



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

Anti-obesity Effects of *Sophora tonkinensis*
Gapnep. in 3T3-L1 Adipocyte

指導教授 權 炫 住

2011 年 2 月

東 義 大 學 校 大 學 院

生 命 應 用 學 科

鄭 鉉 英

理學碩士 學位論文

Anti-obesity Effects of *Sophora tonkinensis*
Gapnep. in 3T3-L1 Adipocyte

指導教授 權 炫 住

이 論文을 理學 碩士學位論文으로 提出함

2010 年 12 月

東 義 大 學 校 大 學 院

生 命 應 用 學 科

鄭 鉉 英

鄭 鉉 英의 理學碩士 學位論文을 認准함

主審 김 병 우 ㉠

委員 이 은 우 ㉠

委員 권 현 주 ㉠

2010 年 12 月

3T3-L1 지방세포에서의 산두근 추출물의 항비만 활성 효과

정 현 영

동의대학교 대학원 생명융합학과

요 약

비만은 당뇨병, 고혈압, 심장 질환, 암, 관절질환 등 각종 성인병 및 만성 질환의 원인일 뿐 아니라 사망의 직접적인 원인이 될 수 있으므로 치료를 요하는 질병으로 분류된다. 전 세계적으로 비만인구가 폭발적으로 증가되고 있어 심각성이 더욱 고조 되고 있다. 이러한 비만을 치료하기 위해 천연물 유래의 비만 치료제의 연구가 필요하다.

산두근 (山豆根, *Sophora tonkinensis* Gapnep.)은 땅비싸라기의 뿌리를 말하는 것으로, 항암작용과 항염작용이 있다고 보고되고 있으며 비만에 대한 연구는 아직 보고되지 않고 있다. 본 연구에서는 산두근의 추출물(*Sophora tonkinensis* Gapnep. extract, STGE)이 지방전구세포(preadipocyte)에 triglyceride의 축적을 감소시키고 지방세포의 특이적 marker인 peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)- γ 와 CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) family의 발현을 저해시키는 결과를 얻었다. 또한 STGE은 지방전구세포에서 지방세포로 분화하는 초기 단계인 clonal expansion 단계를 억제하고 세포주기를 G1기에 정지 시켰다. 세포주기 G1 arrest와 관련된 단백질의 변화를 검토한 결과, p21의 발현량이 확연하게 증가하였으며 반면

cyclin E Cdk2, E2F-1, phospho-Rb의 발현량은 줄어드는 결과를 얻어 STGE은 비만세포증식을 억제하고 지방세포 내 지방 축적을 억제하는 기작을 나타내어 비만 예방 효과가 뛰어나다는 것을 알 수 있었다. 결과적으로 STGE은 항 비만제로서 adipogenic transcription factor와 그들의 특이적인 유전자의 발현을 억제시키고, 분화 초기 단계인 clonal expansion을 억제함으로써 지방세포로의 분화를 억제한다고 사료될 뿐 만 아니라, lipolysis의 효과도 볼 수 있어 항 비만제로서의 가능성을 볼 수 있었다.

목 차

1. 초록	i
2. 목차	iii
3. 그림목차	v
4. Scheme 목차	vii
4. Table 목차	viii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	12
1. 3T3-L1세포 배양	12
2. 후보 천연물의 메탄올 추출	12
3. 세포 독성 측정(cytotoxicity assay)	14
4. 지방세포의 분화유도(adipocyte differentiation)	14
5. 지방세포의 triglyceride 염색(Oil Red O staining)	16
6. 세포증식속도 측정(Trypan blue)	16
7. 세포주기 변화 측정(flow cytometric analysis)	17
8. 단백질 변화량 측정(western blot analysis)	17
9. 지방세포 내 triglyceride 제거를 측정(lipolysis assay)	20
10. 산두근의 유기용매 계통분획	20
III. 결과 및 고찰	22
1. 천연물 추출물의 항비만 효과	22
2. STGE의 세포독성	24
4. STGE의 triglyceride 축적억제 효과	26
5. STGE의 지방세포 분화 조절 전사이자에 미치는 영향	29
6. Clonal expansion inhibition	31

7. 세포주기 변화 분석	33
8. G1 cell cycle 관련 단백질 발현의 변화 확인	35
9. Lipolysis	37
10. <i>Sophora tonkinensis</i> Gapnep. 분획층별의 항비만 활성 효과 검토	39
11. <i>Sophora tonkinensis</i> Gapnep. 유래의 항비만 활성물질 분리	42
IV. 결론	45
V. 참고 문헌	50
VI. Abstract	55
VII. 감사의 글	57

그 립 목 차

Fig. 1. Global obesity forecast	2
Fig. 2. National by obesity remedy relation patent application share	3
Fig. 3. The patent application rate of mechanism to a natural resources obesity drug	5
Fig. 4. Differentiation of 3T3-L1 preadipocyte	6
Fig. 5. Analysis of gene expression by adipocyte differentiation program	7
Fig. 6. Induction of adipocyte differentiation by a cascade of transcription factors	10
Fig. 7. Methanol extracts of 10 kinds of natural resource candidates	13
Fig. 8. Process differentiation of 3T3-L1 pre-adipocyte	15
Fig. 9. Effect of natural resource extracts on differentiation inhibition of 3T3-L1 pre-adipocyte	23
Fig. 10. Cytotoxicity of STGE in 3T3-L1 pre-adipocytes	25
Fig. 11. STGE treatment of during the process of adipocyte differentiation stage	27
Fig. 12. STGE inhibit 3T3-L1 pre-adipocytes differentiation	28
Fig. 13. Effect of STGE on the expression of adipocyte - specific proteins	30
Fig. 14. Inhibition of 3T3-L1 pre-adipocyte proliferation by STGE	32
Fig. 15. Cell cycle distribution of 3T3-L1 pre-adipocytes after treatment of STGE and MDI	34
Fig. 16. Alteration of G1 cell cycle arrest-related protein expression in 3T3-L1 pre-adipocytes treated with STGE	36
Fig. 17. Stimulatory effect of STGE on glycerol release in 3T3-L1	

adipocytes	38
Fig. 18. Organic solvent fractions of STGE inhibits 3T3-L1 adipocytes differentiaton	40
Fig. 19. Effect of organic solvent fractions of STGE on the amount of glycerol in 3T3-L1 adipocyte	41
Fig. 20. Effect of EtOAc fraction from STGE on anti-besity activity ·	44
Fig. 21. Proposed anti-obesity mechanism of STGE through association with differentiation inhibition of adipocyte and lipolysis in 3T3 L-1 cells	49

Schem 목 차

Scheme 1. Procedure of extraction from the <i>Sophora tonkinensis</i> Gapnep.	21
Scheme 2. Fractionation and purification of STGE by various organic solvents	43

Table 목 차

Table 1. List of first antibody	19
---------------------------------------	----

I. 서론

비만은 음식물의 섭취(food intake)와 에너지 소비(energy expenditure) 사이의 불균형으로 인한 대사 장애로 체내에 지방이 과잉 축적된 상태를 말한다(1-3). 세계보건기구(WHO)의 기준에 따르면 체중(kg)을 신장(meter)의 제곱으로 나뉘 구하는 체질량지수(BMI, Body Mass Index)가 18.5~24.9 사이면 정상, 25 이상이면 과체중, 30 이상이면 비만으로 분류하는데(4), 전 세계적으로 비만인구가 폭발적으로 증가하여 2005년 4억 명인 세계 비만 인구가 2015년에는 7억 명에 이를 것으로 보고되어 있다(Fig. 1).

비만은 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 심장질환, 관절염, 호흡기 질환, 성기능 장애, 암 발생 등 각종 성인병 및 만성 질환의 원인일 뿐 아니라 사망의 직접적인 원인이 될 수 있으므로, WHO에서 1996년에 비만을 치료가 필요한 질병으로 분류하였다. 이에 따라 비만 치료와 예방에 관한 관심과 연구가 점점 증가되고 있다(5-7).

비만 치료 방법으로는 식사 요법, 운동 요법, 행동 조절 요법, 약물 치료, 치아 고정, 위절제술 등이 있으나, 최근에는 ‘비만 치료제’를 사용하는 약물 치료 방법이 활성화 되고 있다. 세계적으로 비만 인구의 증가에 따라 비만 치료제 시장도 급격히 증가하여 2010년에는 약 20억 달러 규모의 시장을 형성할 것으로 예상되며, 우리나라의 경우도 2008년에 약 700억원 규모의 시장을 형성하였다. 또한 향후 시장규모가 지속적으로 증가할 것으로 전망된다. 비만 치료제의 인기는 신약개발로 이어져 비만 치료제 특허 출원이 급증하고 있으며, 비만 기술의 주요 국가로는 미국이 압도적으로 높은 출원건수를 보유하고 있으며 그 외 영국/독일/프랑스 등의 유럽과 일본이 다른 국가에 비해 상대적으로 많은 출원 건수를 나타내고 있다(Fig. 2). 이에 비해 한국은 비만분야 기술의 시장진입 시기가 조금 늦은 경향이 있으나, 2000년대 들어서면서 새롭게 이 분야에 진출하려는 특허 출원이 많아지고 있다. 그러나 비만 치료제의 시장의 증가와 더불어 비만 치료제의 부작용 및 독성에 대한 보고도 꾸준히 증가하였고, 실제로 비만 치료제 복용 환자의 사망

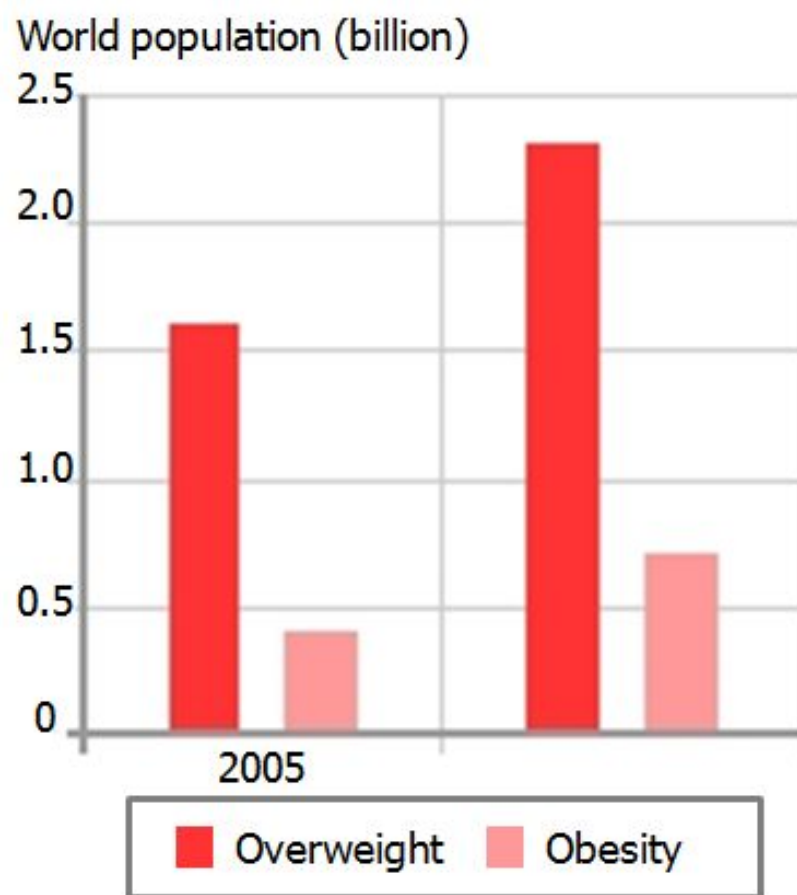


Fig. 1. Global obesity forecast

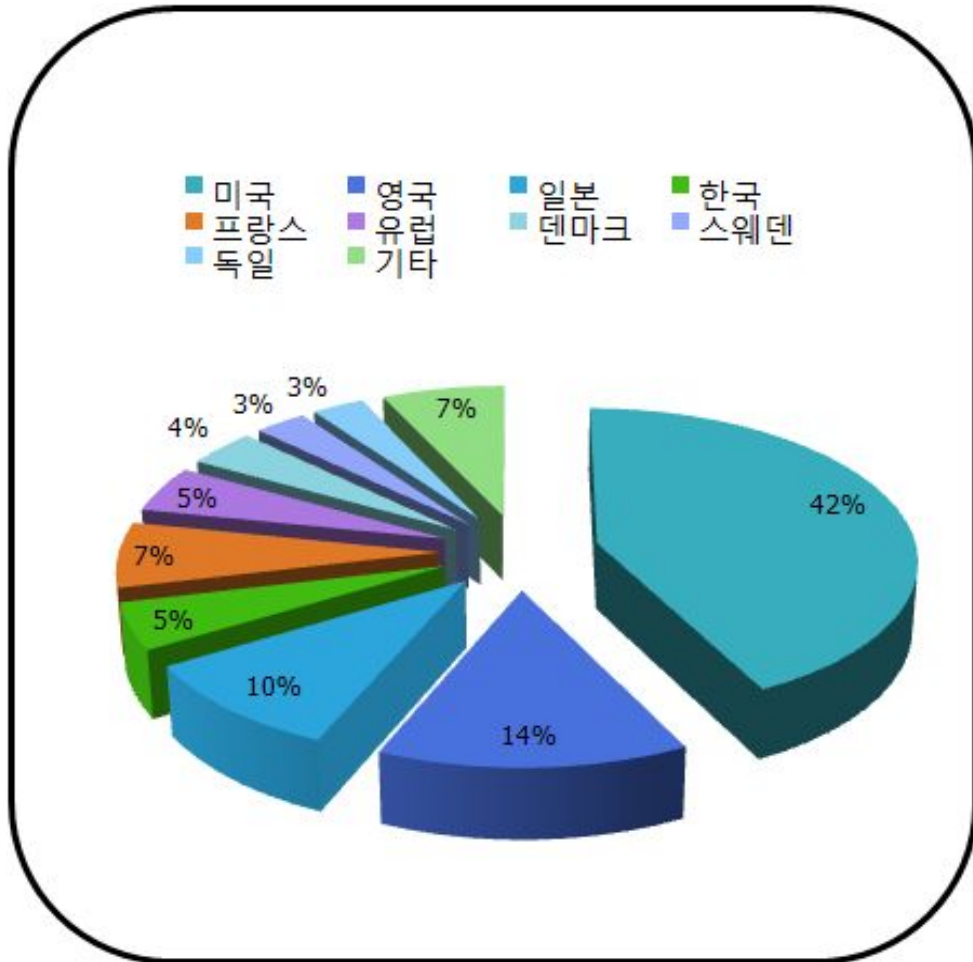


Fig. 2. National by obesity remedy relation patent application share

사례도 보고되어 판매 중지된 약품도 다수 존재한다. 따라서 부작용이 없는 신규 비만 치료제의 개발을 위해, 최근에는 천연물에서 비만 치료제를 개발하려는 노력이 증가하고 있다.

천연물 유래의 비만 치료제의 작용기작별 출원 동향을 살펴보면 소화 흡수 저해제, 지방 세포 분화 저해제, 호르몬 조절제, 열 대사 촉진제, 식욕 억제제, 지방산 생성 억제제, 신생혈관 억제제 등, 비만의 다양한 작용기작을 바탕으로 연구가 수행중임을 알 수 있다(8, Fig. 3).

지방세포는 영양상태가 충분한 경우 중성지방을 합성하여 저장하고 있다가 에너지가 필요한 다른 조직이나 기관에 공급하는 수동적 기능만을 수행하는 것으로 여겨져 왔다. 그러나 최근 지방세포에서 분비되는 leptin의 발견을 시작으로, 지방세포가 여러 신호 전달 물질 및 호르몬을 생산하고 분비함으로써 체내 에너지 대사를 능동적으로 조절해 나가는 것이 알려졌다(9). 하지만 대사 장애로 인하여 지방세포가 과다하게 분화되거나 에너지가 과잉 공급되면 비만으로 발전하게 된다. 따라서 많은 연구자들이 현재 이러한 지방세포의 분화 및 분화억제, 지방 대사 조절 등에 대한 관심이 집중 되어 연구가 수행 되고 있다(10-11).

일반적으로 지방 합성은 다양한 조직으로 분화 가능한 중배엽성 줄기 세포를 성숙한 지방 세포로 분화시키는 과정으로, 이것은 지방 세포 특이적인 유전자 발현 조절과 유기적인 전사 인자의 cascade 반응을 포함한다. 유기적인 전사 인자에는 peroxisome proliferator activated receptors (PPARs), CCAAT/enhancer binding protein (C/EBPs), 그리고 sterol regulatory element binding protein (SREBP) family 등이 있어, 이처럼 지방 세포로 분화 되어질 때 많은 유전자들이 관여한다(12-13, Fig. 4).

3T3-L1은 지방 전구 세포주로서 지방 세포를 분자 생물학적으로 연구하기 위하여 가장 많이 사용되는 세포 모델이며, 약 30년 전 Green박사에 의해 소개 되었으며 많은 연구 결과로 지방세포 분화 메커니즘이 밝혀졌고, 현재에도 활발히 이용되고 있는 세포주이다(14-17).

지방 세포로의 분화는 순차적으로 confluence, hormonal induction, mitotic clonal expansion, growth arrest 와 terminal differentiation 단계로 일어난

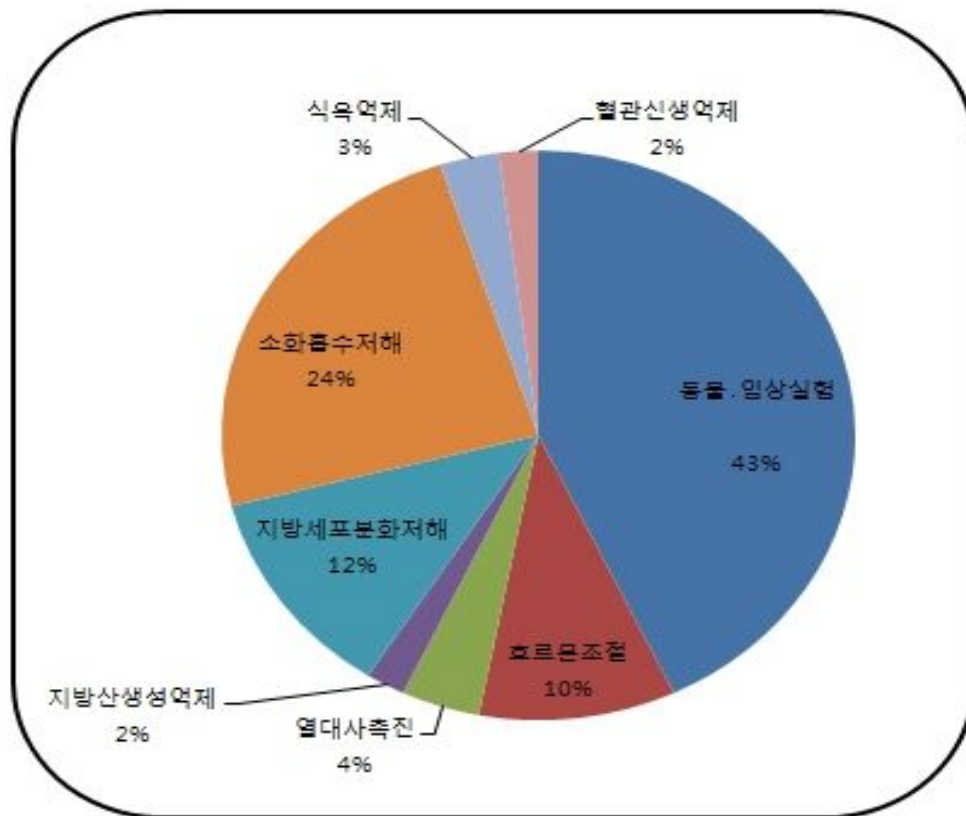


Fig. 3. The patent application rate of mechanism to a natural resources obesity drug

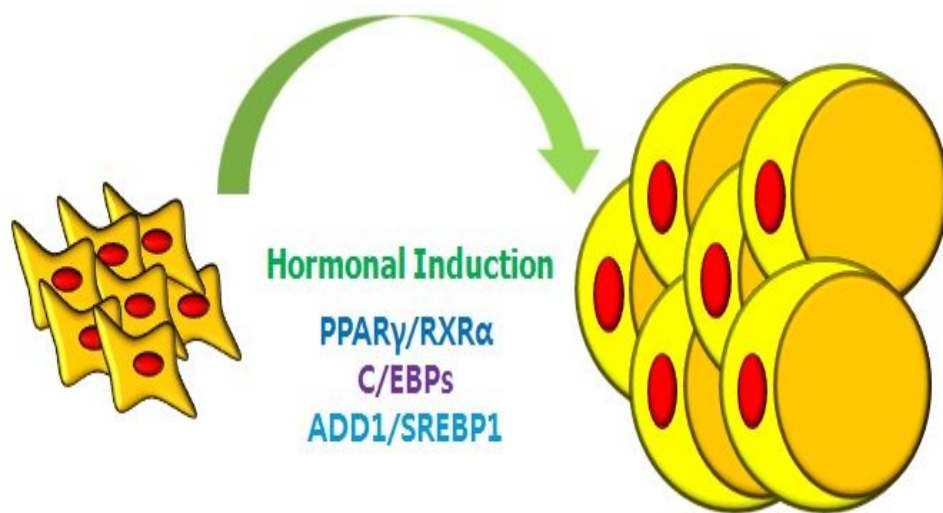


Fig. 4. Differentiation of 3T3-L1 pre-adipocyte

다. 먼저 confluence 상태가 되면 지방 전구 세포는 contact inhibition에 의해 세포의 성장이 멈추고 G1기에 고착된다. 이후, hormonal induction으로 분화 자극이 일어나면 C/EBP β 와 C/EBP δ 의 발현에 의해 한 번 혹은 두 번의 세포분열이 일어나는 mitotic clonal expansion 단계에 들어간다. 이어 PPAR γ 와 C/EBP α 의 발현으로 통하여 지방 전구 세포는 완전한 분화 세포 단계 직전인 growth arrest의 시기로 접어들게 된다. 마지막 단계인 terminal differentiation은 수일에서 수주의 시간이 걸린다. 즉, 지속적인 growth arrest가 일어나면 성숙된 지방 세포의 특징이 점차 나타나게 된다. 지방 전구 세포는 형태적으로 둥글게 되고, PPAR γ 와 C/EBP α 의 영향으로 실제로 지방세포의 표현형을 결정짓는 대부분의 유전자들이 조절되거나 그 발현이 활성화된다. 이들 유전자들로는 GPDH (glycerophosphate dehydrogenase), ACC (acetyl-CoA carboxylase), ME (malic enzyme), Glut (Glucose transporter type) 4, IR (insulin receptor), aP2 (adipocyte selective fatty acid binding protein) 등이 있다. 이러한 과정을 통해서 지질 방울 (lipid droplet)들이 세포질에 나타나게 되고, 시간이 지남에 따라 커지고 또 합쳐지면서 하나 혹은 몇 개의 큰 방울이 되어 지방세포 분화가 완료된다(18, Fig. 5).

이 중 지방 세포 분화 과정의 가장 큰 특성은 growth arrest와 mitotic clonal expansion이다. 지방 전구 세포가 confluence 단계가 되면 contact inhibition으로 인해 세포주기가 정지되는데 이때 분화 유도제인 FBS (fetal bovine serum) 및 MDI (dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine, insulin)를 처리하게 되면 세포는 G1기를 빠져나오는 동시에 다시 세포주기로 들어가게 된다. 그 결과 세포의 숫자는 처음에 비해 약 3-4배 증가하게 되는데, 이 과정을 mitotic clonal expansion이라 부른다. 이 과정은 지방 세포 분화에 필수적인 부분으로, 많은 연구자들의 연구결과에 따르면 세포주기를 억제하면 지방세포의 분화가 진행되지 않아 항비만 효과가 뛰어나다는 보고가 있다(23). Mitotic clonal expansion 시기에 세포는 순차적인 전사인자의 발현을 통해 지방 세포 특이 유전자 (C/EBP family, PPAR γ)의 발현을 준비하게 된다. 즉 mitotic clonal expansion은 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현

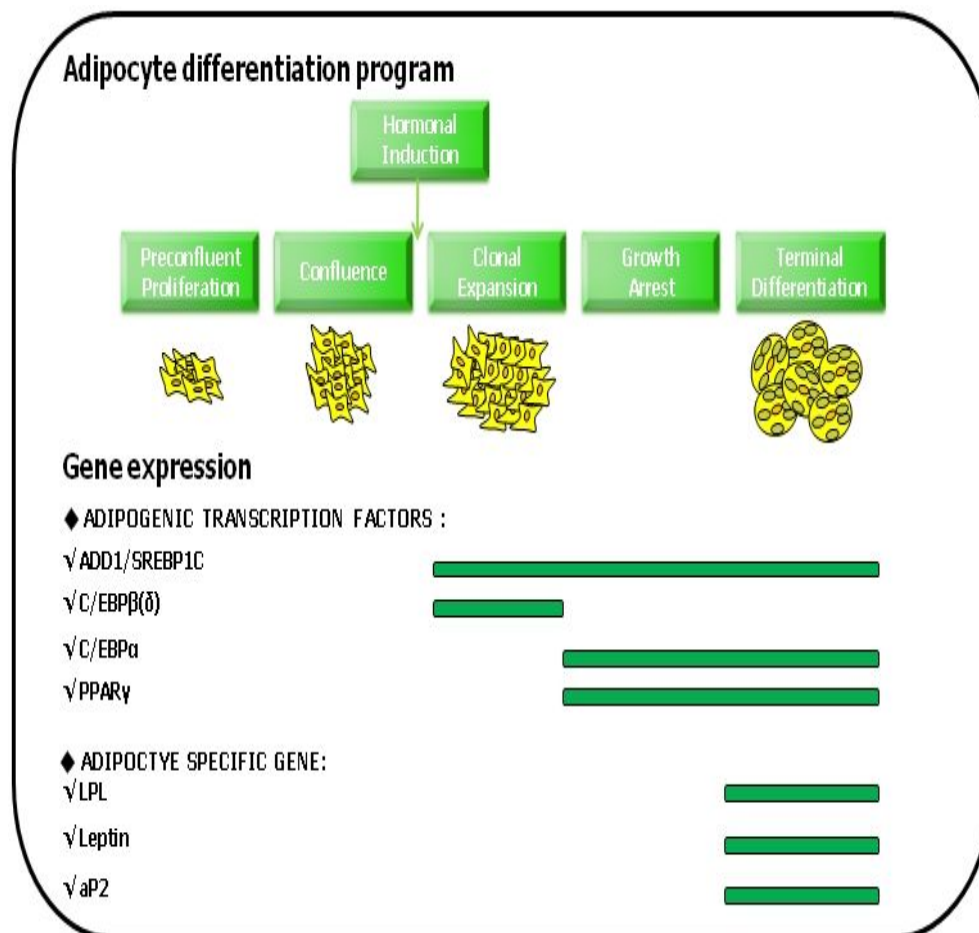


Fig. 5. Analysis of gene expression by adipocyte differentiation program

을 위한준비단계라고 할 수 있는데, 현재까지 이 단계에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려진 전사인자는 C/EBP β 이다.

지방 조직의 분화는 근육 세포 분화나 신경 세포 분화와는 달리 여러 호르몬과 다양한 전사인자들의 상호작용을 통하여 매우 복잡하게 이루어진다(19, Fig. 6). 지방 전구 세포가 지방 세포로 분화하는 과정에는 세포의 형태적 변화와 유전자 발현양상의 변화 등이 함께 일어난다. 대부분의 경우 이러한 변화는 전사 단계에서 각 유전자의 발현양의 변화를 나타내는데 지방세포 특이적인 전사인자들의 경우에도 분화 과정에 따라 발현양의 변화가 나타난다.

지방 세포 분화와 관련된 전사 인자로서 제일 처음 밝혀진 C/EBP α 는 basic leucine zipper (bZIP) domain을 갖고 있는 전사인자로서 C/EBP family에 속하는데, C/EBP α 이외에도 C/EBP β 와 C/EBP δ 가 C/EBP family에 포함된다. 지방세포의 분화과정에 있어 C/EBP α 는 초기과정인 지방 전구 세포에서는 발현이 관찰되지 않지만, 분화과정의 후반기에 발현이 촉진되어 지방세포 분화관련 유전자들의 발현을 조절한다. C/EBP β 와 C/EBP δ 의 발현은 각각 dexamethasone과 cAMP에 의해 유도되며, 지방세포 분화의 초기 단계에 그 발현이 증가한다. 이들 전사인자의 발현증가는 PPAR γ 전사인자의 발현을 증가시키며 이어 C/EBP α 의 발현도 증가하게 된다. 따라서 지방 세포분화 과정에 있어서 초기단계의 C/EBP β 와 C/EBP δ 의 발현은 PPAR γ 의 발현을 유도하며, PPAR γ 의 발현 증가는 C/EBP α 의 지방 세포 분화 후기의 발현을 유도하는 것으로 보인다(20).

PPARs는 nuclear hormone receptor superfamily에 속한다. PPAR family member로는 PPAR α , PPAR γ 와 PPAR δ 가 있으며 이들 PPAR 전사인자들은 RXR (Retinoid X receptor)와 heterodimer을 이루어 표적 유전자의 promoter 또는 inhancer에 존재하는 PPRE (peroxisome proliferator response element)를 인지하고 표적 유전자의 발현을 조절해 나간다(21). PPAR 유전자는 서로 다른 전사 시작점과 alternative splicing을 이용하여 PPAR γ 1과 PPAR γ 2 두 종류의 isoform을 만든다. 이중 PPAR γ 2는 지방 세포에서 선택적으로 발현하며 지방세포분화와 지방산 대사 조절에서 중요한

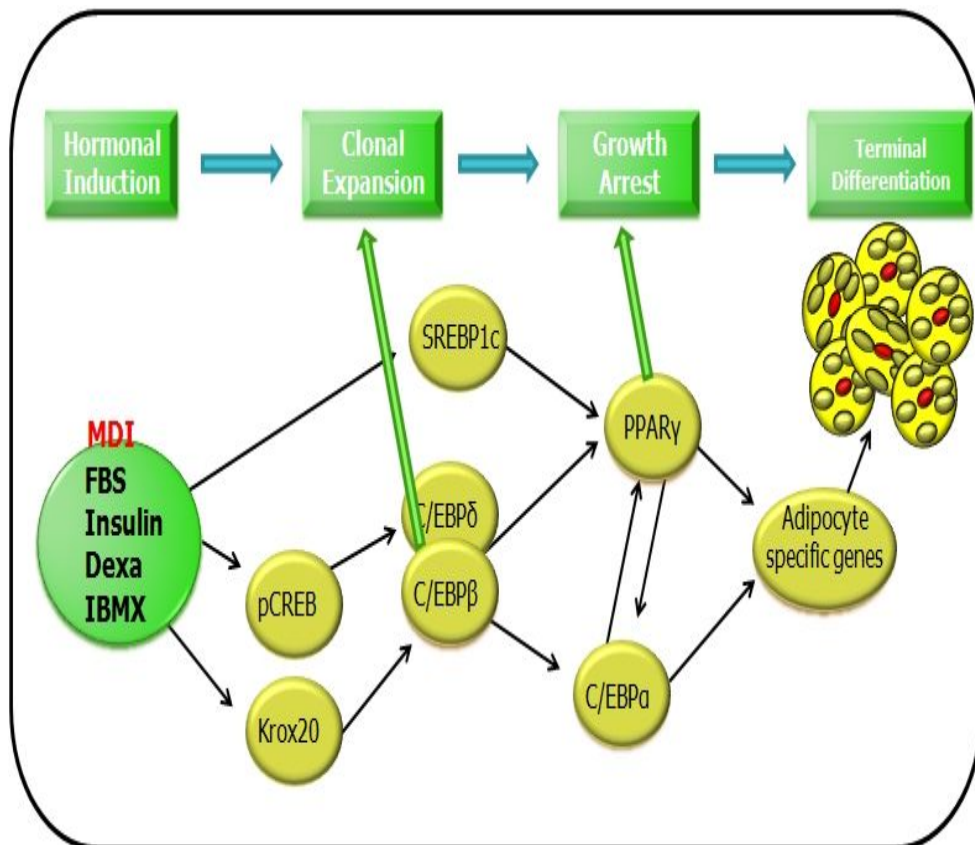


Fig. 6. Induction of adipocyte differentiation by a cascade of transcription factors

기능을 담당하고 있다. 지방 세포 분화에서 PPAR γ 는 분화 촉진을 유발하고, 다른 전사인자에 의해 분화 조절되는 것보다 아주 강력하게 분화가 촉진된다. PPAR γ 의 발현조절은 C/EBP family에 의해 조절되며 특히 C/EBP β 가 PPAR γ 의 지방 세포 분화의 초기발현을 유도하는 중요한 기능을 수행한다. PPAR γ 의 표적 유전자로는 지방조직 특이 유전자로 밝혀진 aP2가 있으며, 이외에도 PEPCK, leptin 및 C/EBP 등이 포함된다(22).

본 연구는 지방세포 분화의 각각의 단계에서 발현되는 전사인자 및 표적 단백질의 변화를 이용하여 항 비만물질을 screening 하던 중 산두근 (山豆根, *Sophora tonkinensis* Gapnep.)이 항비만 활성을 나타냄을 발견하게 되었다. 산두근은 콩과에 속하는 땅비싸리의 뿌리와 뿌리줄기를 말하는 것으로 일본에서는 광두근 (*Sophora subprostrata* Chun.)이라 불린다. 주로 우리나라와 중국 등지에 분포하고 있으며, 8~9월경에 뿌리를 채취하여 깨끗이 씻은 다음 햇볕에 말려 주로 약재로 사용한다(24).

산두근에 대한 연구로는 국내에서 산두근이 여러 유형의 백혈병 환자에서 백혈병 억제효과에 대한 보고가 있고, 식중독성 미생물에 항균효과가 있다고 보고되었다. 또한 산두근이 폐암 세포에 대해 항암효과가 있다고 보고되어 있다(25-27).

이와 같은 산두근의 여러 생리활성에 대한 결과들은 보고되어 있지만 항비만 활성 효과에 대한 연구는 아직 보고되지 않았다. 이에 본 연구에서는 산두근의 항비만 생리 활성을 탐색하기 위하여 3T3-L1 adipocyte를 이용하여 지방세포의 분화 및 증식기전 조절효과를 검토하였고, 지방세포의 분화 프로그램 중, mitotic clonal expansion 단계에 미치는 산두근의 영향을 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 3T3-L1 세포 배양

3T3-L1 (mouse embryonic fibroblast cell line) 지방전구세포는 ATCC (American type culture collection)에서 구입하여 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% calf serum, antibiotics (penicillin 100 units/ml, streptomycin 100 units/ml)를 첨가하고 37℃, 5% CO₂ 세포 배양기에서 배양하였다.

2. 후보 천연물의 메탄올 추출

민간요법으로 내려온 10가지의 천연물 후보군을 각각 100g을 잘게 세절한 후 메탄올을 이용하여 75℃에서 3시간 동안 3회 추출하였다. 이 추출액들은 Whatman No.2(Whatman international Ltd., England)에 여과하여 불순물을 제거하였고, 여과액은 45℃에서 감압 농축하여 Fig. 7. 와 같이 추출물을 얻었다.



Fig. 7. Methanol extracts of 10 kinds of natural resource candidates

3. 세포독성 측정(cytotoxicity assay)

산두근 추출물 (*Sophora tonkinensis* Gapnep. extract, STGE)의 세포독성 효과를 PreMix WST-1 Cell Proliferation Assay System을 이용하여 확인하였다. 3T3-L1 preadipocyte을 96 well plate에 1×10^3 cells/well의 농도로 seeding한 후 24시간 배양한 다음 STGE을 10~200 μg 의 농도로 각각의 well에 처리하였고 대조군은 0.5% DMSO를 처리하였다. 37 °C에서 48시간 배양한 다음 WST-1 solution을 각 well에 20 μl 씩 첨가하고 4시간 반응 후 광학 농도를 효소면역측정 (ELISA, Enzyme linked immunosorbent assay) 판독기를 이용하여 450nm에서 측정하였다.

4. 지방세포의 분화유도(adipocyte differentiation)

3T3-L1 지방전구세포를 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum, antibiotics (penicillin 100 units/ml, streptomycin 100 units/ml)를 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 confluence상태가 되도록 배양하였다. 2일 더 배양한 후(day 0), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin, 0.25 μM dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX (SIGMA) : MDI)이 포함된 DMEM으로 교환하여 2일간 배양하였다(day 2). 지방세포로의 분화를 촉진하기 위해 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin이 포함된 DMEM으로 교환하여 4일간 배양하였다(day 6). 지방세포의 완전 분화를 위해 DMEM에 10% FBS, antibiotics를 첨가하여 2일간 더 배양하였다(day 8)(Fig. 8).

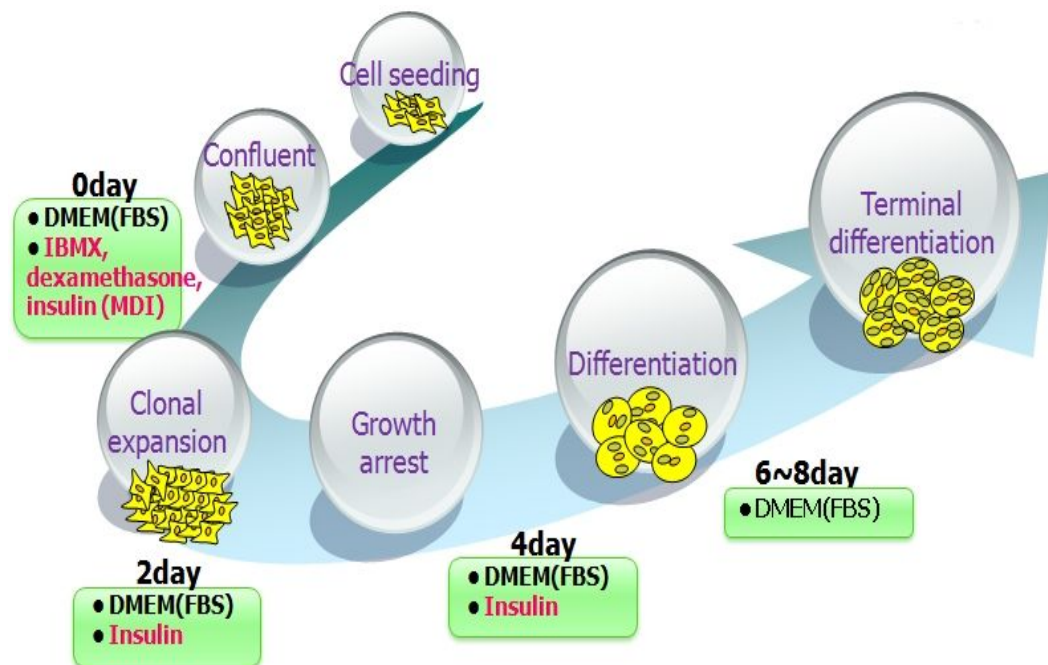


Fig. 8. Process differentiation of 3T3-L1 pre-adipocyte

5. 지방세포의 중성지방 염색(Oil Red O staining)

STGE의 지방세포 분화억제 효과를 검토하기 위하여 Oil Red O staining을 시행하였다. Oil Red O staining 중성지방을 염색하는 방법으로 지방세포 내 중성지방 축적 정도를 시각화할 수 있다. 3T3-L1 지방전구세포를 12 well plate에 1×10^5 cells/well의 농도로 seeding 하여 배양한 뒤 confluence 상태에서 2일 더 배양하였다. 그 후 $10 \mu\text{g/ml}$ insulin, $0.25 \mu\text{M}$ dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, SIGMA))이 포함된 DMEM(MDI)으로 교환하였다. 이 때, STGE을 농도별 ($10, 50, 100, 200 \mu\text{g/ml}$)로 같이 처리하고 2일간 배양하여 STGE이 지방세포 분화에 미치는 영향을 관찰하였다. 2일 배양 후 $10 \mu\text{g/ml}$ insulin이 포함된 DMEM으로 교환하여 4일간 배양을 하였으며 이때에도 STGE을 동일 농도로 처리하였다. 대조군으로(0.5% DMSO) 배양한 3T3-L1 지방전구세포가 완전한 지방세포로의 분화가 이루어진 시점에 모든 plate의 배지를 제거하고 차가운 phosphate buffered saline (PBS)으로 cell을 washing 한 후, 10% formalin을 처리하여 실온에서 1시간 고정시켰다. Formalin을 완전히 제거한 다음 60% isopropanol로 washing 뒤 Oil Red O working solution (SIGMA)을 넣고 실온에서 10분간 염색을 하였다. 이 때 Oil Red O working solution은 Oil Red O powder 0.35g 을 100 ml 의 isopropanol에 녹인 뒤 증류수에 $6 : 4$ 의 비율로 희석한 다음 여과하여 사용하였다. 세포를 염색한 뒤 Oil Red O working solution을 완전히 제거한 다음 증류수로 4번 washing하고 현미경으로 세포의 염색 상태를 확인하였으며, 흡광도 측정을 위하여 100% isopropanol에 용출시켜 spectrophotometer를 이용하여 500nm 에서 흡광도를 측정하였다.

6. 세포증식 속도 측정(trypan blue)

3T3-L1 지방전구세포를 60mm dish에 1×10^5 cells/dish의 농도로 seeding 하여 배양 한 다음 confluence 상태가 되면 2일간 더 배양하였다. 그 후 DMEM(MDI)로 교환할 때 STGE을 농도별 ($10, 50, 100, 200 \mu\text{g/ml}$)로 처리하였다. STGE을 처리 후 0, 1, 3, 5일의 각각 시간별로 세포를 배양하여

회수한 후 trypan blue (Trypan blue solution 0.4%, SIGMA)와 세포현탁액을 1 : 1로 처리하여 염색하였고 hemocytometer를 이용하여 생세포수를 측정하였다.

7. 세포주기 변화 측정(flow cytometric analysis)

3T3-L1 지방전구세포를 60mm dish에 1×10^5 cell/dish의 농도로 seeding 하여 배양 한 다음 confluence 상태가 되면 2일간 더 배양하였다. 그 후 DMEM(MDI)로 교환할 때 STGE를 농도별 (10, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하였다. 그 후, 3T3-L1 지방전구세포의 doubling time인 14시간 후에 세포를 회수하여 PBS로 세척하고 100% ethanol을 이용하여 4°C에서 고정시켰다. 고정된 세포는 분석 전에 PBS로 세척하고 ribonuclease A를 최종농도 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 첨가한 다음 실온에서 30분간 반응시켰다. PI/RNase staining buffer (BD PharmingenTM) 용액을 500 μl 첨가한 후 유세포 분석기 (FACs, Becton Dickinson, San Jose, CA)로 분석하였으며 결과는 Cell Quest program을 이용하여 분석하였다.

8. 단백질 변화량 측정(western blot analysis)

STGE를 농도별 (10, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리한 3T3-L1 세포를 회수하여 PBS로 한번 washing 한 후 CSK 완충액 (100 mM Pipes (pH 6.8), 100 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol (DTT))에 0.1% Triton X-100, 1 mM ATP와 1% Protease inhibitor Cocktail (BD PharmingenTM)가 첨가된 용액으로 현탁하여 15분간 lysis 시킨 후 초음파 파쇄기로 파쇄 하였다. 파쇄 한 세포는 14,000 rpm에서 20분간 원심 분리하였으며, 상등액내의 단백질량을 BCA법을 이용하여 정량한 후 동량의 단백질을 SDS 전기영동 하였다. 전기영동 후 gel 내의 단백질을 PVDF membrane에 전사시킨 후 blocking solution(0.15 M NaCl, 1 M Tris-HCl (pH7.5), 0.1% Triton X-100, 5% BSA)을 사용하여 4°C에서 16시간 (O/N) blocking 시켰다. 1차 항체는 4°C, 16시간 반응시켰으며, TBS (50 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 0.15 M NaCl)에 0.1% Triton X-100이 첨가된

buffer를 사용하여 membrane을 washing 한 다음 2차 항체를 넣고 4℃, 16 시간 반응시켰다. Membrane을 washing 한 후 면역반응 단백질은 화학발광 시스템 (Chemi-luminescence system ; SuperSignal West Femto Maxium sensitivity Substrate, Pierce)으로 검출하였다. 본 실험에 사용한 항체들은 다음과 같다(Table 1).

Antibody	Cat. No.	Company
C/EBP α	2295	Cell signaling Technology TM
C/EBP β	3087	Cell signaling Technology TM
PPAR γ	H-100(sc-7196)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
SREBP-1	C-20(sc-366)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
p21	H-164(sc-756)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
p27	F-8(sc-1641)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Cyclin E	E-4(sc-25303)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Cdk2	H-298(sc-748)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Rb	C-15(sc-50)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Phospho-Rb	9308	Cell signaling Technology TM
E2F-1	C-20(sc-193)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Actin	I-19(sc-1616)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

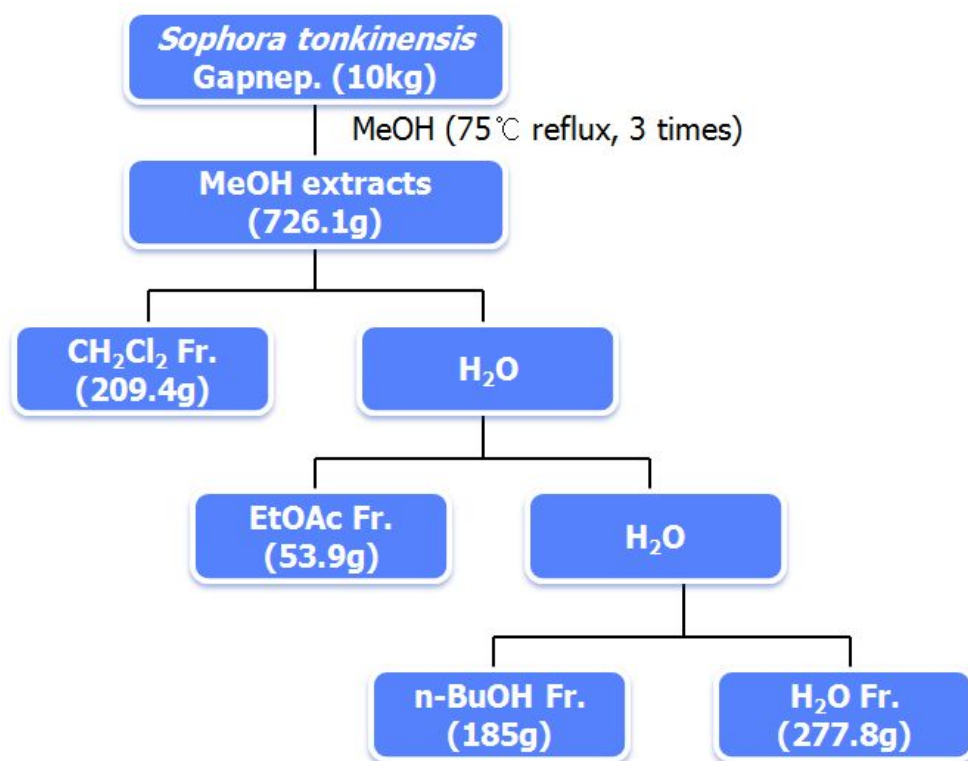
Table 1. List of first antibody

9. 지방세포내 중성지방 제거량 측정(lipolysis assay)

Confluence 상태의 3T3-L1 지방전구세포를 2일간 더 배양한 다음 DMEM(MDI)를 처리하고 2일 배양하였다(day 2). 그 후 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 DMEM에 insulin을 첨가하여 4일간 더 배양하였다(day 6). 완전 분화를 위해 DMEM에 10% FBS, antibiotics를 첨가하여 2일간 더 배양하였다(day 8). 100% 분화가 되었을 때 STGE를 농도별 (10, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리한 다음 48시간 더 배양하였다. 그리고 enzymatic reagent를 사용하여 배지에 방출되는 glycerol량을 측정하였다. Glycerol 방출량은 glycerol-3-phosphate oxidase (GPO) -TRINDER kit (SIGMA)를 사용하였다. STGE를 처리한 배양액 10 μl 와 Free Glycerol Reagent 800 μl 를 조심스럽게 혼합하고 37°C에서 5분간 반응시켰다. 반응 시킨 후 판독기 (ELISA, Enzyme linked immunosolvent assay)를 이용하여 540nm에서 측정하였다.

10. 산두근의 유기용매 계통분획

산두근 (*Sophora tonkinensis* Gapnep.)은 삼흥 건재 약업사 (서울)에서 구입하여 잘게 세절하여 분말화한 후, 산두근 10kg에 메탄올을 이용하여 75°C에서 3시간 동안 3회 추출하였다. 추출액을 Whatman No.2 (Whatman international Ltd., England) paper로 여과하여 불순물을 제거하였다. 여과된 용액은 감압 농축기를 사용하여 45°C에서 감압·농축하고 메탄올 추출물 726.1g을 얻었다. 메탄올을 이용한 산두근 추출물은 지금부터 STGE라 명하겠다. 이를 물에 현탁한 후, chloroform, ethyl acetate, n-butanol의 용매와 H₂O를 이용하여 순차적으로 분획하고 감압·농축하여 chroloform 분획물 209.4g, ethyl acetate 분획물 53.9g, n-butanol 분획물 185g, H₂O 분획물 277.8g을 얻었다(Scheme 1).

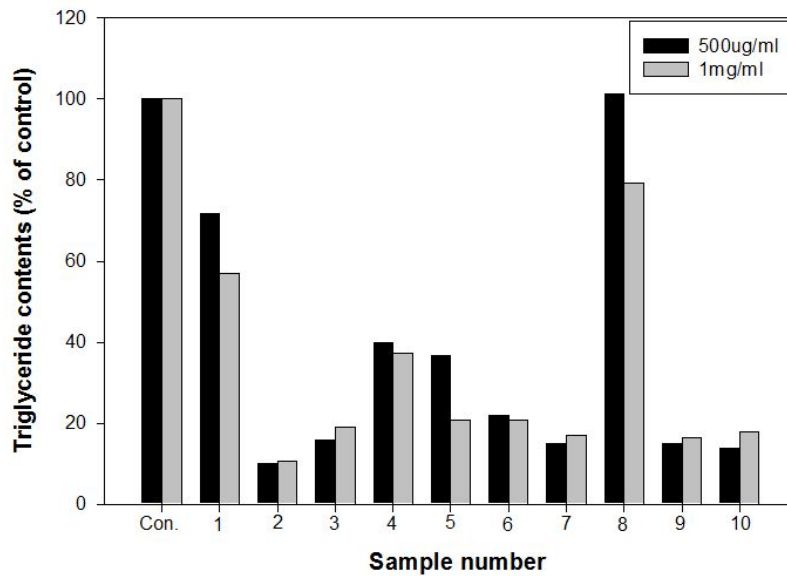


Scheme 1. Procedure of extraction from the *Sophora tonkinensis* Gapnep.

III. 결과 및 고찰

1. 천연물 추출물의 항비만효과

10종 후보 메탄올 추출물의 지방세포 분화 억제 효과를 보기 위해 3T3-L1 지방전구세포에 day 2, day 4, day 6, day 8에 각각 분화유도제를 첨가 할 때 마다 추출물을 동시에 처리하여 그 효과를 검토하기로 하였다. 각 추출물은 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1 mg/ml 로 2가지 농도로 처리하였다. 그 결과 대부분의 천연물 추출물에서 50%이상 triglyceride 함량을 감소시켰다. 특히 산두근 추출물에서 90%의 감소를 보여 가장 뛰어난 항비만 효과를 보였다(Fig. 9). 이 결과에 따라 산두근을 항비만 후보물질로 선정하였고, 산두근 추출물 (Sophora tonkinensis Gapnep. extract, STGE)을 이용하여 지방세포 분화 억제 효과 및 메커니즘을 검토하였다.



Sample(100g)	Triglyceride contents (% of control)	
	500 μ g/ml	1 mg/ml
1. 맥문동 (<i>Liriope platyphylla</i>)	70.38	58.40
2. 산두근 (<i>Sophora tonkinensis</i> Gapnep.)	10.19	11.69
3. 원지 (<i>Polygala tenuifolia</i>)	18.44	19.54
4. 천마 (<i>Gastrodia elata</i>)	39.32	37.14
5. 우슬 (<i>Achyranthes japonica</i> Nakai)	36.33	21.03
6. 돌미나리씨 (<i>Aceriphyllum rossii</i> seed)	20.30	19.01
7. 위령선 (<i>Clematis florida</i>)	17.19	18.10
8. 산사자 (<i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge)	102.55	80.00
9. 구절초 (<i>Chrysanthemum zawadskii</i> var.)	17.19	18.10
10. 두충(<i>Eucommia ulmoides</i>)	16.12	18.33

Fig. 9. Effect of natural resource extracts on differentiation inhibition of 3T3-L1 pre-adipocyte

2. STGE의 세포독성

STGE의 3T3-L1 지방전구세포에 대한 세포독성여부를 확인하기 위하여 PreMix WST-1 Cell Proliferation Assay System을 이용하였다. 3T3-L1세포를 96-well plate에서 24시간 배양한 다음 STGE을 농도별(10, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하여 48시간 배양하였다. 그 후 WST-1 solution을 첨가하고 4시간 반응시켰다. 이때, 살아있는 세포의 미토콘드리아에 존재하는 succinate dehydrogenase에 의해 생성된 수용성 formazan의 양을 450nm에서 배색 정량한 결과, 최고 시료 처리 농도인 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서도 86.8%의 높은 생존율을 나타내었다(Fig. 10.). 따라서 STGE은 3T3-L1에 대해 독성을 거의 나타내지 않은 것으로 판단된다.

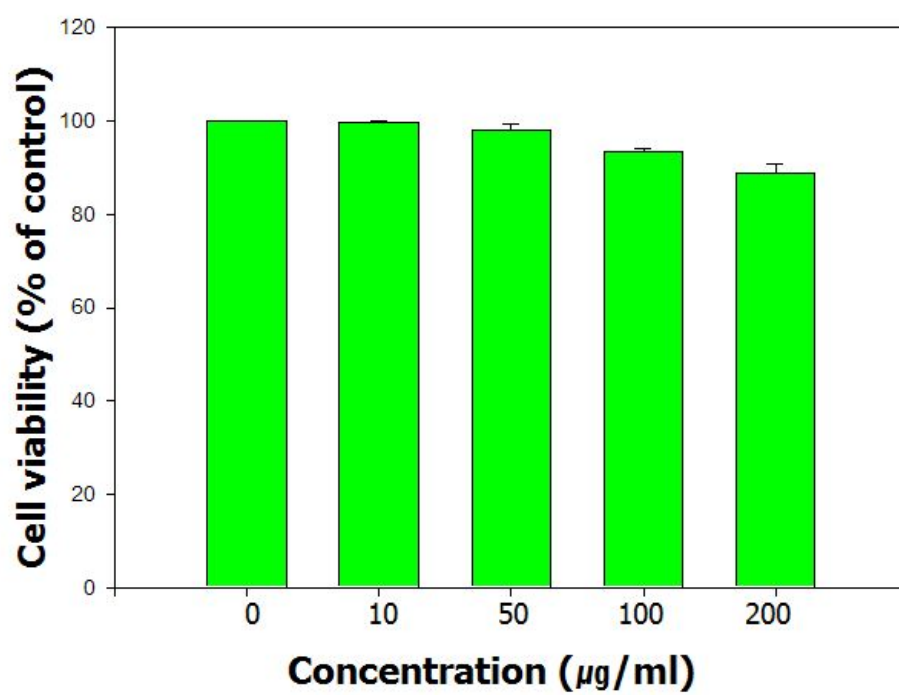


Fig. 10. Cytotoxicity of STGE in 3T3-L1 pre-adipocytes

3. STGE의 triglyceride 축적 억제 효과

3T3-L1 지방전구세포가 지방세포로 분화할 때 STGE이 지방세포 분화에 어떠한 영향을 미치는지 검토하였다. 각 day 별로 분화유도제(MDI, insulin)를 첨가할 때마다 STGE을 농도별(10, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하였다(Fig. 11). 그 결과 분화유도제만을 처리한 cells의 중성지방 축적을 100%로 하였을 때, STGE을 같이 처리한 cells 농도 의존적으로 triglyceride 축적이 저해되어(Fig. 11A), 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리 시 control cells에 비해 약 70%저해됨을 확인하였다(Fig. 11B). 이 결과로 미루어 볼 때 STGE은 지방세포 내에 지방 축적억제 효과가 탁월한 것으로 보인다.

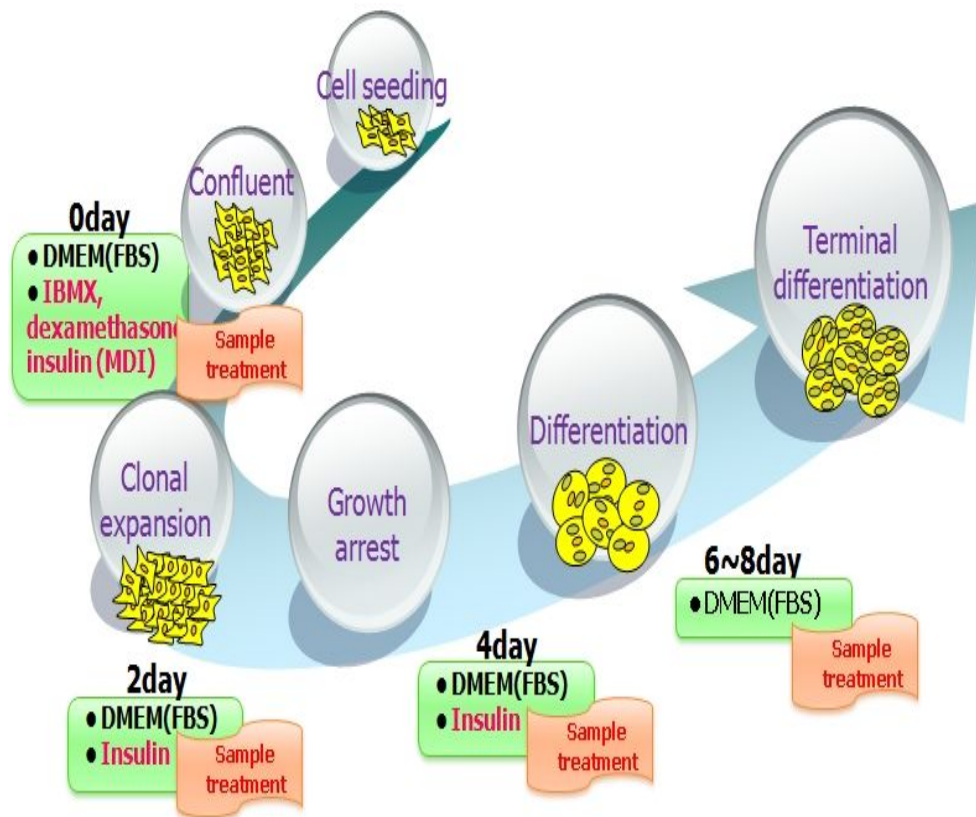


Fig. 11. STGE treatment of during the process of adipocyte differentiation stage

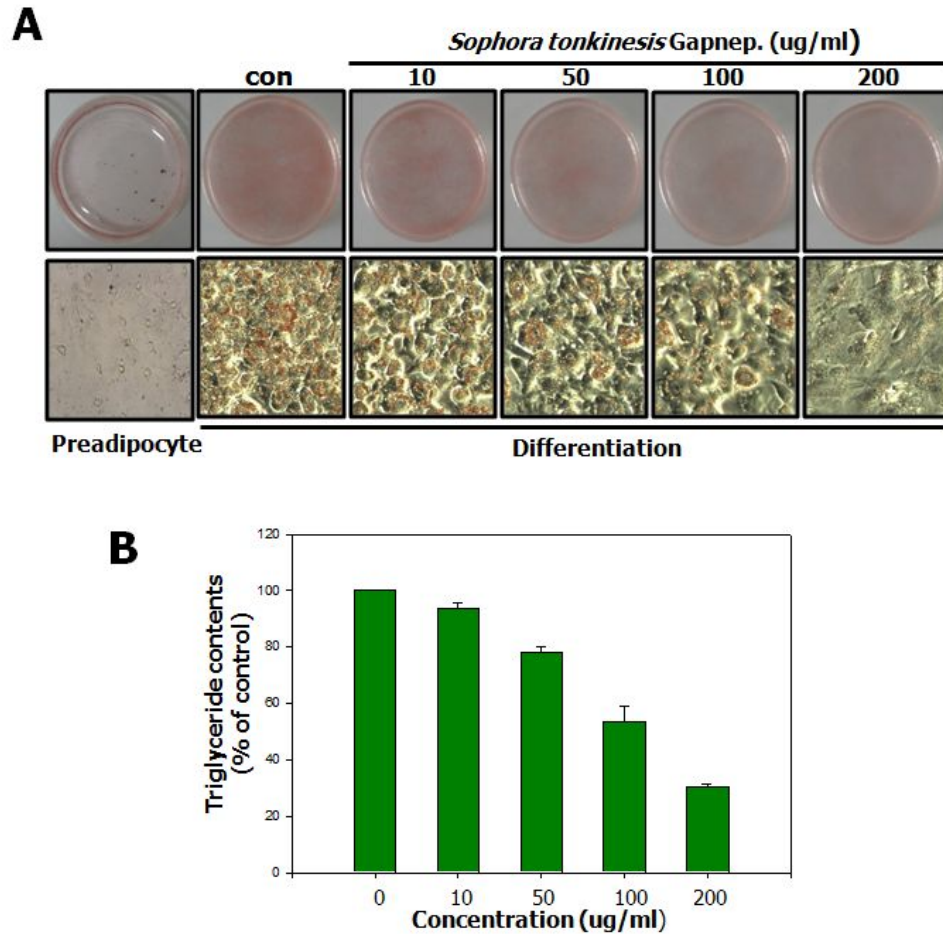


Fig. 12. STGE inhibit 3T3-L1 pre-adipocytes differentiation (A) The morphological changes associated with adipogenesis were photographed after Oil Red O staining. (B) The stained triglyceride content was quantified by measuring absorbance.

5. STGE의 지방세포 분화 조절 전사인자에 미치는 영향

지방세포의 분화는 근육세포나 신경세포 분화와는 달리 여러 호르몬과 다양한 전사인자들의 상호작용을 통하여 매우 복잡하게 이루어진다. 지방세포 분화와 함께 나타나는 세포의 모양 변화나 lipid의 축적과 같은 형태상의 변화는 세포가 분화함에 따라 유도되는 유전자들의 활성화에 의한 것이다. 지방세포의 분화조절은 peroxisome proliferation activated receptor gamma (PPAR γ), CCAAT enhancer binding protein (C/EBP) family라고 불리는 전사인자들이 중추적인 역할을 담당하고 있다. 분화 유도 물질은 이러한 전사 인자들의 발현을 촉진시킴으로서 지방전구세포를 지방세포로 분화시킨다(12-13). 바꾸어 말하면 항 비만물질 탐색을 위한 기초연구에서 가장 많이 쓰이는 방법으로 지방세포 분화 관련 전사인자들의 발현 저해를 통하여 지방세포로의 분화를 억제하고 지방 축적 감소 등을 야기 시킬 수 있다. 따라서, STGE에 의한 지방세포 분화 조절 전사인자들의 발현 변화를 살펴보았다.

C/EBP β 는 adipocyte에 hormonal induction이 시작되면 발현되는 단백질인데 STGE를 농도별로 처리한 결과 C/EBP β 의 발현이 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 13A). PPAR γ 와 C/EBP α 는 C/EBP β 의 자극을 받아 발현하는 단백질들로서 adipogenesis에서 중요한 전사 인자로 널리 알려져 있다. 따라서 지방세포 완전분화의 지표로 PPAR γ 와 C/EBP α 의 발현량을 살펴 본 결과 STGE에 의하여 PPAR γ 와 C/EBP α 의 발현량은 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다(Fig. 13B).

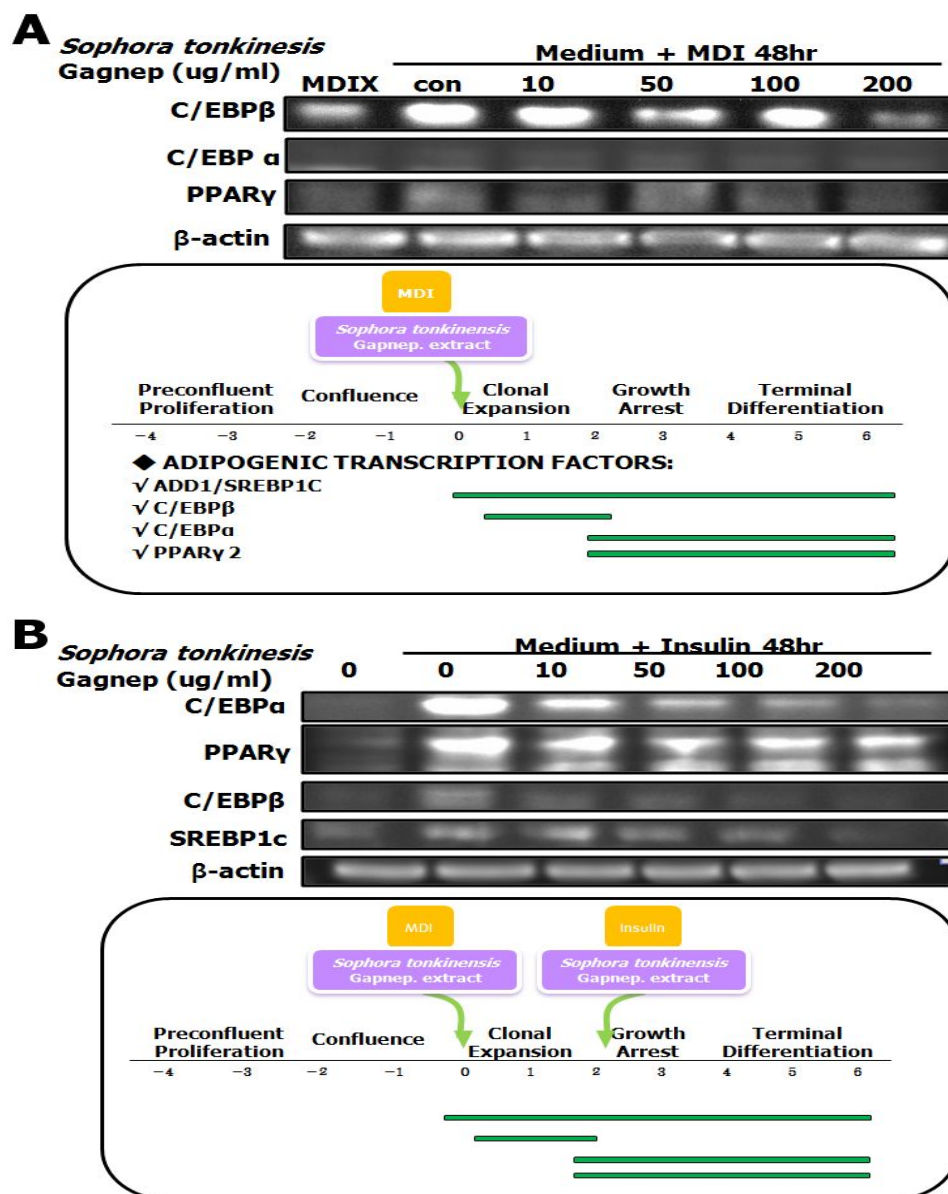


Fig. 13. Effect of STGE on the expression of adipocyte - specific proteins
(A) Post-confluent 3T3-L1 pre-adipocytes were incubated in MDI for 2 days with or without STGE. (B) Post-confluent 3T3-L1 pre-adipocytes were incubated in MDI for 2 days and media were changed to DMEM containing insulin for 2 days with or without STGE. Protein samples were subjected to Western blot analysis.

6. Clonal expansion inhibition

지방세포의 분화 프로그램은 순서 정연하게 confluence, hormonal induction, mitotic clonal expansion, growth arrest와 terminal differentiation 단계로 일어난다(18). 이중 mitotic clonal expansion 단계는 정지되었던 세포 주기가 hormonal induction에 의해 C/BEP β 가 발현되고 난 후, 세포주기가 다시 움직여 세포의 수가 3-4배 증가하는 단계이다. 이 mitotic clonal expansion 단계를 저해 하면 지방세포분화가 더 이상 진행되지 않는다는 연구 결과가 많이 보고 되어있다. 따라서 STGE이 mitotic clonal expansion 단계를 저해시키는지 확인하기 위해, confluence 상태의 cell에 MDI와 STGE을 동시에 처리한 다음 0, 24, 48시간에 생세포수를 측정하여 변화를 관찰하였다. 그 결과 MDI만을 처리한 cell의 증식은 0시간에 비해 48시간 때 2.4배 이상의 증식을 하였지만, MDI와 STGE을 동시에 처리한 cell의 증식은 현저하게 저해되었다(Fig. 14). STGE의 세포독성 결과(Fig. 1.)에서 독성이 거의 없다고 보았을 때 STGE은 3T3-L1 지방전구세포가 지방세포로 분화할 때 세포의 증식을 저해한다. 즉, STGE은 지방세포 분화 단계 중 clonal expansion 단계를 저해함으로써 지방세포의 증식을 억제하는 것으로 사료된다.

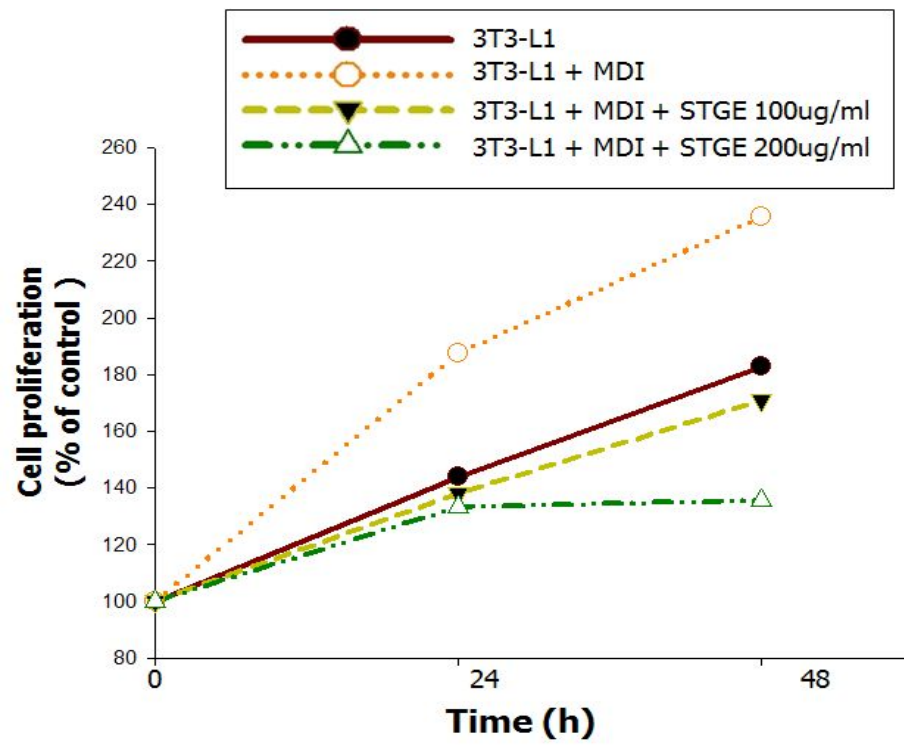


Fig. 14. Inhibition of 3T3-L1 pre-adipocyte proliferation by STGE

7. 세포주기 변화분석

결과 6에 따르면 STGE은 지방세포 분화 단계 중 mitotic clonal expansion 단계를 저해하는 것으로 보인다. 즉, mitotic clonal expansion 단계의 저해는 세포 주기의 저해이다. STGE이 mitotic clonal expansion 단계를 저해하면 어떠한 세포주기의 변화가 일어나는지 확인하기 위해 FACS analysis를 시행하여 세포 주기를 분석하였다. 이미 알려진 여러 연구 결과에 의하면 MDI를 3T3-L1 지방전구세포에 처리하면 세포분열과 세포주기가 재개된다고 보고되어있다(23). STGE이 이러한 세포 주기의 재개에 영향을 미치는지 확인하기 위해, 3T3-L1 지방전구세포에 MDI와 STGE을 동시에 처리하여 FACS analysis를 시행하였다. Fig. 15에서 확인되는 것처럼, STGE을 처리하지 않고 분화촉진인자(MDI)만 처리한 대조군 3T3-L1 지방전구세포는, G1기 개체군이 16.9 %, S기 개체군의 비율이 42.17%로 mitotic clonal expansion이 시작된 것으로 보인다. 이에 비해, STGE을 처리한 3T3-L1 지방전구세포는 STGE의 농도가 10, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 으로 증가할수록 G1기 개체군의 비율이 33.68%, 39.39%, 48.03%, 55.14%로 계속 증가되었으며, 상대적으로 S기 개체군의 비율은 점점 감소한 반면 G2/M기의 비율은 거의 변화가 없었다(Fig. 15). 즉, STGE의 처리 농도가 증가될수록 G1기에서 cell cycle arrest가 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 종합해보면 MDI만 처리한 3T3-L1 지방전구세포는 정상적으로 cell cycle이 진행되어 mitotic clonal expansion이 시작되지만, STGE을 처리하면 cell cycle의 G1기에서 S기로의 전이가 억제되는 G1 arrest를 일으켜 mitotic clonal expansion이 억제된다는 것을 확인할 수 있었다.

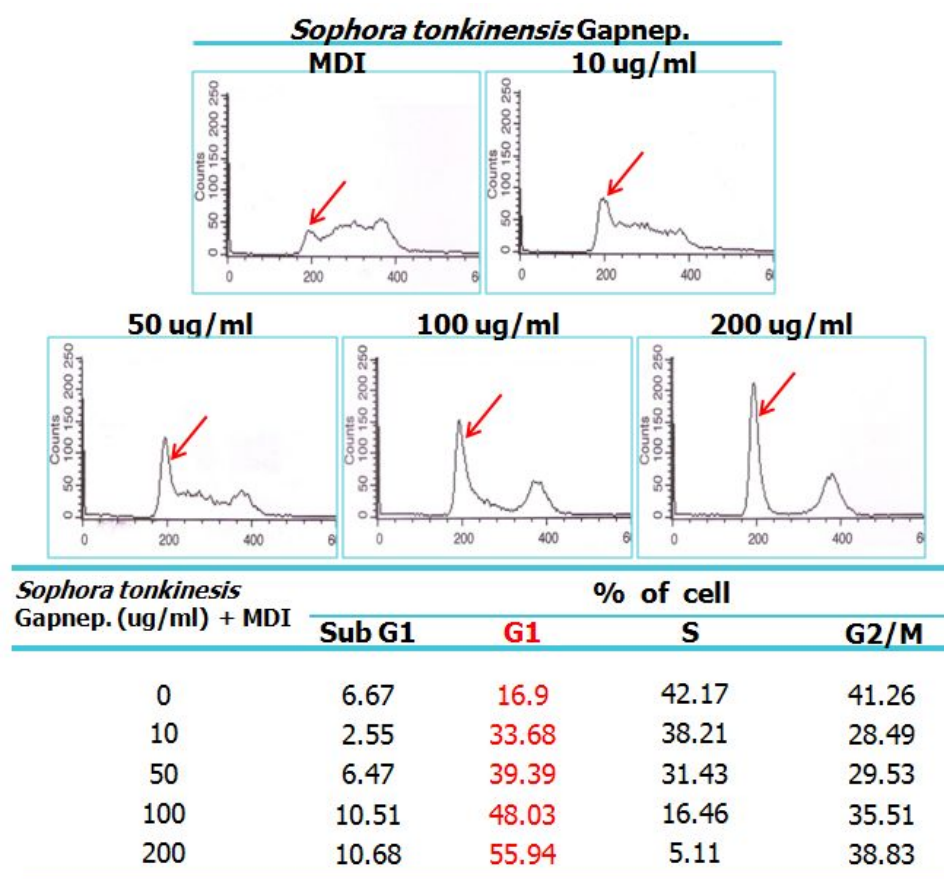


Fig. 15. Cell cycle distribution of 3T3-L1 pre-adipocytes after treatment of STGE and MDI

8. G1 cell cycle 관련 단백질의 변화

결과 7에서 STGE이 3T3-L1 세포의 G1 arrest를 유발하고 있음을 알 수 있었다. 이것을 보다 명확하게 분석하기 위해서 G1기의 cell cycle 관련 단백질들의 변화를 검토 하였다.

G1기에서 S기로의 전이에 필수적인 단백질인 cyclin E, Cdk2, pRb, phospho-pRb 및 전사인자 E2F-1과, G1기 전이를 저해하는 Cdk inhibitor p21과 p27의 발현 변화를 western blot analysis로 확인하였다(Fig. 16). 그 결과, STGE의 처리 농도가 증가될수록 cyclin E의 발현량이 감소되었으나, Cdk2의 발현량은 큰 변화가 관찰되지 않았다. Cdk2 inhibitor인 p21과 p27의 경우, Fig. 16. 에서 알 수 있듯이 STGE 처리 농도가 증가함에 따라 p21의 발현량이 농도 의존적으로 증가되었고 p27의 발현량은 거의 변화가 없었다. 또한 phospho-Rb와 E2F-1의 발현량은 STGE의 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 나타내었다.

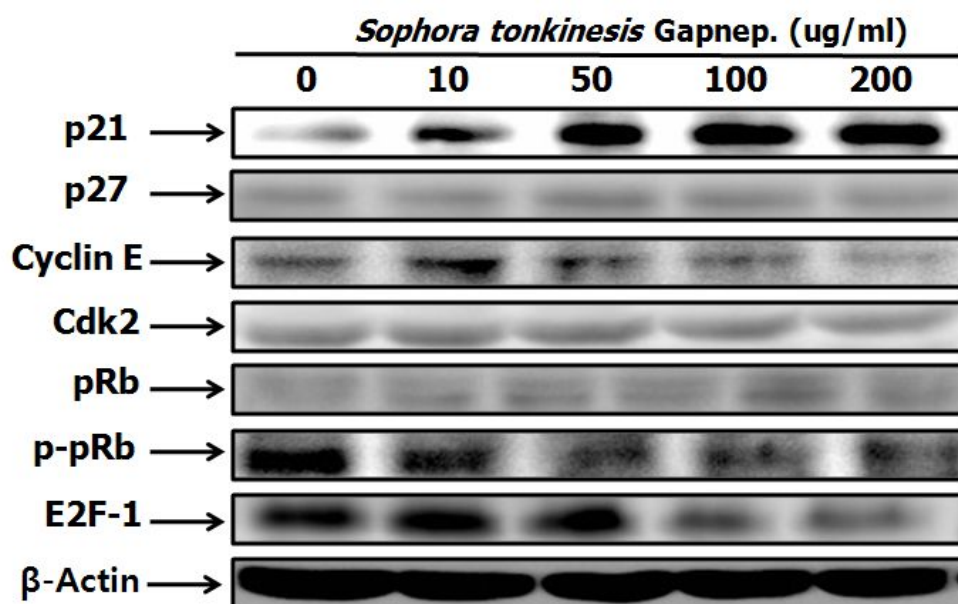


Fig. 16. Alteration of G1 cell cycle arrest-related protein expression in 3T3-L1 pre-adipocytes treated with STGE

9. Lipolysis

상기의 결과들은 분화억제 즉, STGE이 triglyceride의 축적을 억제한다는 것을 보여주었다. STGE이 3T3-L1 adipocyte가 100% 분화가 끝난 상태에서 지방구들의 lipolysis 활성이 있는지 검토하였다. lipolysis가 유도되면, triglyceride가 분해되어 세포질에서 glycerol과 fatty acid가 생성되고 계속적으로 lipolysis가 일어나면 glycerol은 세포 외로 방출된다(28). 3T3-L1 지방전구세포를 100% 분화시킨 다음 STGE을 농도별 (10, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리한 후 48시간 후에 배지로 방출된 glycerol의 양을 측정하였다. Fig. 17에서 보이듯이 control cells에서 방출된 glycerol의 양보다 STGE을 처리한 cell에서의 glycerol 방출량이 농도 의존적으로 증가됨을 알 수 있었고, 최고 처리 농도인 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 control cells 보다 glycerol의 양이 약 1.4 배 증가하였다. 이 결과에 의하면 STGE은 지방 세포의 분화 억제를 유도할 뿐 아니라, triglyceride의 분해 효과도 있는 것으로 보인다. 즉 STGE는 비만 예방 뿐 만 아니라, 치료제의 역할도 포함하고 있다고 사료되어진다.

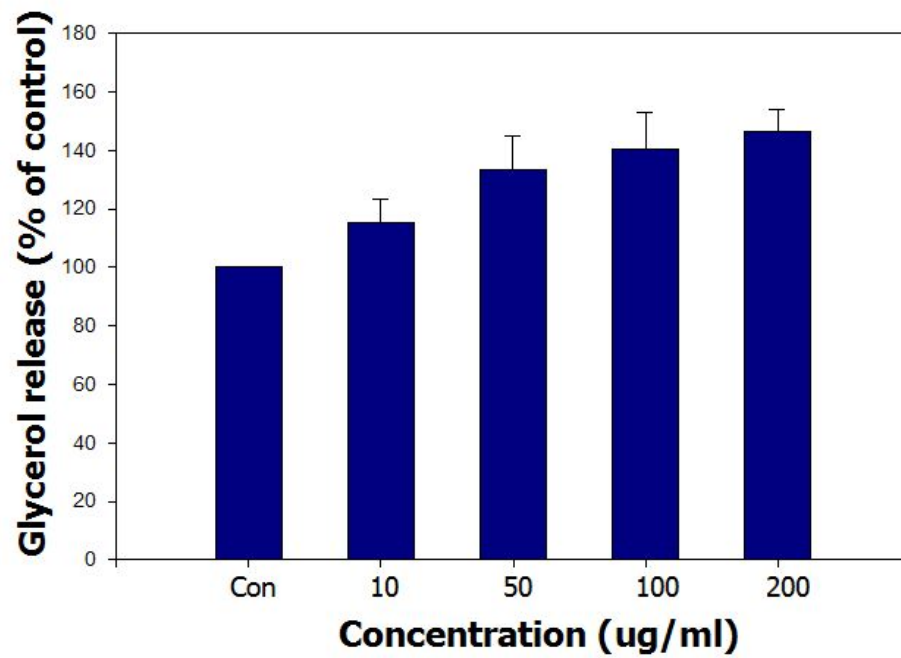


Fig. 17. Stimulatory effect of STGE on glycerol release in 3T3-L1 adipocytes

10. STGE의 각 분획물별 항비만 활성 효과

STGE를 유기용매 계통분획을 하였으며, 각 분획물들을 3T3-L1 preadipocyte에 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 MDI와 동시에 처리하여, Oil Red O staining으로 triglyceride 함량을 측정하였다. Fig. 18. 에서와 같이 chloroform, ethyl acetate의 분획물에서 triglyceride 함량이 각각 대조군의 25%, 30%로 감소하였다. 이로 보아 산두근 분획물들 중 chloroform층과 ethyl acetate층에 지방분화 억제 활성을 가진 물질이 포함되어 있을 것으로 사료된다.

또한 각 분획물의 lipolysis 효과를 검토하기 위해 100% 분화 완료된 3T3-L1 지방세포에 chloroform, ethyl acetate, n-butanol 및 H_2O 의 분획물을 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하여 48시간 배양한 후 배지로 방출된 glycerol의 함량을 GPO-TRINDER kit를 이용하여 측정하였다(Fig. 19). 그 결과 ethyl acetate 층의 glycerol 방출량이 0.5% DMSO를 처리한 control에 비해 약 1.4배 증가함을 확인할 수 있었다. 따라서 지방세포의 분화 억제 활성과 지방 분해 활성을 모두 가지는 ethyl acetate 분획을 활성 분획으로 결정하였다.

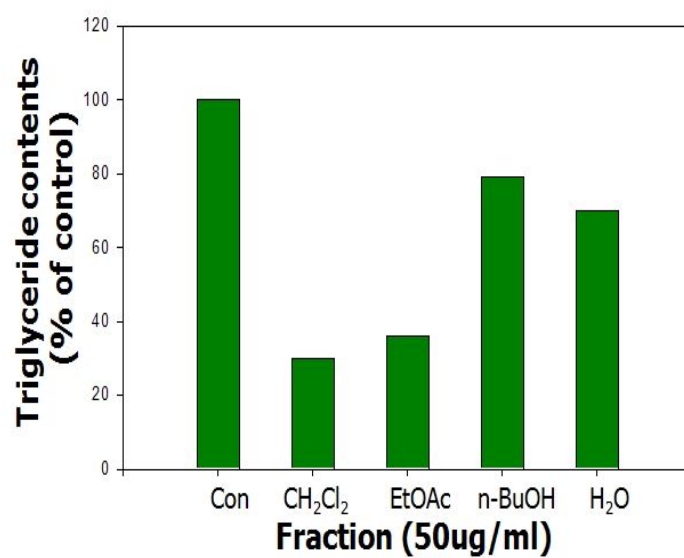
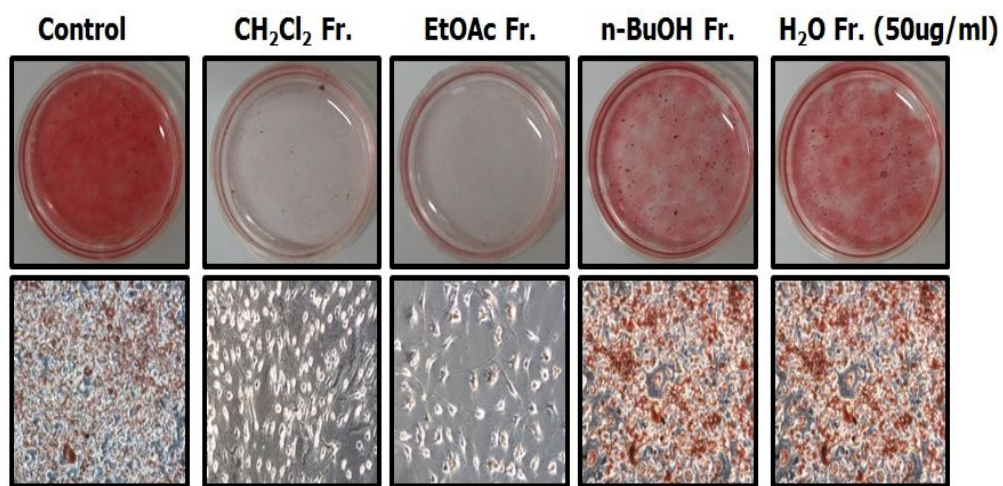


Fig. 18. Organic solvent fractions of STGE inhibits 3T3-L1 adipocytes differentiation

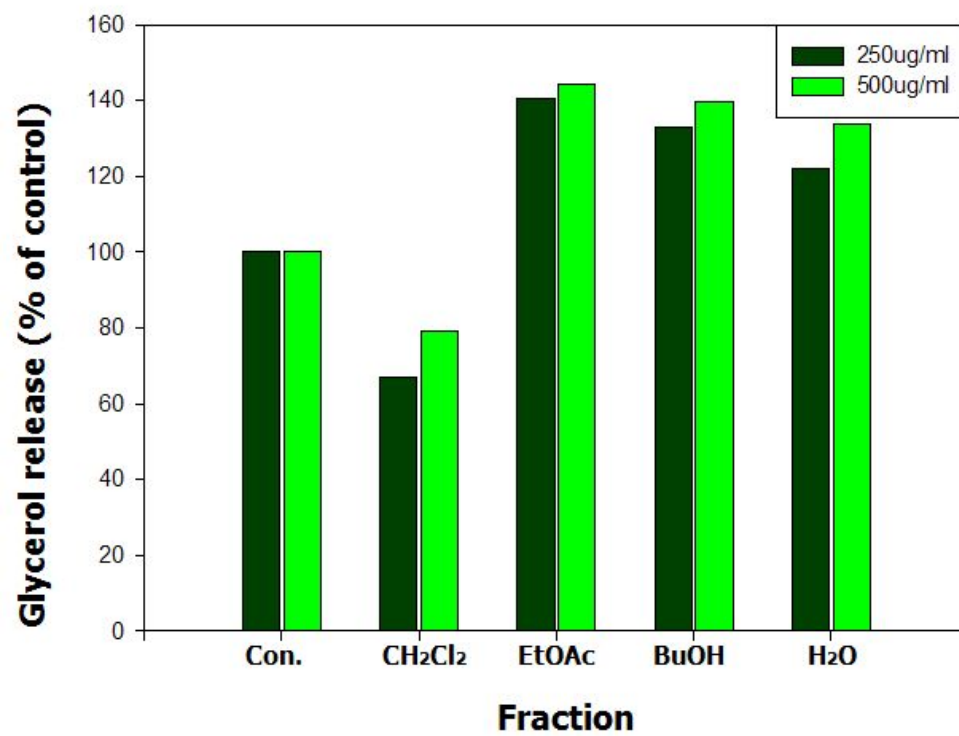
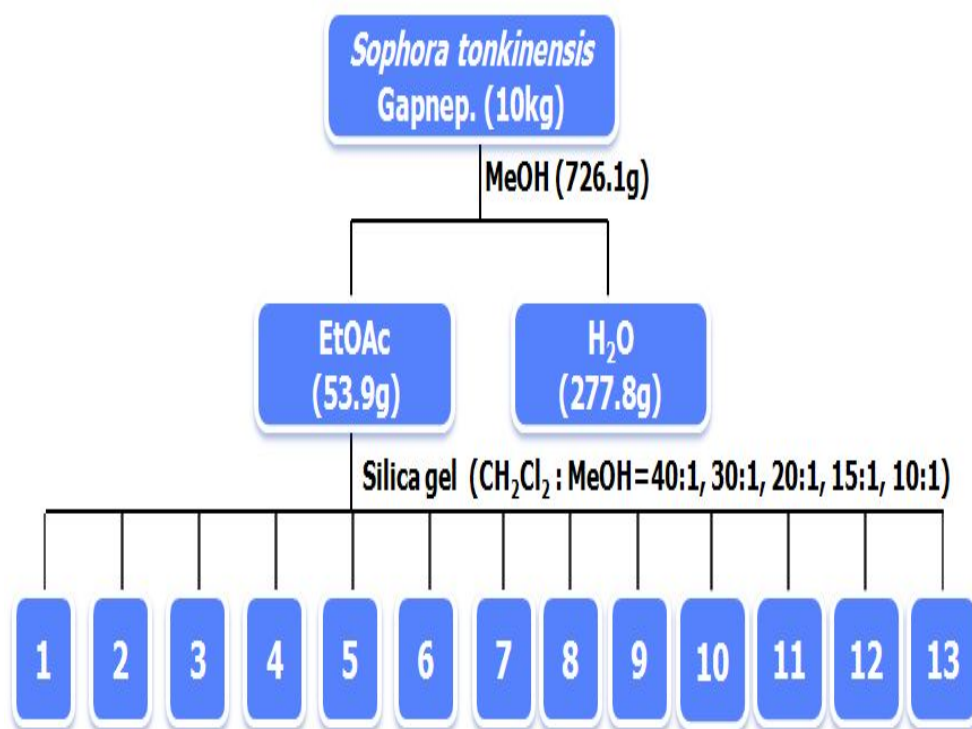


Fig. 19. Effect of organic solvent fractions of STGE on the amount of glycerol in 3T3-L1 adipocyte

11. STGE의 ethyl acetate 분획에서 유효 활성 성분 분리

결과 10의 결과를 토대로, 항비만 활성을 나타내는 산두근 ethyl acetate 분획물 53.9 g을 silica gel에 흡착, 용출하여 유효 성분을 분리를 실행하였다. 용출 용매는 chloroform : methanol (10 : 1 ~ 40 : 1)을 이용하여, silica gel column chromatography를 수행하여 13개의 분획(1~13)을 습득하였다 (Scheme 2). 각 분획물의 지방 세포 분화 억제 활성을 확인하기 위해, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 각 분획물을 분화유도제 처리 시 동시에 지방세포에 처리하여 Oil Red O staining으로 triglyceride 함량을 측정하였고, lipolysis 효과를 보기 위하여 100% 분화되어진 3T3-L1 지방세포에 각 분획물을 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하여 48시간 배양한 후 배지에 방출된 glycerol의 양을 GPO-TRINDER kit를 이용하여 측정하였다(Fig. 20). 그 결과 10번째 분획 그룹을 처리한 지방 세포 내 triglyceride 함량이 대조군의 30%로 줄어들었고, glycerol 방출량이 대조군과 비교하여 115%로 증가함을 확인할 수 있었다. 따라서, 10번째 분획 그룹 내에 항비만 활성 성분이 포함되어 있다고 판단하고 현재 유효 활성 성분의 분리, 정제를 시행 중이다.



Scheme 2. Fractionation and purification of STGE by various organic solvents

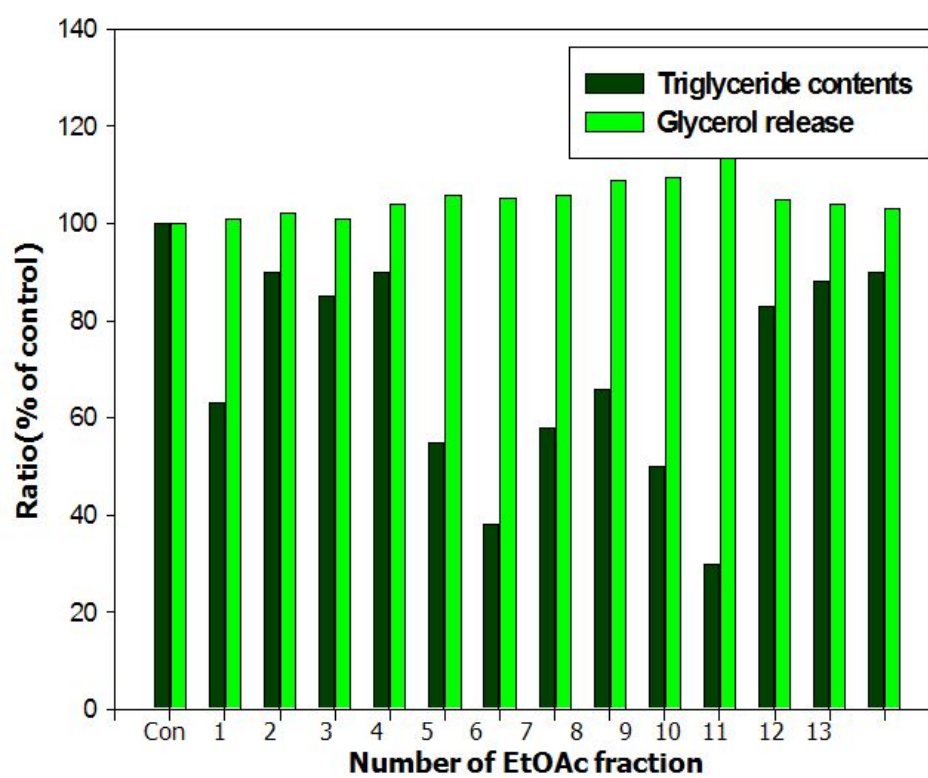


Fig. 20. Effect of EtOAc fraction from STGE on anti-besity activity

IV. 결 론

본 연구는 항비만 활성을 가지는 천연물 유래 성분을 분리하기 위해 여러 가지 천연물 후보 물질을 검토하던 중 STGE에서 지방세포의 분화억제 효과를 확인하였고 그 메커니즘에 대해 검토하였다.

산두근을 메탄올로 추출하여 3T3-L1 지방전구세포에 대한 독성 검토 결과, 48시간의 처리 후에도 생존율이 86.8% 이상으로 높아 독성이 거의 없는 것으로 간주된다(Fig. 10.). 3T3-L1 지방 전구 세포는 미분화 상태를 유지하다가 MDI(insulin, dexamethasone, 1-methyl-3-isobutylxanthine, prostaglandin F2 α 등)의 첨가에 의해 지방세포로 분화하는 것으로 알려져 있다(10-11). 본 연구에서 STGE의 지방전구세포에서 지방세포로 분화될 때 생성되는 지방구형성에 미치는 영향을 관찰한 결과, 3T3-L1 지방전구세포가 지방세포로 분화되는 것을 억제하고 지방구형성을 억제하는 것으로 확인되었다(Fig. 12).

지방전구세포에서 지방세포로의 분화는 C/EBP family와 PPAR γ 를 중심으로 수 백 개의 유전자에 의해 조절되고 각각의 유전자들의 상호작용에 의하여 일어나는 복잡한 과정이다. 분화 초기 hormonal induction에 의해 발현되는 C/EBP β 와 C/EBP δ 는 clonal expansion을 유발할 뿐만 아니라, C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현을 활성화 시키는 역할도 알려져 있다. 또한 C/EBP β 가 제거된 마우스에서 지방세포가 형성되지 않는다는 앞선 연구에 의하면 지방세포의 형성에서 C/EBP β 의 중요성을 확인할 수 있다(29). 본 연구에서 STGE이 지방세포 분화 초기에 발현되는 C/EBP β 의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 검토하였다(Fig. 13A) 그 결과 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 STGE 처리에 의해 C/EBP β 의 발현이 거의 확인되지 않았고, 이것은 clonal expansion의 유발과 그 이후 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현에도 영향을 줄 것이라 사료된다.

또한 지방세포의 분화에 가장 핵심 전사인자인 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현량도 검토하였다. 앞선 여러 연구들에서 C/EBP α 와 PPAR γ 가 지방세포 분화에서 없어서는 안 될 중요한 전사인자라는 것이 보고되었다(20-21). 분화

촉진인자 (MDI) 처리 시 STGE을 동시에 처리한 후 western blot analysis를 시행한 결과 분화촉진인자 만을 처리한 control 세포의 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현량 증가하였다. 이는 C/EBP α 와 PPAR γ 이 발현의 활성화가 일어나 지방세포의 표현형을 결정짓는 대부분의 유전자들을 조절 또는 발현을 활성화 시켰다고 생각되어진다. 하지만 분화촉진인자와 STGE을 동시에 처리한 세포의 PPAR γ 와 C/EBP α 의 발현량은 농도 의존적으로 감소함을 확인 하였다(Fig. 13B). 이는 STGE에 의해 지방세포 분화 초기에 발현되는 C/EBP β 의 발현량이 감소함으로 인하여 PPAR γ 와 C/EBP α 의 발현에도 영향을 주어 발현량이 감소하였다는 가설을 증명하는 것이다. PPAR γ 와 C/EBP α 는 지방세포의 표현형을 결정짓는 대부분의 유전자들을 조절하거나 그 발현을 활성화시켜 지방 세포의 분화를 유도하는데, STGE의 처리 시 PPAR γ 와 C/EBP α 의 발현 감소로 인해 그 하위 단백질의 발현이 저해되어 지방세포 분화가 저해한다고 사료되어 진다. 즉, 위의 결과를 종합해 보면 STGE은, 지방세포의 분화에 핵심적인 역할을 하는 전사 인자들의 발현을 조절하여 지방합성을 저해하는 것으로 생각되어진다.

지방전구세포는 지방세포로 분화 할 때 순서 정연하게 confluence, hormonal induction, mitotic clonal expansion, growth arrest, terminal differentiation의 과정을 거치게 된다(18). 지방전구세포가 confluence 상태 일 때 분화촉진인자(insulin, dexamethasone, 1-methyl-3-isobutylx anthine, prostaglandin F $_{2\alpha}$ 등)를 첨가하면 C/EBP β 가 발현되고 C/EBP β 에 의하여 한 번 혹은 두 번의 세포분열이 일어나게 되는데 이 과정을 mitotic clonal expansion이라고 한다. 이 때 정지되었던 세포주기는 다시 돌아간다. mitotic clonal expansion을 저해하면 지방세포로의 분화가 더 이상 진행이 되지 않는다는 연구결과가 많이 보고되어 있다(23). 본 연구에서도 STGE이 clonal expansion 단계에서 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다. 먼저 3T3-L1 지방전구세포를 confluence 상태로 만든 후 분화촉진인자와 STGE을 동시에 처리하여 0, 24, 48시간에 세포 증식을 확인하였다(Fig. 14.). 그 결과 분화촉진인자만 처리한 세포는 세포 수가 증가하였으나, 분화촉진인자와 STGE을 동시에 처리한 세포는 분화촉진인자만을 처리한 세포의 증식에 비해 확

연하게 저해되었다. 이것으로 STGE는 분화촉진인자의 자극에 의해 일어나는 mitotic clonal expansion 과정을 저해하는 것으로 판단하였다. 이후 본 연구는 STGE이 세포주기에서 어떤 부분을 정지시켜 mitotic clonal expansion을 저해하였는지 알아보기 위해 FACS analysis를 수행하였다(Fig. 15). 그 결과, 분화촉진인자만을 처리한 세포군은 S기 세포군이 증가하였고 이는 분화촉진인자의 자극에 의해 세포주기가 진행되어 mitotic clonal expansion단계로 넘어가는 것으로 생각되어 진다. 반면 분화촉진인자와 STGE을 같이 처리한 세포군은 농도 의존적으로 G1기에 해당하는 세포군의 비율이 늘어나고 반면 S기의 세포군의 비율은 점차 줄어들었다. 그리고 G2/M기의 세포군의 비율을 거의 변화가 없는 것으로 볼 때, STGE은 G1기에 세포주기를 정지시켜 mitotic clonal expansion을 억제하고 보여 진다.

이 결과를 뒷받침하기 위해 본 연구는 G1 arrest 관련 단백질의 발현 양상에 대하여 알아보았다. 세포 주기의 G1기에서 Cyclin E는 Cdk2와 complex를 이루고 cyclin E/Cdk2 complex에 의해 pRb가 인산화되어 S기의 개시가 이루어진다. 따라서 cyclin E/Cdk2 complex는 G1기에서 S기로의 전이에 중요한 역할을 담당하고 있다(30). 한편 Cdk는 다양한 세포증식 억제 신호에 의해 유도되는 Cdk inhibitor에 의하여 그 활성이 억제되어지는데, 대표적인 Cdk inhibitor는 CIP/KIP family에 속하는 p21 및 p27이다. 이 단백질들은 cell cycle에서 G1 phase에서 세포증식을 억제하는 중요한 조절인자로 알려져 왔다(31). 본 연구의 결과에서는 STGE이 G1 arrest를 통하여 clonal expansion 억제를 한다고 생각하여 Cyclin E와 Cdk2의 발현 양상을 확인한 결과, Cyclin E의 발현이 조금 감소되었고 Cdk2는 큰 변화를 확인 할 수 없었다(Fig. 15). 그러나 STGE 처리 시 Cdk inhinitor p21의 발현이 농도 의존적으로 증가되었다(Fig. 16). 따라서 p21의 발현 증가가 G1 arrest 유발과 상호 연관성이 있는 것으로 나타났다.

또한 pRb는 G1기에서 S기로의 전이시기에 Cyclin E/Cdk2 complex의 활성화에 의하여 인산화가 일어나며, 이 인산화에 의해 pRb에 결합해 있던 전사 조절인자 E2F가 유리된다(32). 유리된 E2F 전사인자는 DNA 합성과 연관된 많은 유전자들의 발현을 촉진시키고 S기 특이적 유전자의 발현을 유발하게

한다. Fig. 16에서의 보이듯이 STGE을 처리 시 pRb의 인산화가 저해되었고, E2F-1의 발현 역시 저해되었다. 이러한 pRb의 인산화 억제제는 cyclin/Cdk complex의 kinase 활성 저하에 따른 것으로 추정되며, 특히 E2F-1 전사인자의 발현 저하로 인하여 S기의 진입 및 DNA 합성에 필요한 주요 유전자들의 전사활성이 억제되었을 것으로 생각된다.

Fig. 16에서 보이듯, STGE이 3T3-L1 세포가 MDI에 의한 자극으로 mitotic clonal expansion 단계로 접어들었을 때 Cdk inhibitor인 p21을 증가시켜 Cyclin/Cdk의 활성을 저해하였고, 이는 Rb의 인산화를 저해시켜 E2F의 발현을 저해하여 S기로 넘어가지 못하고 G1기에서 정지를 시켰다는 결론이 나온다. 즉 STGE은 지방전구세포가 지방세포로 분화하는 과정 중 분화촉진인자에 의한 자극으로 일어나는 mitotic clonal expansion 단계에서 G1 arrest를 일으켜 분화를 억제한다고 사료된다.

또한 lipolysis는 지방전구세포가 완전히 분화된 지방세포 내에 축적되어진 triglyceride가 분해되는 것으로, triglyceride는 fatty acid와 glycerol로 분해되며 계속적으로 triglyceride가 분해되면 세포 밖으로 방출된다(33). 3T3-L1 세포가 100% 분화가 되어 지방구가 축적되었을 때 STGE을 처리하여 배지로 방출된 glycerol량을 측정하였더니 농도 의존적으로 glycerol량이 증가하였다(Fig. 17). STGE이 완전히 분화된 3T3-L1 세포를 자극하여 축적되어진 triglyceride를 분해하여 세포 밖으로 방출시켰다고 생각되어진다.

이상의 결과에서 우리는 STGE이 지방전구세포가 분화 될 때 발현되는 특이적인 표적 단백질의 발현을 억제하였고, 또한 지방세포 분화 프로그램 중 mitotic clonal expansion을 억제시킴을 확인하였다(Fig. 21.) 또한 lipolysis 효과도 확인하였으나 이것은 추가 연구가 필요하다. 따라서 STGE은 지방세포의 분화 억제 효능과 지방 분해 활성을 동시에 보유하는 효율적인 항비만 천연 소재로의 개발이 가능할 것으로 생각되어진다.

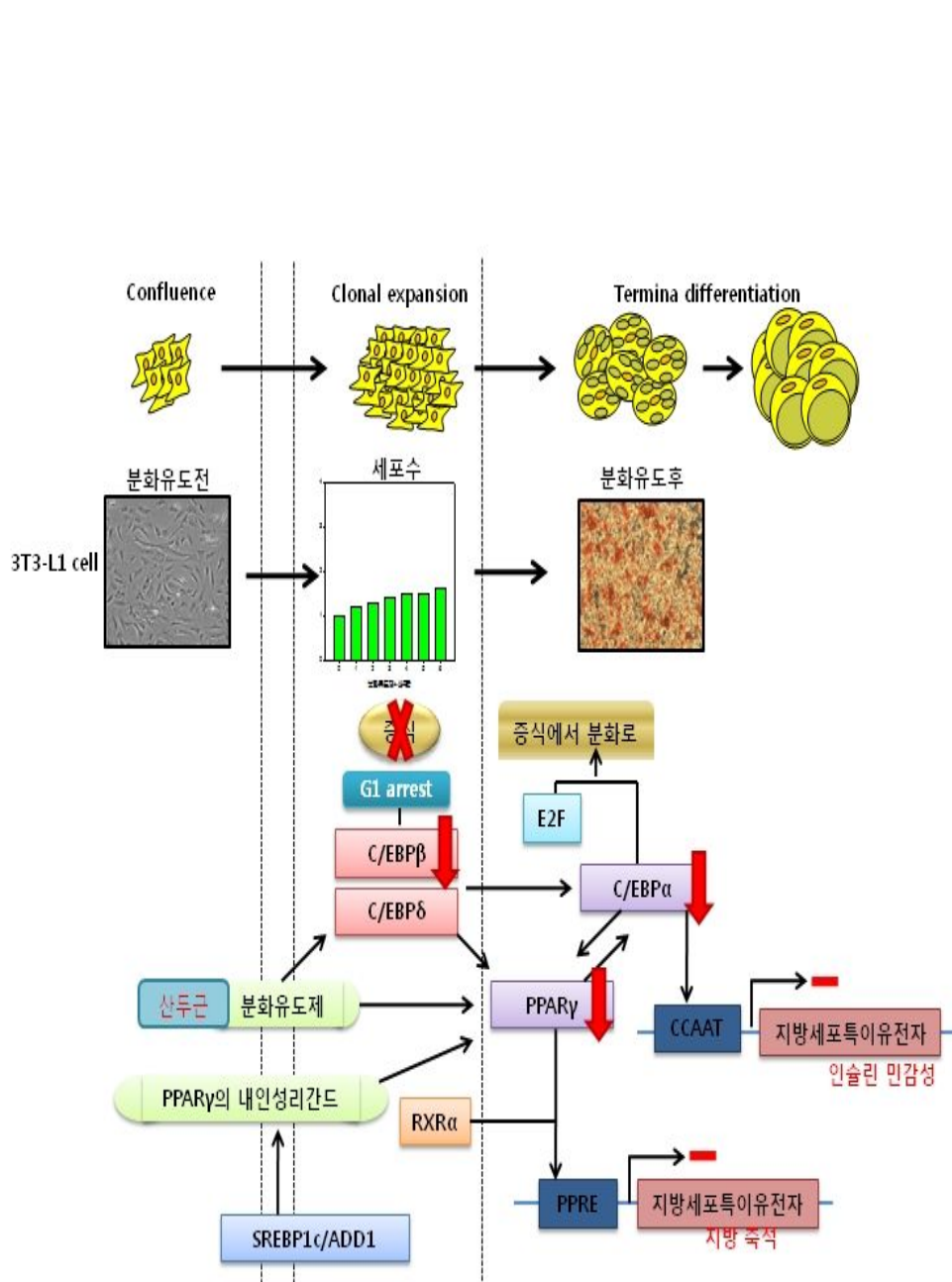


Fig. 21. Proposed anti-obesity mechanism of STGE through association with differentiation inhibition of adipocyte and lipolysis in 3T3 L-1 cells

V. 참 고 문 헌

1. Feng J., Glass TA., Curriero FC., Stewart WF., Schwartz BS. The built environment and obesity: A systematic review of the epidemiologic evidence., *Health & Place.*, 16, pp. 175 - 190(2010).
2. Lowell BB., Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis., *Nature.*, 404, pp. 652-660(2000).
3. Kwon Y. D. The health-related quality of life of obesity., *Journal of Korean Oriental Association for Study of Obesity.*, 4. pp. 125-137(2004).
4. James W. P. T. The epidemiology of obesity : the size of the problem., *J Intern Med.*, 263, pp. 336-352(2008).
5. Must A., Spadano J., Coakley EH., Field AE., Colditz G., Dietz W. The Disease Burden Associated With Overweight and Obesity., *JAMA.*, 282, pp. 1523-1529(1999).
6. Ro Y. M. Metabolic syndrome and cardiovascular disease., *J. of KAHP.*, 2, pp. 72-77(2004).
7. Kopelman PG. Obesity as a medical problem., *Nature.*, 404, pp. 635-643(2000).
8. Korean Intellectual Property Office.(2008).

9. Flier JS., Flier EM. Obesity and the Hypothalamus: Novel Peptides for New Pathways., *Cell*, 92, pp. 437-440(1998).
10. Otto TC., Lane M.D. Adipose Development: From Stem Cell to Adipocyte., *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 40, pp. 229-242(2005).
11. VAN R. L. R., Baylss CE., Roncari D. A. K. Cytological and Enzymological Characterization of Adult Human Adipocyte Precursors in Culture., *The Journal of Clinical Investigation*., 58, pp. 699-704(1976).
12. Gregoire FM., Cynthia MS, Sul H. S. Understanding Adipocyte Differentiation., *Physiol Rev.*, 78, pp. 783-809(1998).
13. Rodriguez AM., Elabd C, Delteil F., Astier J., Vernochet C., Marc PS, Guesnet J., Guezennec A., Amri EZ., Dani C., Ailhaud G. Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue., *Biochemical and Biophysical Research Communications*., 315, pp. 255 - .263(2004).
14. Green H., Kehinde O. Sublines of Mouse 3T3 Cells That Accumulate Lipid., *Cell*., 1, pp. 113-116(1974).
15. Green H., Meuth M. An Established Pre-Adipose Cell Line and its Differentiation in Culture., *Cell*., 3, pp. 127-133(1974).
16. Green H., Kehinde O. An Established Pre-Adipose Cell Line and its

- Differentiation in Culture II. Factors Affecting the Adipose Conversion., *Cell.*, 5, pp. 19-27(1975).
17. Green H., Kehinde O. Spontaneous Heritable Changes Leading to Increased Adipose Conversion in 3T3 Cells., *Cell.*, 7, pp. 105-113(1976).
 18. Fajas L., Fruchart JC., Auwerx J. Transcriptional control of adipogenesis., *Current Opinion in Cell Biology.*, 10, pp. 165-173(1998).
 19. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation., *Cell Metabolism.*, 4, pp. 263-273(2006).
 20. Lane M.D., Tang Q. Q., Jiang M. S. Role of the CCAAT Enhancer Binding Proteins (C/EBPs) in Adipocyte Differentiation., *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, 266, pp. 677-683(1999).
 21. Spiegelman BM., Hu E., Kim J. B., Brun R. PPAR γ and the control of adipogenesis., *Biochimie.*, 79, pp. 111-112(1997).
 22. Morrison RF., Farmer S. R. Role of PPAR γ in Regulation of a Cascade Expression of Cyclin-dependent Kinase Inhibitors, p18(INK4c) and p21(Waf1/Cip1), during Adipogenesis., *The Journal of Biological Chemistry.*, 274, pp. 17088-17097(1999).
 23. Tang Q. Q., Otto TC., Lane M. D. Mitotic clonal expansion : A synchronous process required for adipogenesis., *PNAS.*, 100, pp. 44-49(2003).
 24. Bae J. H. Antimicrobial Effect of *Indigofera krilowii* Extracts on

- Food-borne Pathogens., *J Korean Soc Food Sci Nutr.*, 33, pp. 1106-1111(2004).
25. Pae H. O., Lim C. K., Jang S. I., Han D. M., Gun A. W., Yoon S. Y., Chon B. H., Kim W. S., Yun Y. G. Review of Anti-Leukemia Effects from Medicinal Plants., *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.*, 17, pp. 605-610(2003).
26. Bae J. H. Antimicrobial Effect of Indigofera kirilowii Extracts on Food-borne Pathogens. *J Korean Soc Food Sci Nutr.*, 33, 1106-1111(2004).
27. Kim K., T. Eom S. H., Chi G. Y. Antiproliferative Effect of RST Associated with the Inhibition of Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin E2 Release in Human Lung Carcinoma Cells., *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.*, 21, pp. 907-915(2004).
28. Wang S., Soni K. G., Semache M., Caxavant M., Pan L., Mitchell G. A. Lipolysis and the integrated physiology of lipid energy metabolism., *Molecular Genetics and Metabolism.*, 95, 117-126(2008).
29. Tanaka. T., Yoshida N., Kishimoto T., Akira S. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBP β and/or C/EBP δ gene., *The EMBO Journal.*, 16, pp.7432-7443(1997).
30. Rinignac LA., Libovitch Mp., Kitzmann M., Fernandez A., Ducommun B. Cyclin E-Cdk2 Phosphorylation Promotes Late G1-Phase Degradation of MyoD in Muscle Cells. *Experimental cell research.*, 259, pp. 300-307(2000).

31. Sherr CJ., Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases., *Genes Dev.*, 9, pp. 1149–1163(1995).
32. Sherr C. J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.*, 60, 3689–3695(2000).
33. Holm C., Molecular mechanisms regulation hormone sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans.*, 31, pp. 1120–1124(2003).

Anti-obesity Effects of *Sophora tonkinensis* Gapnep. in 3T3-L1 Adipocyte

Hyun-Yong Jeong

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

Abstract

Obesity is a disease requiring treatment, because it may be the cause of the various chronic diseases and adult diseases such as diabetes, hypertension, heart disease, cancer and joint diseases, as well as the direct cause of death. Obese population in world is growing exponentially, its severity has been escalating. So, development of obesity drugs derived from natural products without the side effects is needed. It has been reported *Sophora tonkinensis* Gapnep. has anticancer and anti-inflammatory effect. But the study of anti-obesity effect of *Sophora tonkinensis* Gapnep. has not been reported yet. In this study, the results showed that the extracts of *Sophora tonkinensis* Gapnep. reduces the accumulation of triglyceride in preadipocyte and inhibits the expression of peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)- γ and CCAAT / enhancer binding protein (C / EBP) family which is adipocyte-specific markers. In addition, it inhibited clonal expansion which is early stage of differentiation of preadipocytes to adipocytes and induced arrest of the

cell cycle in G1 phase. We investigated the alteration of G1 phase arrest-related proteins. As a results, the expression of p21 proteins was significantly increased, while the expression of cyclin E, Cdk2, E2F-1 and phospho-Rb was reduced in a concentration-dependent manner. This results indicate that the extract of *Sophora tonkinensis* Gapnep. is materials of anti-obesity inhibiting the differentiation of adipocytes through the inhibition of expression of adipogenic transcription factor and their specific genes, and inhibition of mitotic clonal expansion in early stage of differentiation of adipocyte, as well as having effects of lipolysis. Therefore, the extract of *Sophora tonkinensis* Gapnep. could be developed as an effective anti-obesity materials.

감사의 글

드디어 석사 졸업논문이 마무리가 되네요. 이렇게 감사의 글을 적으니깐 ‘정말 끝이 났구나...’ 라고 생각이 듭니다. 학부 2학년부터 실험실 처음 들어와 석사 2년까지 벌써 햇수로 6년이라는 긴 시간 동안 정신없이 생활을 한 거 같습니다. 군대를 전역하고 복학을 하고 제가 무엇을 하며 살아가야 하는지 많은 고민을 하고 있을 때, 실험실에 들어와서 같이 연구하자는 유나에 말에 일단 들어가고 생각하자는 그런 마음에 들어오게 되었습니다. 실험의 기초부터 하나하나 배우면서 이 생활이 점점 좋아지게 되었고 제 전직이라는 생각과 함께 이제 이 분야에서 최고가 되고자하는 꿈이 생기게 되었습니다. 그래서 학부를 졸업하고 바로 동의대학교 대학원에 입학하게 되고 이제 그 마침표를 찍게 되니 감회가 새롭네요.

많은 시간동안 저에게는 감사드려야 할 분들이 정말 많습니다. 먼저 저의 지도 교수님이신 김병우 교수님과 권현주 교수님께 정말 감사합니다. 철없던 저를 다그쳐 주시고 사랑으로 보살펴 주신 김병우 교수님과 권현주 교수님. 저에게 있어서 제2의 부모님과 같은 분들입니다. 보잘거 없는 저를 신뢰해 주시고 못할때는 따끔하게 야단도 쳐주시고.... 말로 표현 할 수 없을 정도로 많은 은혜를 입었습니다. 이 은혜를 갚는 것은 제가 졸업을 하고 나서 더 열심히 해서 훌륭한 연구자가 되는 것이라고 생각합니다. 김병우 교수님, 권현주 교수님 오랜 시간 동안 저를 이끌어 주셔서 정말 감사합니다. 졸업해서도 정말 열심히 하겠습니다.

또한 우리 계놈제어학 실험실 식구들. 정말 우리 식구들 정말 감사합니다. 가족들 보다 더 많이 보는 우리 식구들. 실험실 정신적 지주이시고 제가 모르는 것을 물어봐도 짜증한번 안내고 자세히 가르쳐 주신 우리 희정누님, 학부 때 부터 지금까지 같이 있는 상익이, 그리고 민지, 나이는 어려도 항상 마음 깊은 우리 덩이(종현이), 그리고 나의 오른팔이었던 준용이 서울에 가서 열심히 해라. 항상 든든한 후배였던 정환이, 상훈이 정말 고마웠다. 이놈들아. 또 내 밑에 있으면서 항상 고생만 했던 가영이 꿈을 향해 실험실은

나갔지만 그 꿈 꼭 이뤘으면 좋겠고, 항상 자기일에 충실히 하면서 항상 웃음을 잃지 않는 연경이 미영이. 너희에게 축복을 내리노라. 또 우리 혁준이. 복학하면서부터 일도 많이 도와주고 니가 있어서 정말 행복했다. 병석이 철부지라고 생각했는데 이제 어엿한 한 사람의 석사로 정말 수고 많았다. 그리고 중국에서 온 향화 많이 힘들 텐데 힘든 내색 한번 안하고 대견하다 향화야 파이팅이다. 승근이, 태희 정말 열심히 해줘서 고맙다. 현수정 박사님과 유나 정말 고마워. 추출부터 많은 것을 가르쳐 주셨습니다. 그리고 저의 정신적 지주이신 영수행님. 영수 행님에게서 정말 많이 배웠습니다. 감사해요 행님. 아 그리고 우리 20년 지기 친구 태환이 내가 힘들면 말할 수 있는 상대가 너 밖에 없다. 우리 사회에 나가서도 정말 열심히 하자. 마지막으로 선영이. 선영이 니가 있어 오빠 항상 행복해요. 우리 열심히 해서 서로 최고가 되자 선영아.

아 지금의 제가 있기까지 언제나 묵묵히 곁에서 저를 응원해주시고, 저의 버팀목인 부모님. 정말 감사하고 사랑합니다.

미처 제가 여기에 언급하지 못한 고마우신 분들이 너무나 많습니다. 그 분들에게 정말 죄송스럽게 생각하며 저 정현영!! 졸업을 하고 어디에 있어도 꼭 필요한 사람이 되도록 열심히 하겠습니다. 정말 감사합니다.