 4-plex chip에 hybridization을 실시하였다. 본 실험에서 사용된 NimbleGen Mouse Genome Oligo 4-plex chip은

Mouse Genome Build 8을 database로 하여 mouse gene 25,631개를 3번 반복하여 합성, 제작하였다. NimbleGen Whole Oligo 4-plex chip에 합성되어 있는 spot은 control 유전자를 제외하고 총 76,083개의 spot이  $16\mu\text{m} \times 16\mu\text{m}$ 의 size로  $17.4\text{mm} \times 13\text{mm}$ 에 합성되어 있다. 25,631개의 oligo에는 23,092개의 기능이 알려진 Known gene과 아직 기능이 밝혀지지 않은 transcript, EST sequence 등이 2,539개가 포함되어 있다. DNA chip 결과의 분석과정은 scanning을 통하여 얻어진 spot의 signal intensity 수치 데이터를 사용하여 qspline fit, median polish normalization을 실시하였다. 실험 결과로 얻어진 모든 유전자들의 분포를 histogram으로 표시하여 표준화가 끝난 data의 분포도와 비교 검토하여 실험 결과의 정확성을 확인하였다.

## 7. Western blot analysis

Widdrol을 농도별(0, 1, 5, 10, 15,  $20\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 처리한 3T3-L1 세포를 회수하여 PBS로 한 번 washing 후 CSK 완충액 (100mM PIPES(pH6.8), 100mM NaCl, 1mM  $\text{MgCl}_2$ , 1mM EGTA, 1mM dithiothreitol (DTT) and 1mM EGTA)에 0.1% Triton X-100, 1mM ATP와 Protease inhibitor Cocktail (BD Pharmingen)가 첨가된 용액을 사용하여 현탁하여 15분간 lysis 시킨 후 14,000rpm 20분간 원심 분리하였다. 상등액을 다시 CSK 완충액에 현탁하여 초음파 분해기로 파쇄 하였다. 파쇄한 세포는 14,000rpm 20분간 원심 분리하였으며, 상등액을 BCA법으로 정량한 후  $30 \sim 40\mu\text{g}$  단백질을 SDS-PAGE gel에서 전기영동 하였다. 전기영동 후 gel내의 단백질을 PVDF membrane에 옮긴 후 5% skim milk를 이용하여  $4^\circ\text{C}$ 에서 16시간 (O/N) blocking 시켰다. 1차 항체는  $4^\circ\text{C}$  16시간 (O/N) 반응시켰으며 TBS(50mM Tris- HCl (pH7.5) and 0.15M NaCl)에 0.1% Triton X-100이 첨가된 용액을 사용하여 membrane을 washing한 다음 2차 항체를 넣고 16시간(O/N) 반응시켰다. Membrane을 washing한 후 면역반응 단백질은 화학 발광시스템 (Chemi -luminescence system ; SuperSignal West Femto Maxium sensitivity Substrate, Pierce)으로 검출하였다. 본 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biothechnology Inc. 및 Cell signalling Technology<sup>®</sup>

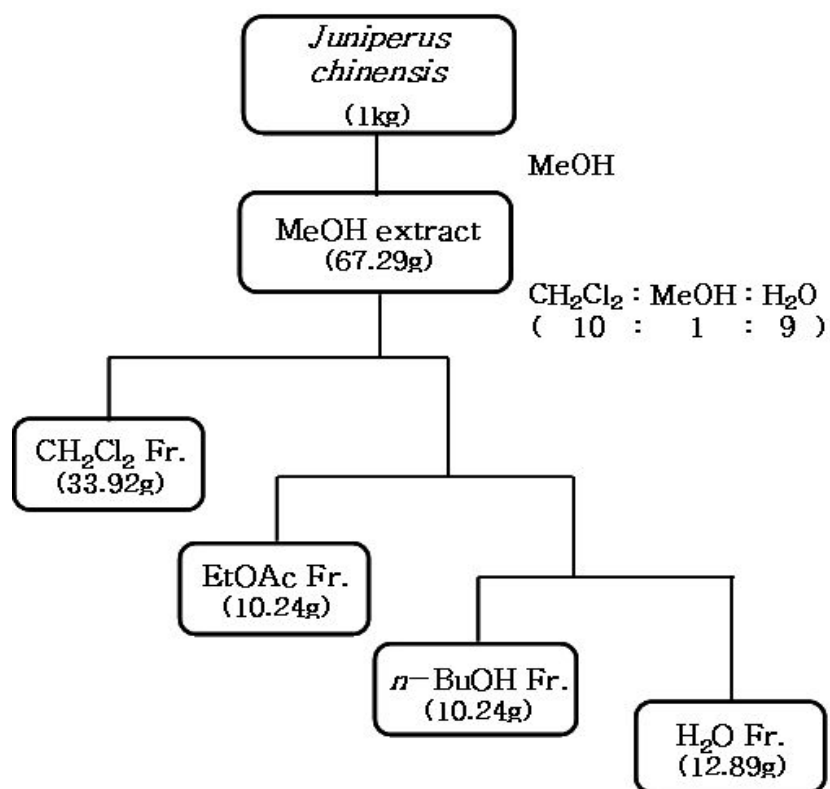
에서 구입하였다.

### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. *Juniperus chinensis* 활성물질 분리

향나무 (*Juniperus chinensis*)에서 활성성분을 찾기 위해 *Juniperus chinensis* 1 kg을 MeOH을 이용하여 추출한 뒤 감압농축을 하여 추출물 67.29 g 을 얻었다.

그리고  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , EtOAc, BuOH,  $\text{H}_2\text{O}$ 로 분획하여 각각 33.92 g, 10.24 g, 10.24 g, 12.89 g의 양을 얻었다(Schem 1.).



Schem 1. Procedure of extracting from the *Juniperus chinensis*.

## 2. Oil Red O staining을 통한 *Juniperus chinensis* 추출물 활성 효과 확인

Preadipocyte가 adipocyte로 분화할 때 세포 내에는 triglyceride 형태로 세포질 내에 축적된다. Lipolysis signal이 오게 되면 triglyceride는 glycerol과 fatty acid로 분해된다. 그러면 adipocyte 내에 triglyceride 함량이 경감하게 된다. Oil Red O staining은 이러한 triglyceride만을 선택적으로 빨강계 염색시켜 triglyceride의 양을 간접적으로 측정가능한 방법이다. Oil Red O로 염색한 후 100% isopropanol에 용출시킨 후 OD 500nm에서 흡광도 측정하여 수치적으로도 확인가능하다.

*Juniperus chinensis* 추출물 중에서 lipolysis를 일으키는 활성물질을 찾고자 500 $\mu$ g/ml을 처리하여 48시간 반응시킨 결과(Fig. 10.) 대부분의 *Juniperus chinensis* 추출물이 control에 비해 triglyceride 함량을 50% 이상 경감시켰고 특히 MeOH extract는 71.2%, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction은 89%로 triglyceride의 함량이 현저하게 줄어들어 매우 뛰어난 lipolysis 효과를 일으킴을 확인하였다(Fig. 11.).



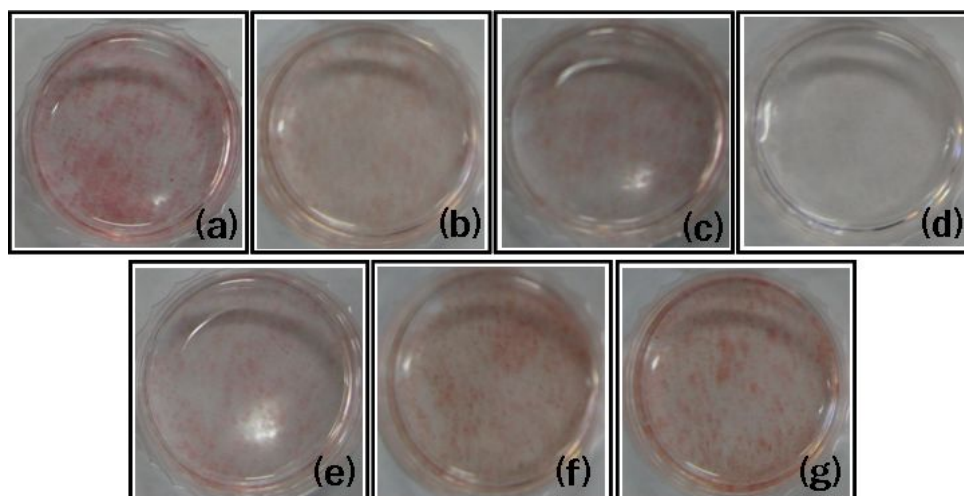


Fig. 10. Photographs of triglyceride contents changes of 3T3-L1 cells after *Juniperus chinensis* extract treatment for 48 hours followed by Oil Red O staining.

- (a) Control cells treated 0.5% DMSO.
- (b) Experimental cells treated 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  MeOH Ex.
- (c) Experimental cells treated 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  H<sub>2</sub>O Ex.
- (d) Experimental cells treated 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> Fr.
- (e) Experimental cells treated 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  EtOAc Fr.
- (f) Experimental cells treated 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  BuOH Fr.
- (g) Experimental cells treated 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  H<sub>2</sub>O Fr.

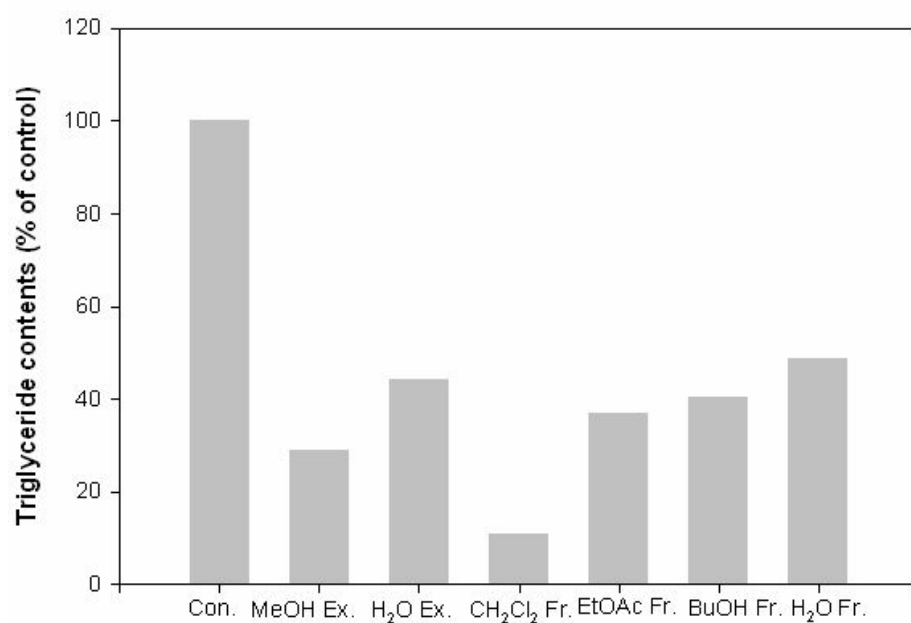
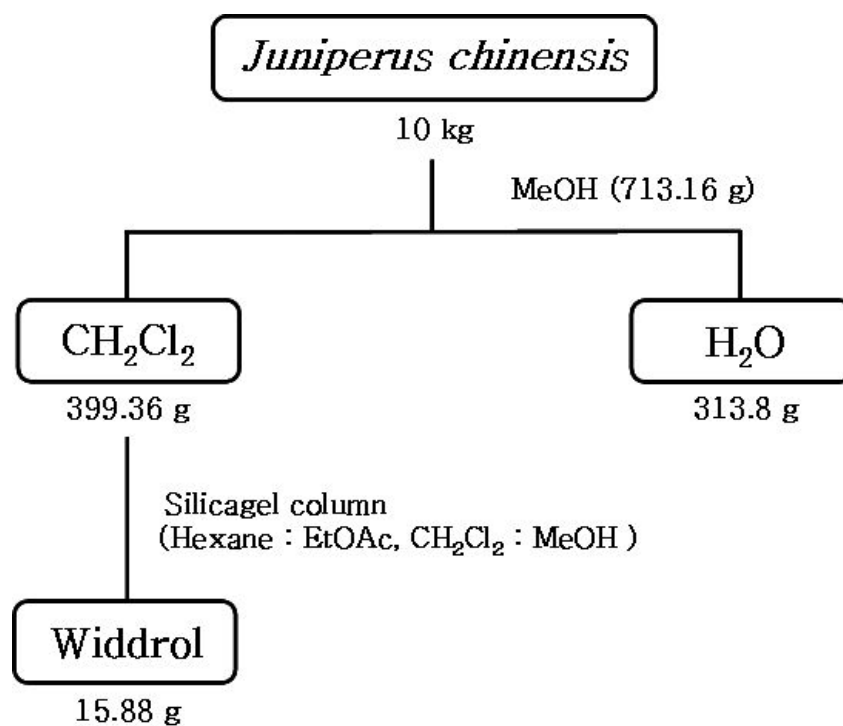


Fig. 11. Triglyceride contents was determined by Oil Red O staining after treatment of *Juniperus chinensis* extract for 48 hours.

### 3. Widdrol 분리

향나무 (*Juniperus chinensis*)에서 활성성분인 widdrol 분리를 위하여 MeOH을 이용하여 추출하여 감압농축을 하여 추출물 713.6 g을 얻었다. 추출물에 증류수를 첨가하여 용해시킨 다음 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>층과 H<sub>2</sub>O로 분획하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>층 399.36 g, H<sub>2</sub>O층 313.8 g을 얻었다. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>층을 silicagel column을 시행하였고 용매는 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 20 : 1 ~ 100 : 1, Hexane : EtOAc = 10 : 1 을 이용하여 단일 compound 15.88 g을 획득하였다. 이 compound는 TLC를 행하였다. 용매 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 100 : 1에서 R<sub>f</sub> 0.32를 가지는 단일 spot으로 발색됨을 확인하였다. 이를 Mass와 NMR을 시행하여 분자식 C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O를 가지는 widdrol임을 확인하였다. 따라서 향나무 10 kg에서 활성 성분 widdrol을 15.88 g 분리 정제하였다.



Schem 2. Widdrol extraction from *Juniperus chinensis*.

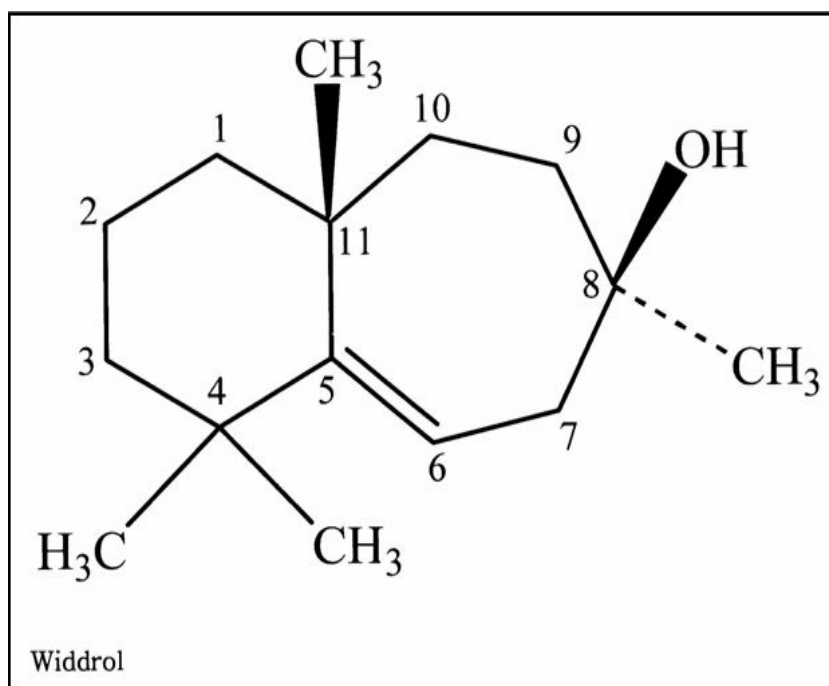


Fig. 12. Structure of widdrol.

#### 4. Widdrol의 triglyceride 분해 효과

3T3-L1에 widdrol을 처리했을 때 lipolysis 효과를 알아보기 위하여 triglyceride 함량을 측정하였다. 지방전구세포인 3T3-L1을 12 well plate에 분주한 뒤 분화 배지를 처리하게 되면 지방세포로 분화되면서 중성지방이 고르게 축적되어 많은 원형모양의 triglyceride 입자가 관찰되었다. 이렇게 완전히 분화 시킨 뒤 widdrol의 최적 농도 범위와 지방 분해 효과를 조사하기 위해서 농도별 (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 $\mu$ g/ml)로 48시간 처리한 후 Oil Red O staining으로 triglyceride량을 측정하였다(Fig. 13.). 그 결과 0.5% DMSO를 처리한 control에 비해 triglyceride contents가 농도 의존적으로 줄어드는 것을 확인하였으며 특히 30 $\mu$ g/ml에서는 triglyceride 함량이 31.6% 감소하였다. 따라서 widdrol은 완전히 분화된 adipocyte에 lipolysis를 유도하여 triglyceride를 분해함을 확인하였다.

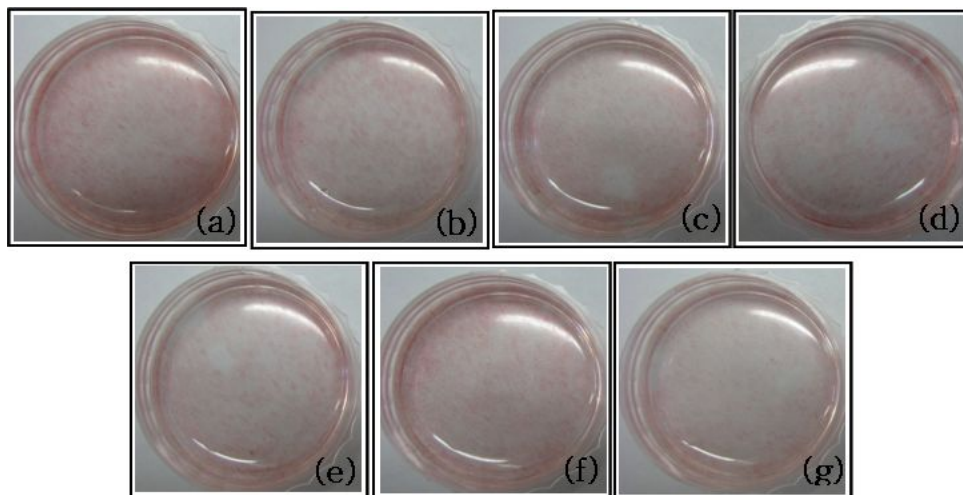


Fig. 13. Photographs triglyceride contents changes of 3T3-L1 cells after widdrol treatment for 48 hours followed by Oil Red O staining.

- (a) Control cells treated 0.1% DMSO.
- (b) Experimental cells treated  $5\mu\text{g}/\text{ml}$  widdrol.
- (c) Experimental cells treated  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  widdrol.
- (d) Experimental cells treated  $15\mu\text{g}/\text{ml}$  widdrol.
- (e) Experimental cells treated  $20\mu\text{g}/\text{ml}$  widdrol.
- (f) Experimental cells treated  $25\mu\text{g}/\text{ml}$  widdrol.
- (g) Experimental cells treated  $30\mu\text{g}/\text{ml}$  widdrol.

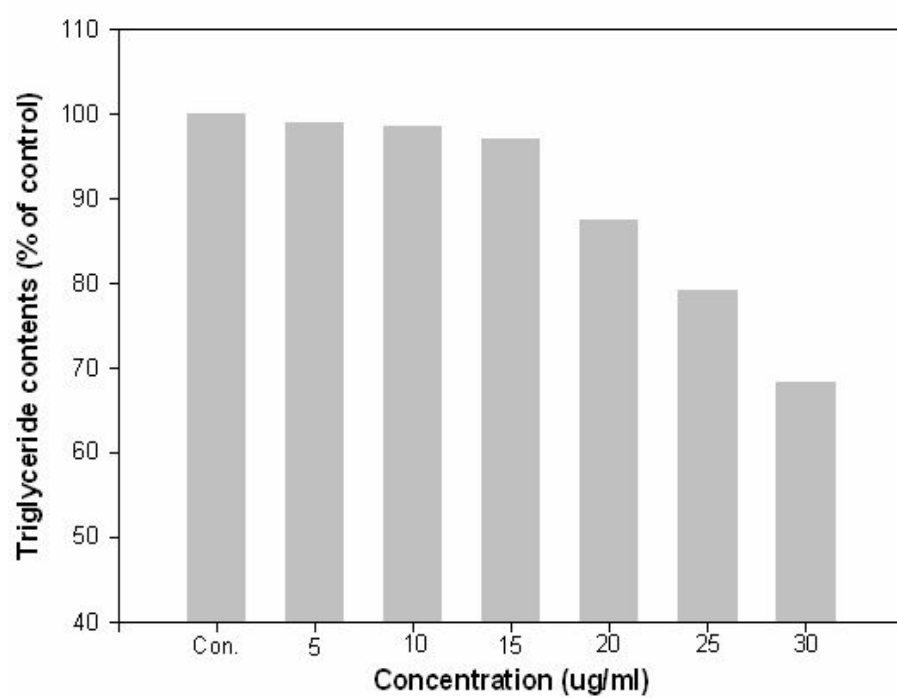


Fig. 14. Dose-dependence of widdrol treatment on triglyceride contents.



## 5. Widdrol의 lipolysis 효과

지방세포에서 lipolysis가 유도되면 triglyceride가 분해되어 세포질에서 glycerol과 fatty acid가 생성되고 계속적으로 lipolysis가 일어나면 glycerol은 밖으로 방출된다.

Widdrol이 triglyceride를 분해하고 glycerol을 방출하는지 명확한 lipolysis 효과를 유도하는지 확인하기 위하여 glycerol 방출량을 widdrol을 농도별로 48시간 처리한 후 GPO-TRINDER kit를 이용하여 측정하였다(Fig. 15.). 그 결과 0.5% DMSO를 처리한 대조군에 비하여 widdrol을 처리한 경우 glycerol 방출량이 농도 의존적으로 증가됨을 확인하였다. 특히  $30\mu\text{g/ml}$  일 때는 대조군에 비해 glycerol 방출량이 2.1배 증가됨으로써 매우 뛰어난 lipolysis 효과를 나타내었다.

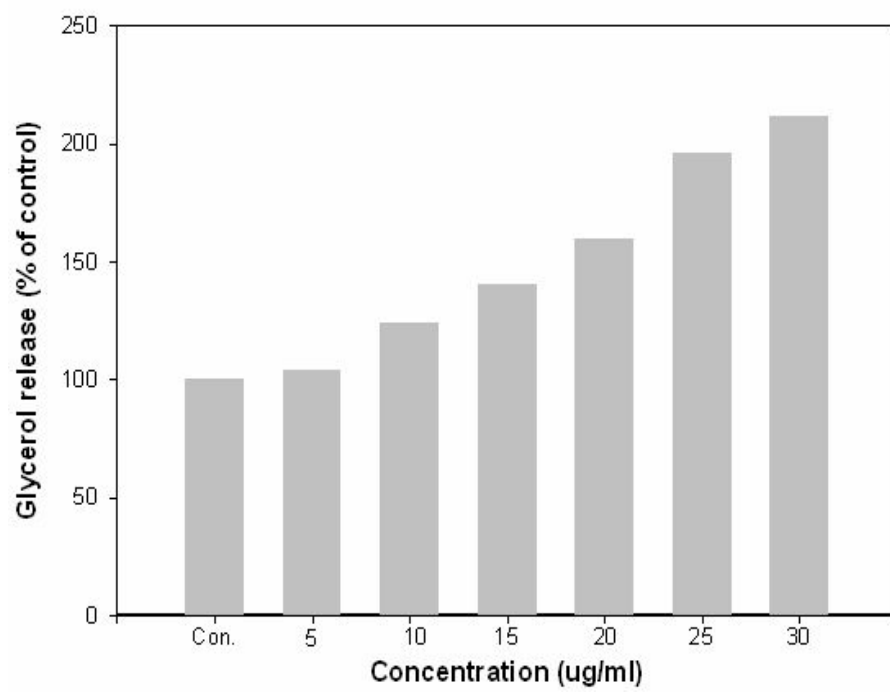


Fig. 15. Glycerol release was determined after treatment of widdrol for 48 hours.

## 6. Widdrol의 differentiation inhibition 효과

3T3-L1 preadipocyte가 adipocyte로 분화할 때 widdrol이 지방세포 분화에 어떠한 영향을 미치는 지 알아보기 위하여 분화유도제를 첨가할 때마다 MDI, insulin과 함께 widdrol을 농도별로 처리하였다(Fig. 16.). 그 결과 아무것도 처리하지 않고 오로지 분화제만 처리하여 100% 분화시킨 것보다 widdrol을 농도별로 처리한 것이 현저하게 triglyceride accumulation이 저해됨을 확인하였다. 특히  $25\mu\text{g/ml}$  일 때는 control에 비해 triglyceride accumulation이 77.6% 저해됨을 확인하였다. 이 결과로 미루어 볼 때 widdrol은 완전히 분화된 지방세포에 생성된 triglyceride를 분해하여 lipolysis를 일으킬 뿐 만 아니라 지방세포가 분화할 때 triglyceride의 형성을 억제하여 지방세포의 분화를 억제하는 것으로 사료된다.

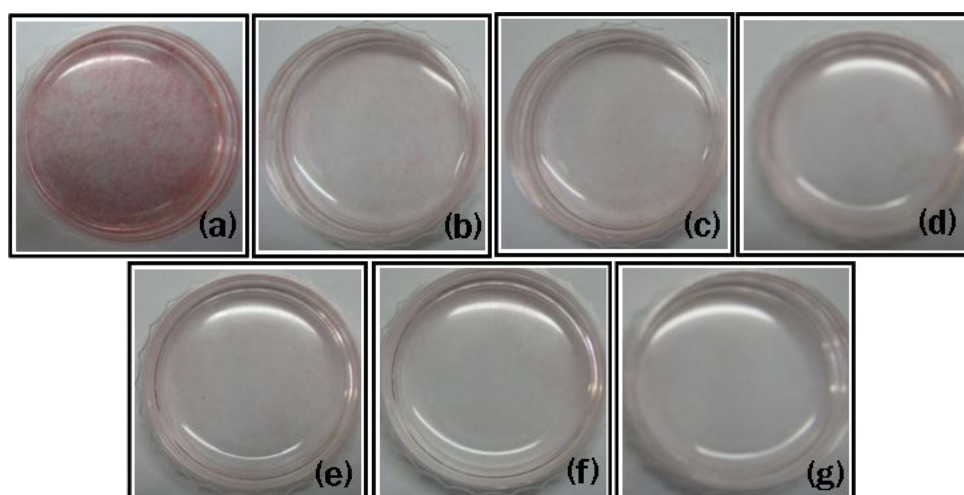


Fig. 16. Photographs triglyceride accumulation changes of 3T3-L1 cells adipocyte differentiation treatment followed by Oil Red O staining.

- (a) Control cells non treated.
- (b) Experimental cells treated  $1\mu\text{g}/\text{ml}$  widdrol.
- (c) Experimental cells treated  $5\mu\text{g}/\text{ml}$  widdrol.
- (d) Experimental cells treated  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  widdrol.
- (e) Experimental cells treated  $15\mu\text{g}/\text{ml}$  widdrol.
- (f) Experimental cells treated  $20\mu\text{g}/\text{ml}$  widdrol.
- (g) Experimental cells treated  $25\mu\text{g}/\text{ml}$  widdrol..

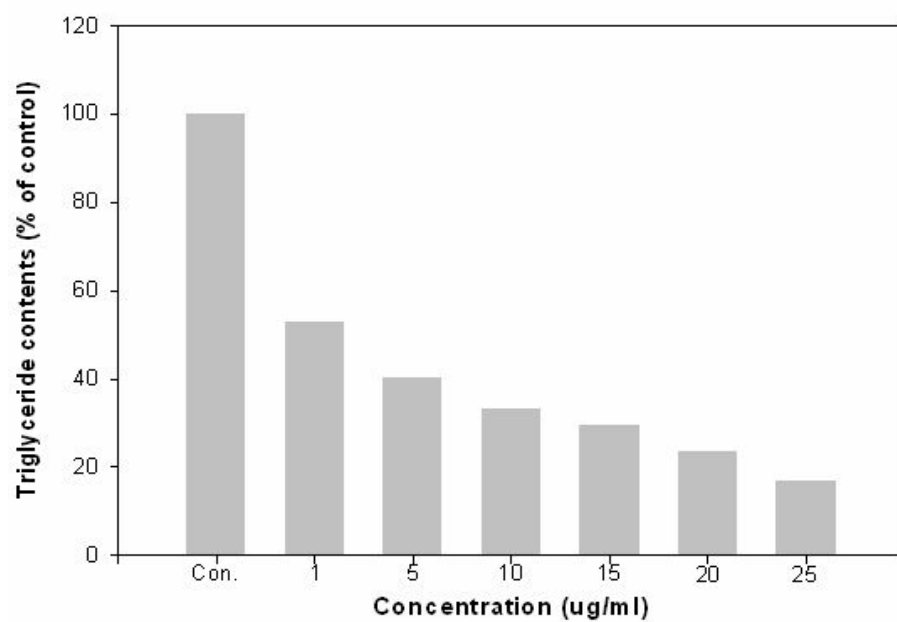


Fig. 17. Triglyceride accumulation was determined by Oil Red O staining after treatment of widdrol for adipocyte differentiation.

## 7. Microarray analysis

### 7.1 Lipolysis

Widdrol의 항비만 작용기작을 밝히고자 microarray를 통해 mRNA 발현량을 검토하였다. Widdrol 15 $\mu$ g/ml 처리군 과 비 처리군 에서 lipolysis 관련 유전자를 간추려 비교분석하였다(Table 1.). Adenylate cyclase는 control에 비해서 +1.38 증가하였다. Adenylate cyclase가 활성화되면서 ATP를 cAMP로 바꿈으로써 세포 내의 cAMP 농도의 증가로 인해 protein kinase A와 protein kinase C 등 여러 유전자를 활성화시키는 것으로 추측할 수 있었다. 또한 phospholipase  $\beta$ 1 (PL $\beta$ 1), phospholipase A2 (PLA2), phospholipase C  $\beta$ 1 (PLC  $\beta$ 1), lipoprotein lipase 1 (LP1)이 각각 + 2.21 , + 1.15 , + 3.20 , + 1.25 증가하였다. 그리고 fatty acid transport 유전자인 acyl-CoA synthetase long chain family member (ACSL1)가 + 2.88 증가함을 확인하였다. 이것은 lipolysis로 인해 triglyceride 분해로 생성된 free fatty acid를 transport하는 것으로 여겨진다. 따라서 widdrol은 adenylate cyclase를 활성화시켜 세포 내의 cAMP의 농도를 증가시킬 뿐만 아니라 여러 lipase를 활성화시켜 triglyceride를 분해함으로써 lipolysis를 일으키는 것으로 사료된다.

Table 1. List of lipolysis related genes in 3T3-L1 cell treated with widdrol 15 $\mu$ g/ml

Gene	Gene Bank No.	Indensity ratio	Description
AC 8	NM_009623	+ 1.38	Adenylate cyclase 8
PL $_{\beta 1}$	XM_979248	+ 2.21	Phospholipase $\beta 1$
PLA $_2$	NM_00869	+ 1.15	Phospholipase A2
PLC $_{\beta 1}$	NM_019677	+ 3.20	Phospholipase C $\beta 1$
LP 1	NM_008509	+ 1.25	Lipoprotein lipase 1
ACSL1	NM_007981	+ 2.88	Acyl-CoA synthetase long chain family member , ACSL1

## 7.2. Differentiation inhibition

Adipocyte differentiation 관련 mRNA 발현량을 비교해 보았다(Table 2). 지방세포 분화 초기, 즉 clonal expansion 시기에 활성화되는 CCAAT enhancer binding protein beta (C/EBP $\beta$ )가 - 0.31 줄어듦을 확인하였으며 CCAAT enhancer binding protein gamma (C/EBP $\gamma$ )도 -0.23 줄어들어 widdrol이 지방세포분화를 억제하는 것을 확인하였다. 또한 lipogenesis 유전자인 stearoyl-Coenzyme A desaturase 1 (SCD-1)도 - 0.62로 현저한 감소를 확인하였다. 이 결과로 미루어 볼 때 widdrol은 지방세포 분화 초기인 clonal expansion 단계를 억제함으로써 지방세포의 분화를 저해하는 것으로 사료된다.



Table 2. List of adipocyte differentiation related genes  
in 3T3-L1 cell treated with widdrol 15 $\mu$ g/ml

Gene	Gene Bank No.	Expression fold	Description
PPAR $\alpha$	NM_011144	- 0.28	Peroxisome proliferator activated receptor, alpha
C/EBP $\beta$	NM_009883	- 0.31	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
C/EBP $\gamma$	NM_009884	- 0.23	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma
SCD-1	NM_009127	- 0.62	Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1

## 8. Western blot analysis

지방세포 분화는 지방 조직세포에 특징적으로 발현되는 유전자들의 조절부위에 작용하는 transcription factor들이 지방전구세포가 지방세포로 분화하는 과정에 발현되는 것과 관련이 있다. 이 과정에 관여하는 transcription factor는 peroxisome proliferation activated receptor gamma (PPAR<sub>γ</sub>), CCAAT enhancer binding protein (C/EBP), E2F transcription factor 1 (E2F 1) 등이 있다. 유도 분화물질은 이러한 transcription factor들의 발현을 촉진시킴으로 지방전구세포를 지방세포로 전환시킨다. 이 효소들의 발현을 억제함으로써 지방세포로의 전환을 억제하고 지방의 축적이 감소한다.

Widdrol을 처리하였을 경우 Fig.18.에서 보는 바와 같이 농도 의존적으로 PPAR<sub>γ</sub>가 줄어들므로써 지방세포로의 전환을 억제하고 분화를 저해함을 확인할 수 있었다. 그리고 세포의 성장 및 다양한 분화 모델에서 세포분열을 촉진하는 E2F 1이 줄어들므로써 세포분열을 억제하여 clonal expansion 시기를 막음으로써 지방세포 분화를 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 pRb에 비해 활성화된 phospho-pRb가 widdrol을 처리하였을 경우 현저하게 줄어드는 것을 확인하였으며 이것은 E2F 1과 pRb 결합형이 인산화되어 활성화된 E2F 1 보다 많다는 것을 알 수 있었다.

또한 지방세포로의 분화는 clonal expansion 시기에 활성화된 C/EBP<sub>β</sub>, C/EBP<sub>δ</sub>에 의해 유도된 cyclin dependent kinase (CDK)에 의해 E2F 1 이 활성화된다. Widdrol을 처리하였을 때 CDK inhibitor인 p21이 농도 의존적으로 증가함을 확인하였다. 따라서 widdrol은 clonal expansion 시기를 억제함으로써 지방세포의 분화를 저해하는 것으로 사료된다.

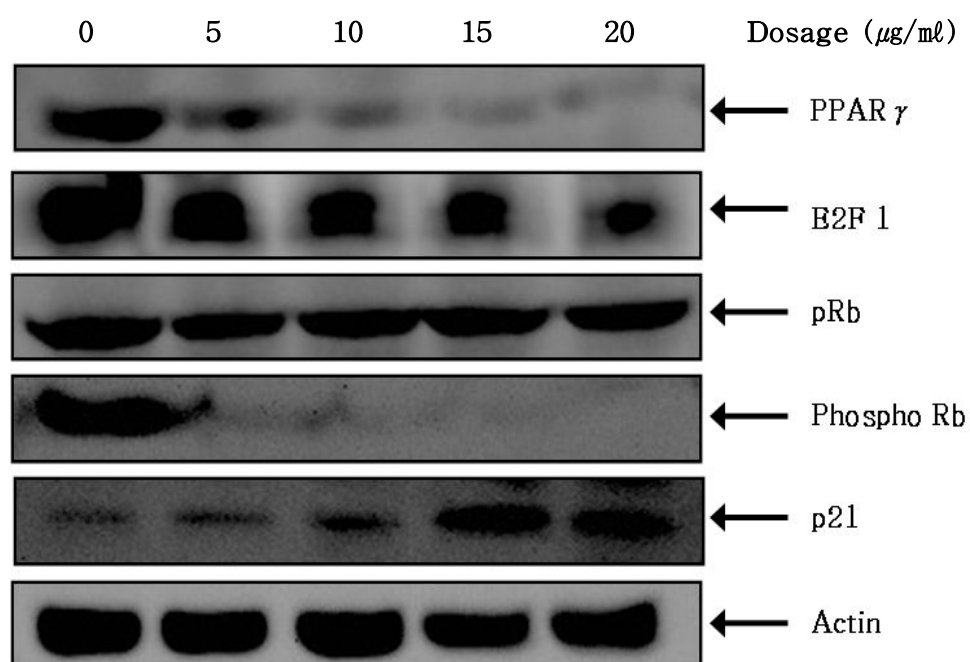


Fig. 18. Effects of widdrol on differentiation inhibition protein expression in 3T3-L1 cells.

## IV. 결 론

새로운 비만 치료제의 개발은 지방세포 분화를 조절하는 기전에 대한 많은 연구와 그 결과들이 축적되면서 더욱 가속화되고 있다. 3T3-L1 지방세포는 swiss albino embryo로 fibroblast-like 형태의 모양을 가지며 급속하게 나뉘어져 confluent 상태가 되어 inhibited state로 진행하면서 preadipocyte에서 adipocyte로 바뀌게 된다. 배양액 중의 serum 농도가 높아지면 triglyceride accumulation이 급속하게 다량 이루어지며 분화한다. 배양액에 IBMX, 즉 isobuthylmethylxanthine, dexamethasone, insulin의 혼합액을 넣어주면 분화가 촉진된다. Lipid droplet이 85~90% 이상 보여지면 분화가 완료된 것으로 본다. 이러한 3T3-L1은 비만치료 연구하는데 in vitro model로서 많이 이용되고 있다. 그러므로 비만치료제 연구에서 3T3-L1의 분화 억제와 lipolysis는 비만치료제의 주요한 기전으로 간주 할 수 있다.

본 연구에서는 sesquiterpene계 천연물 widdrol을 3T3-L1에 처리하였을 경우 lipolysis와 differentiation inhibition 현상을 확인하고 기전을 확인하였다.

먼저 *Juniperus chinensis*에서 lipolysis를 일으키는 활성 물질을 찾기 위해 MeOH Ex., CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> Fr., EtOAc Fr., BuOH Fr., H<sub>2</sub>O Fr.을 완전히 분화된 지방세포에 처리하였다. 그리고 나서 triglyceride의 함량을 Oil Red O staining으로 확인하였다. 그 결과 0.5% DMSO를 처리한 대조군에 비해 MeOH Ex.는 triglyceride를 29.2% 감소시켰으며 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> Fr.은 53.4%로 현저한 triglyceride 감소가 나타났다. 그리고 EtOAc Fr., BuOH Fr., H<sub>2</sub>O Fr.은 각각 28.7%, 1.5%, 9.3% 감소하였다. 따라서 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> Fr.에서 lipolysis를 일으키는 물질이 있을 것이라고 예상하였다. 가장 활성이 뛰어난 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fr.을 분리 정제하여 유효성분으로 1개의 compound를 획득하였다. 이 compound는 2D-NMR과 EI-mass 측정을 통하여 sesquiterpene계의 화합물인 widdrol임을 확인하였다. Widdrol은 30 $\mu$ g/ml의 농도에서 triglyceride

함량을 31.6%를 감소시켜 lipolysis를 일으키는 것을 확인하였다. 또한 lipolysis를 확실하게 확인하기 위해 triglyceride가 분해되어 밖으로 방출되는 glycerol량을 확인하였다. 그 결과 25 $\mu$ g/ml의 농도에서 대조군에 비해 glycerol량이 2.1배 증가함을 알 수 있었다. 또한 microarray로 lipolysis 관련 유전자를 비교해 본 결과 lipolysis를 유도하는 adenylate cyclase 8, phospholipase  $\epsilon$ 1, phospholipase A<sub>2</sub>, phospholipase C $\delta$ 1, lipolrotein lipase 1이 각각 + 1.38, + 2.21, + 1.15, + 3.20, +1.25로 크게 증가하였다. 그리고 fatty acid transport 유전자인 acyl-CoA synthetase long chain family member 1이 대조군에 비해 + 2.88 활성화됨을 확인하였다. 이 결과로 미루어 보아 widdrol지방세포에서 lipolysis를 일으켜 항 비만제로 개발될 가능성을 가진 물질임을 확인하였다.

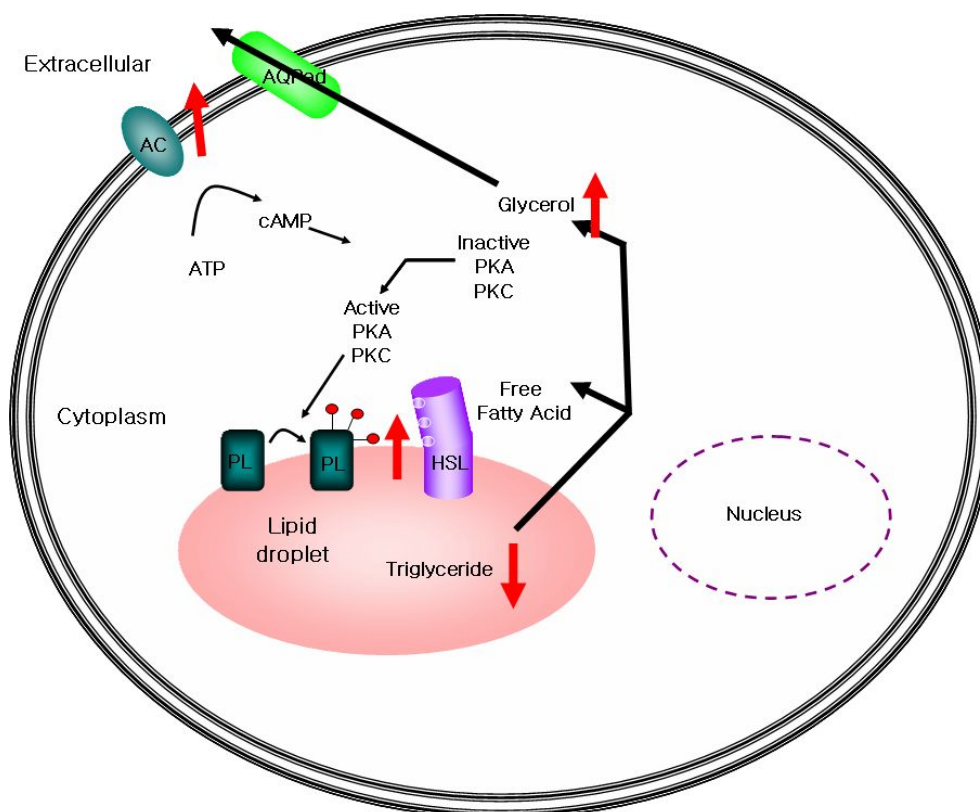


Fig. 19. Schematic presentation of the lipolysis pathway.

비만치료제로써 target은 완전히 분화된 지방세포에 lipolysis를 일으키는 것 이외에도 differentiation inhibition으로 또 다른 접근이 가능하다. 따라서 preadipocyte 상태의 3T3-L1을 완전한 adipocyte로 분화시키는 단계에서 분화유도제와 widdrol을 함께 처리하여 widdrol이 지방세포 분화에 어떠한 영향을 미치는 지 알아보았다. 그 결과 현저한 widdrol이 지방세포 분화를 억제하여 adipocyte의 triglyceride accumulation을 현저하게 저해함을 확인하였다. Widdrol을 처리하지 않은 대조군에 비해 widdrol을  $25\mu\text{g}/\text{ml}$  처리한 군이 triglyceride accumulation이 77.6%저해되었다. 이것으로 widdrol은 분화된 지방세포의 triglyceride를 분해시킬 뿐만 아니라 지방세포의 분화도 억제한다는 것을 확인하였다.

또한 본 실험에서는 widdrol이 지방세포의 분화를 어떠한 메커니즘으로 억제하는지 작용기작을 알아보려고 microarray, western blot analysis를 행하였다. 먼저 microarray 결과 지방세포 분화 초기에 지방세포의 분화를 촉진하는 C/EBP $\beta$ . C/EBP $\beta$ 가 control에 비해  $15\mu\text{g}/\text{ml}$  처리한 것이 각각 -0.31, -0.23 줄어들었으며 lipogenesis 유전자인 stearoyl-Coenzyme A desaturase 1은 -0.62로 크게 감소하였다. 그리고 western blot를 통해 지방세포 분화 관련 단백질의 발현량을 검토해본 결과 지방세포 분화에 중요한 역할을 하는 PPAR $\gamma$ 와 세포 분열을 촉진하는 E2F1, phospho-Rb가 줄어드는 것을 확인하였으며 cyclin dependent kinase inhibitor인 p21이 증가함을 확인하였다.

이처럼 widdrol은 완전히 분화된 3T3-L1에서 triglyceride를 분해하여 lipolysis를 일으킬 뿐만 아니라 지방세포 특이적 유전자를 제어함으로써 지방세포 분화를 억제하였다. 따라서 widdrol은 항 비만제 개발로 이어질 가능성이 높다고 사료된다.

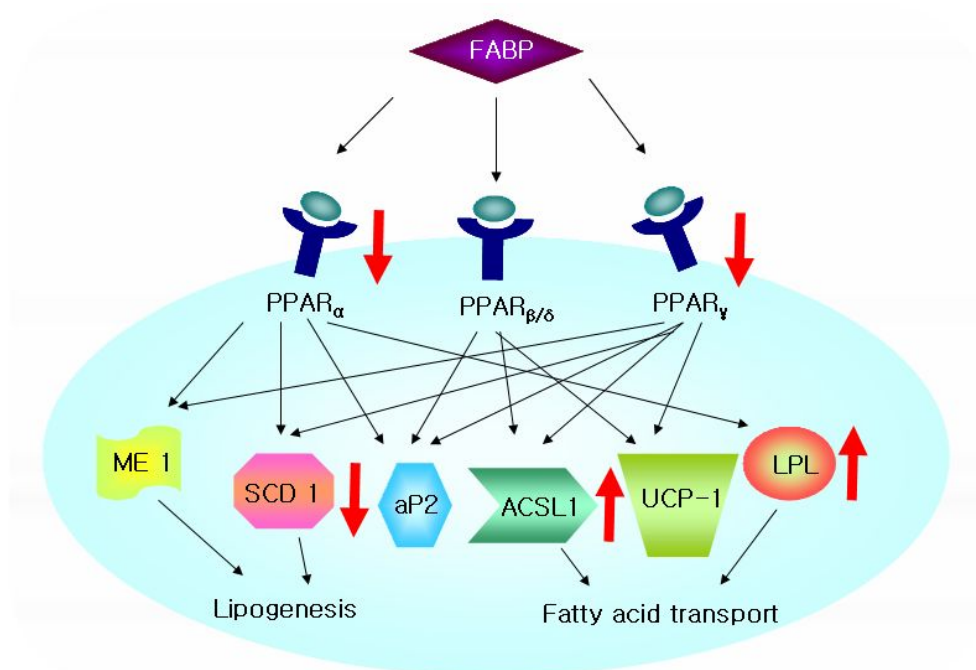


Fig. 20. Schematic presentation of differentiation inhibition of the PPAR<sub>r</sub> pathway.



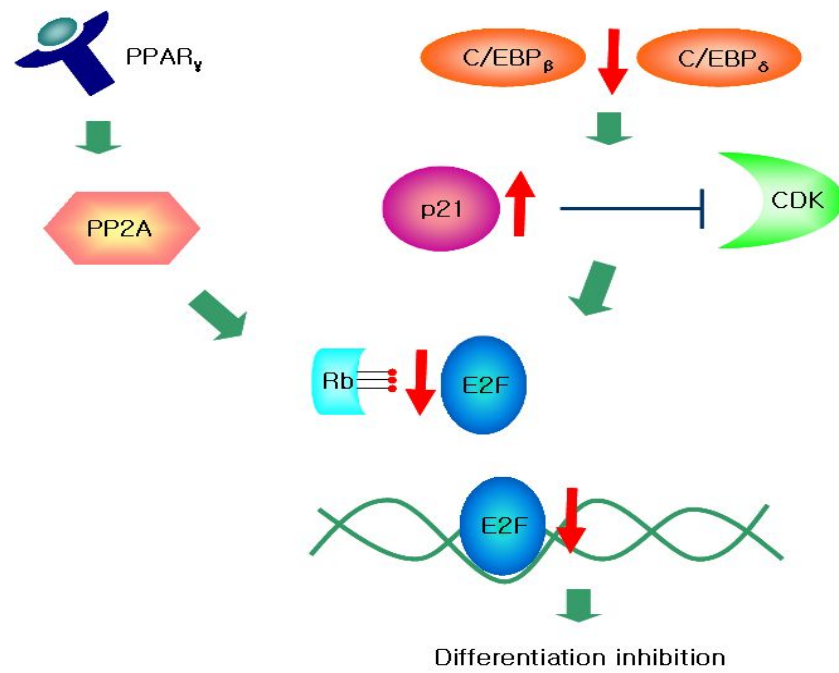


Fig. 21. Schematic presentation of the differentiation pathway in clonal expansion.

## V. 참 고 문 헌

1. Ahn I. S., Do M. S., Choi B. H., Kong C. S., Kim S. O., Han M. S., Park K. Y., Reduced leptin secretion by fucoidan added *Kochujang* and anti adipogenic effect of fucoidan in mouse 3T3-L1 adipocytes., *J Foo. Sc. Nut.*, 11:31-35, 2006.
2. Kopelman PG., Causes and consequences of obesity., *Med Int*, 22:385-388, 1994.
3. Evans RM., Barish RD., Wang YX., PPARs and complex journey to obesity., *Nat Med*, 10(4):1-7, 2004.
4. Kim N. H., Choi S. K., Kim S. J., Moon P. D., Lim H. S., Choi I. Y., Na H. J., An H. J., Myung N. Y., Jeong H. J., Um J. Y., Hong S. H., Kim H. M., Green tea seed oil reduces weight gain in C57BL/6 mice and influences adipocyte differentiation by suppressing peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$ ., *Pfluger Arch Eur Physiol*, 00424-0088-0537, 2008.
5. Kopelman PG., Obesity as a medical problem., *Nature*, 404:635-643, 2000.
6. Brown MS., Goldstein JL., The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor., *Cell*, 89(3):331-340, 1997.
7. Weissman C., Nutrition in the intensive care unit., *Crit Car*, 3(5):R67-75, 1999.
8. Caro JF., Dohm LG., Pories WJ., Sinha MK., Cellular alterations in liver, skeletal muscle and adipose tissue responsible for insulin resistance in obesity and type II diabetes., *Diab Metab Rev*, 5:665-689, 1989.

9. Wellen KE, Hotamisligil GS, Inflammation, stress, and diabetes., *J Clin Inverst*, 5:1111-1119, 2005.
10. Tilg H., Moschen AR., Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity., *Nat Rev Immunol*. 6:772-783, 2006.
11. Zimmet P., Alberti KG., Shaw J., Global and societal implications of the diabetes epidemic., *Nature*, 414:782-787, 2001.
12. Zimmet P., Magliano D., Matsuzawa Y., Alberti G., Shaw J., The methabolic syndrome : a global public heath problem and a new definition., *J Atheroscler Thromb*, 12:295-300, 2005.
13. Evans RM., Barish GD., Wang YX., PPARs and the complex journey to obesity., *Nat Med*, 10:355-361, 2004.
14. Pakala R., Kuchulakanti P., Rha SW., Chaneau E., Baffour R., Waksman R., Peroxisome proliferator activated receptor gamma : its role in metabolic syndrome., *Cardiovasc Radiat Med*, 5:97-103, 2004.
15. Korean Intellectual Property Office, 2008.
16. Ju JB., Kim JS., Choi CW., Lee HK., Oh TK., Kim SC., Comparison between ethanolic and aqueous extracts from Chinese juniper berries for hypoglycaemic and hypolipidemic effects in alloxan-induced diabetic rats., *J Ethnopharmacol*, 115:110-115, 2008.
17. Lim JP., Song YC., Kim JW., Ku CH., Eun JS., Leem KH., Kim DK., Free radical scavengers from the heartwood of *Juniperus chinensis*., *Arch Pharm Res*, 25:449-452, 2002.
18. Ali AM., Mackeen MM., Intan-Safinar I., Hamid M., Lajis NH., el-Sharkawy SH., Murakoshi M., Antitumour-promoting and antitumour activities of the crude extract from the leaves of *Juniperus chinensis*., *J Ethnopharmacol*, 53:165-169, 1996.
19. But PPH., Kimura T., Gue JX., Sung CK., "International collation of traditional and folk medicine.", Wolrd Scientific Publishing Co., Pte. Ltd., Singapore, 16-17, 1997.

20. Duke JA., Ayensu ES., "Medicinal plants of China.", Reference Publications, Ins., Michigan, 1985.
21. Rodriguez AM., Elabd C., Delteil F., Astier J., Vernochet C., Saint-Mare P., Guesnet J., Guezenne A., Amri EZ., Aihaud G., Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue., *Biochem Biophys Res Commun*, 315:225-263, 2004.
22. Shimomura I., Funahashi T., Takhashi M., Maeda K., Kotani K., Nakamura T., Yamashita S., Miura M., Fukuda Y., Takemura K., Tokunaga K., Matsuzawa Y., Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat : possible contributor to vascular disease in obesity., *Nat Med*, 2:800-803, 1996.
23. Gregoire FM., Smas CM., Understanding adipocyte differentiation., *Physiological reviews*, 78(3):783-809, 1998.
24. Tontonoz P., Hu E., Spiegelman BM., Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma., *Cur Opi in Gen Develop*, 5(5):571-576, 1995.
25. Morrison RF., Farmer SR., Insights into the transcriptional control of adipocyte differentiation., *J Cell Biochem*, S32-33:59-67, 1999.
26. Hwang HS., Kim SH., Yoo YG., Chu YS., Shon YH., Nam KS., Yun JW., Inhibitory effect of deep-sea water on differentiation of 3T3-L1 adipocytes., *Mar Biotechnol*, 10:126-008-9131-8, 2008.
27. Yeh WC., Cao Z., Classon M., McKnight SL., Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins., *Genes Dev*, 9(2):168-181, 1995.
28. Zhang JW., Tang QQ., Vinson C., Lane MD., Dominant-negative C/EBP disrupts mitotic clonal expansion and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes., *Proc Natl Acad Sci*, 101:43-47, 2004.
29. Hung PF., Wu BT., Chen HC., Chen YH., Chen CL., Wu MH., Liu HC., Lee MJ., Kao YH., Antimitogenic effect of green

- tea(-)-epigallocatechin gallate on 3T3-L1 preadipocytes depends on the ERK and CDK2 pathways., *Am J Physiol Cell Physiol*, 288:C1094-C1108, 2005.
30. Otto TC., Lane MD., Adipose development : from stem cell to adipocyte., *Crit Rev Biochem Mol*, 40:229-242, 2005.
  31. Cornelius P., Macdougald OA., Lane MD., Regulation of adipocyte development., *Annu Rev Nutr*, 14:99-129, 1994.
  32. Tong Q., Hotamisligil GS., Molecular mechanisms of adipocyte differentiation., *Rev Endocr Metab Disord*, 2:349-355, 2001.
  33. Dyson N, The regulation of E2F by pRB-family proteins., *Genes Dev*, 12(15):2245-2262, 1998
  34. Timchenko NA., Harris TE., Wilde M., Bilyeu TA., Burgess-beusse BL., Finegold MJ., Darlington GJ., CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  regulates p21 protein and hepatocyte proliferation in newborn mice., *Mol and Cellu Bio*, 7353-7361, 1997.
  35. Chen PL., Riley DJ., Chen Y., Lee WH., Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C/EBPs., *Genes Dev*, 21:2794-2804, 1996.
  36. Timchenko NA., Wilde M., Darlington GJ., C/EBP $\alpha$  regulates formation of S-phase-specific E2F-p107 complexes in livers of newborn mice., *Mol Cell Biol*, 4(19):2936-2945, 1999.
  37. Weinberg RA., Tumor suppressor genes, *Science*, 254(5035):1138-1146, 1991.
  38. Furuyashiki T., Nagayasu H., Aoki Y., Bessho H., Hashimoto T., Kanazawa K., Ashida H., Tea catechin suppresses adipocyte differentiation accompanied by down-regulation of PPAR $\gamma$ 2 and C/EBP $\alpha$  in 3T3-L1 cells., *Biosci Biotechnol Biochem*, 12(15):2245-2262, 1998.
  39. Pajvani UB., Scherer PE., Adiponectin : systemic contributor to insulin sensitivity., *Curr Diabetes Rep*, 3:207-213, 2003.

40. Landschulz WH., Jonhson PF., Adashi EY., Graves J., Maknight SL., Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP., *Genes Dev*, 2:786-800, 1988.
41. Landschulz WH., Jonhson PF., Mcknight SL., The leucine zipper : a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins., *Science*, 240:1759-1764, 1988.
42. Landschulz WH., Johnson PF., Mcknight SL., The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite., *Science*, 243:1681-1688, 1989.
43. Freytag SO., Geddes TJ., Reciprocal regulation of adipogenesis by Myc and C/EBPa., *Science*, 256:379-382, 1992.
44. Freytag SO, Paielli DL., Gilbert JD., Ectopic expression of the CCAAT/enhance binding protein  $\alpha$  promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells., *Genes Dev*, 8:1654-1663, 1994.
45. Umek RM., Friedman AD., McKnight SL., CCAAT-enhancer binding protein : a component of a differentiation switch., *Science*, 251:288-292, 1991.
46. Wang ND., Finegold MJ., Bradley A., Ou CN., Abdelsayed SV., Wilde MD., Taylor LR., Wilson DR., Darlington GJ., Impaired energy homeostasis in C/EBP  $\alpha$  knock-out mice., *Science*, 269:1108-1112, 1995.
47. Yeh WC., Cao Z., Classon M., McKnight SL., Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins., *Genes Dev*, 9:168-181, 1995.
48. Lin FT., MacDougald OA., Diehl AM., Lane MD., A 30kDa alternative translation product of the CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  message : transcriptional activator lacking antimitotic activity., *Proc Natl Acad Sci*, 90:9606-9610, 1993.

49. Ossipow V., Descombes P., Schibler U., CCAAT/enhancer binding protein mRNA is translated into multiple protein with different transcription activation potentials., *Proc Natl Acad Sci*, 90:8219-8223, 1993.
50. Holm C., Molecular mechanisms reglulating hormone sensitive lipase and lipolysis., *Biochem Soc Trans*, 31:1120-1124, 2003.
51. Katrin F., Aleksandra H., Erik M., Cooperative activation of lipolysis by protein kinase A and protein kinase C pathways in 3T3-L1 adipocytes., *Endocrinology*, 145(11):4940-4947, 2004.
52. Naghshineh S., Noguchi M., Huang KP., Londos C., Activation of adipocyte adenylate cyclase by protein kinase C., *J Biol Chem*, 261:14534-14538, 1986.
53. Hu CY., Suryawan A., Effect of serum on differentiation of porcine adipose stromal-vascular cells in primary culture., *Comp Biochem Physiol Comp Physiol*, 105(3):485-492, 1993.

# Investigation of adipocyte differentiation mechanism of antiobesity regulatory compound Widdrol

Ji-Hun Park

*Department of life science and biotechnology, Graduate  
School, Dong-Eui University*

## Abstract

Obesity is both individual clinical condition and is increasingly viewed as a serious public health problem. Excessive body weight has been shown to predispose to various diseases, particularly cardiovascular disease, diabetes mellitus type 2, sleep apnea, Coronary heart disease, and osteoarthritis.

When induced to differentiate in the presence of widdrol, 3T3-L1 preadipocyte reduced accumulation of cytoplasmic triglycerides by dose-dependent manner. This phenomenon was rapidly reversible. In addition, when applied to mature 3T3-L1 adipocytes, widdrol induced a moderate reduction in cellular triglyceride content. Furthermore, mRNA expression levels of CCAAT enhancer binding protein  $\beta$ ,  $\delta$  (C/EBP $\beta$ ,  $\delta$ ) were decreased by widdrol treatment. Widdrol also decreased protein expression of peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), E2F1, Rb, which act as key transcription factors of lipogenesis.

When considered together, these results suggest that the inhibitory



down-regulation of the  $PPAR_{\gamma}$  dependent lipogenic pathway. These results suggest that widdrol might be an important natural functional compound in the prevention of obesity.

## 감사의 글

석사 논문을 쓰면서 2년이라는 대학원 석사 생활을 돌이켜 보니 감사해야 할 분들이 너무나도 많은 것 같습니다. 많이 부족한 제가 이렇게 무사히 석사를 졸업하기 까지는 많은 분들의 도움이 있었던 것 같습니다. 먼저 저의 지도 교수님 김 병우 교수님과 권 현주 교수님께 정말 감사하다는 말을 전하고 싶습니다. 형식적으로는 지도 교수님이 한 분이지만 항상 저는 지도 교수님이 두 분이라는 생각을 가지고 석사생활을 했습니다. 제가 석사 생활을 잘 할 수 있었던 것은 김 병우 교수님과 권 현주 교수님의 도움이 컸던 것 같습니다. 많이 부족한 저에게 따뜻한 사랑과 조언을 아끼지 않으셨던 두 분께 고개 숙여 감사드립니다. 그리고 6년간 많은 걸 가르쳐 주시고 격려해주신 김 광현 교수님, 김 영희 교수님, 정 경태 교수님, 이 은우 교수님께도 감사의 마음을 표하고 싶습니다.

지난 몇 년간 가족보다 더 많이 같이 생활했던 우리 415 식구들.. 평생 잊지 못할 것 같습니다. 힘들 때 많이 위로해주고 때로는 선배처럼, 때로는 친구처럼 잘해주신 은진선배, 나의 오른 팔이 되어준 영원한 부사수 조지, 많이 힘들었을텐데도 내색안하고 열심히 실험해주고 나의 왼팔이 되셨던 정욱이, 그리고 조지가 떠나고 그 공백을 잘 채워준 나의 또 다른 부사수 귀염동이 양지, 실험실 일을 열심히 해줘서 내 어깨의 짐을 조금이나마 덜어준 고마운 너구리 란식이와 땃돼지 혁준이, 조금은 늦게 들어왔지만 정이 많이 든 혜리, 항상 밝은 모습이 너무 보기 좋은 병석이, 그리고 415 막내 정수까지 415식구들이 아니었으면 이렇게 좋은 데이터를 얻지 못했을 것 같습니다. 정말 고맙습니다. 또 방장으로서는 많이 부족했을텐데 믿고 잘 따라와줘서 고맙습니다. 그리고 일본에 있어도 항상 응원해주신 정하언니, 지금은 비록 같이 없지만 학부생활 같이한 명희와 진욱이와 415 식구같은 정기선배에게도 감사의 말을 전하고 싶습니다.

또한 415 못지 않게 많이 도와준 414 식구들한테도 감사의 말을 전하고 싶습니다. 바빴을텐데도 모르는 거 물어보면 친절하게 가르쳐주신 희정선배,

414에 놀러가면 항상 잘해주신 현영선배, 상익선배, 민지, 정민이, 민혜, 그리고 415식구 같은 초딩, 늦게 들어와서 많이 못 친해진게 아쉬운 진상 준용이와 동진이, 모두에게 정말 감사하다는 말을 전하고 싶습니다. 또 지금보다 더 친해질 수 있었는데 많이 친해지지 못해서 아쉬운 민정이, 정애, 지금은 비록 같이 없지만 석사 1년차때 많이 도와줬던 유나언니와 해림이 언니, 신영이언니, 경옥이언니, 미경이언니한테도 감사함을 표하고 싶습니다. 그리고 비록 1학년때는 많이 못 친했지만 석사 와서 더 친해진,, 의리 빼면 시체인 우리 동기 승윤이랑 도균이, 은정이한테도 고맙다는 말을 전하고 싶습니다.

그리고 학부생때부터 내가 많이 의지했던 윤영이 오빠, 항상 내가 힘들 때 언제나 든든하게 힘이 되줬던 하마 지현이, 곰 영진이, 둘리여친 인실이한테도 고마움을 전합니다. 처음에는 철부지 아이였는데 군대갔다와서 어느 덧 남자가 된 재팔이와 창휘, 창석이, 또 학부생때부터 나를 많이 이빠라해준 대두 재우오빠, 재호오빠, 봉수오빠한테도 감사의 마음을 전하고 싶습니다.

전공은 다르지만 내가 힘들 때 많이 위로해주고 기쁠 때 같이 기뻐해준 나의 영원한 비에프 윤주, 미희, 정미에게도 고맙다는 말을 하고 싶습니다. 또 학교선생님들 못지않게 10년 동안 곁에서 제가 하는 일에 걱정 많이 해주고 따뜻한 사랑을 아끼지 않았던 우리 여자 원장 선생님, 원장 선생님, 영어 선생님께 고마움을 표하고 싶습니다. 그리고 감사의 글에 자기이름은 꼭 삼돌 광수체로 써달라던 현수, 자기이름은 bold로 해달라던 해빵과 아저씨, 지금은 서울에 있지만 많이 보고 싶은 우리지숙이, 야한 상일이, 그리고 이름이 희동이된 동희, 요즘 일한다고 정신없는 은숙이, 요즘 연애한다고 정신없는 정애, 그리고 수진이, 보금이, 강인이, 해길이, 진옥이, 희진이, 지수 강남패밀리 모두에게 감사의 말을 전하고 싶습니다. 힘들 때 항상 옆에 있어주고 용기 잃지 않게 해주고 이해해줘서 고맙습니다.

그리고 힘들 때 짜증도 많이 냈는데 짜증 다 받아주고 이해해주고 옆에서 많이 응원해준 울 세익이오빠야한테도 고맙다는 말을 전하고 싶습니다.

마지막으로 태어나서 석사를 졸업할 때까지 그 누구보다도 고생 많이 하고 자식한테 바라는 것도 많을 텐데 묵묵히 제가 하고 싶은 일하게끔 뒷바

라지 해주시고 믿어주신,, 세상에서 제일 존경하는 부모님께 고개 숙여 감사드립니다. 지금은 비록 학생이지만 조금만 더 노력해서 믿어주신 만큼 몇 년 후에는 부모님 실망시키지 않는 정말 자랑스런 딸이 되도록 하겠습니다.

그리고 손녀 몸 걱정애 새벽잠 설치 가시면서 아침밥 해주시고, 조금만 아프면 손 꼭 잡고 병원 데려가 주시고 한의원가서 보약지어 약까지 챙겨주시는 우리 할머니.. 제가 할머니 건강 챙겨드려야 되는데 그러지 못해서 죄송합니다. 할머니 사랑하고 존경합니다. 그리고 건강하세요.. 또 우리 가족 못지않게 가족처럼 저를 걱정해주시고 챙겨주시는 아주머니께도 감사의 말을 전하고 싶습니다. 그리고 식사생활이 얼마나 힘든지 너무 잘 알아서 옆에서 많이 힘이 되 주는 우리 언니와 아직 어려서 말썽 피우지만 마음만은 누구보다도 더 착하고 누나 하는 일을 자랑스럽게 생각 해주는 우리 동생, 그리고 우리가족,, 너무 많아 다 말할 수는 없지만 모두 존경하고 사랑합니다.

한 분, 한 분 평생 잊지 않고 살아가겠습니다. 이 모든 분들께 감사와 존경의 마음을 담아 이 논문을 바칩니다.