

博 士 學 位 論 文

차가버섯 (*Inonotus obliquus*)
추출물 β -glucan 이 3T3L1 지방세포
분화에 미치는 영향

高麗大學校 大學院

醫學科

李癸元

2006 年 12 月 日

白世鉉 教授 指導

博 士 學 位 論 文

차가버섯 (*Inonotus obliquus*)
추출물 β -glucan 이 3T3L1 지방세포
분화에 미치는 영향

이 論文을 醫學博士 學位論文으로 提出함

2006 年 12 月 日

高麗大學校 大學院

醫學科

李癸元

李癸元의 醫學博士 學位論文
審査를 完了함.

2006 年 12 月 日

委員長 (印)

委 員 (印)

委 員 (印)

委 員 (印)

委 員 (印)

목 차

Abstract ----- i

I. 서 론 ----- 1

II. 연구 방법 ----- 4

III. 결 과 ----- 8

IV. 고 찰 -----11

V. 요 약 -----24

VI. 참고 문헌 -----

2

5

=ABSTRACT=

Effects of β -glucan from Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) on 3T3L1 adipocyte differentiation

Kye Won Lee, M.D.

Major in Internal Medicine,
Department of Medical Science, Graduate School
Korea University, Seoul, Korea
(Director: Professor Sei Hyun Baik, M.D., Ph.D.)

Background : Obesity is major risk factor for insulin resistance, type 2 diabetes and cardiovascular disease. Inhibition of adipose tissue differentiation represents a major issue to develop a comprehensive strategy to prevent and treat obesity. β -glucan from Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) is plant hemicellulose polysaccharide (soluble fiber) that is recognized as hypocholesterolemic and hypoglycemic compound. The role of β -glucan from *Inonotus obliquus* in

adipocyte differentiation was not evaluated, therefore we examined the effects of β -glucan from *Inonotus obliquus* on adipocyte differentiation in 3T3L1 cells.

Methods : To examine the effect of β -glucan on adipocyte differentiation in 3T3L1 cells, 3T3L1 cells were differentiated in the presence or absence of β -glucan and expression of various adipocyte-specific transcription factors were examined.

Results : β -glucan inhibited adipogenesis in 3T3L1 cells by downregulating several adipocyte-specific transcription factors including peroxisome proliferators-activated receptor- γ , C/EBP- α , which are critical for adipogenesis in vitro. We had also found that adipose fatty acid-binding protein (aP2) and lipoprotein lipase (LPL) that were involved in adipocyte differentiation and adipocyte specific genes, were suppressed by β -glucan.

Conclusion : This study suggests that β -glucan from *Inonotus obliquus* inhibits adipocyte differentiation via downregulation of expression of adipogenic factors in 3T3L1 cells. Our data suggest the potential value of β -glucan from *Inonotus obliquus* as anti-obesity agent.

Key words: β -glucan, *Inonotus obliquus*, adipocyte differentiation

I. 서론

2002년에는 전 세계적으로 당뇨병 환자가 1억 5천 100만 명 정도로 추정되었으나 2010년에는 2억 2천 100만 명으로 2배 정도 증가할 것으로 예상되고 있다¹⁾. 당뇨병은 비만, 고지혈증, 고혈압, 인슐린 저항성을 특징으로 하는 대사 증후군과 연관이 있으며^{2,3)} 많은 연구들이 인슐린 저항성의 주요 원인으로서 지방 세포에 중점을 두기 시작하였다. 여기에는 비만과 제 2형 당뇨병과의 관련 뿐 만 아니라⁴⁾ 고지혈증 조절에서의 지방조직의 역할과⁵⁾ 최근에 발견되기 시작한 내분비 기관으로서의 지방 세포의 역할이 근거가 되었다⁶⁾.

1994년 지방세포에서 렙틴이라는 호르몬이 발견되면서 내분비기관으로서 접근이 시작되었는데, 특히 이 지방세포가 다양한 호르몬, 성장인자, 사이토카인, 지단백 대사 조절인자 등을 분비하기 때문에 새로운 연구 대상이 되기 시작했다. 지방세포는 endocrine, paracrine 및 autocrine 그리고 자율분비계의 신호 전달망을 통해서 복잡한 세포의 기능을 조절하는데 관여하며 또한 뇌하수체, 췌장, 간, 근육, 혈관내피, 면역계와 같은 다양한 조직에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다⁷⁾.

당뇨병 및 인슐린 저항성의 위험 인자인 비만에 대해서 그동안 지방세포 분화 경로와 조절은 많은 연구의 초점이 되었는데^{8,9)} 지방세포 분화의 분자수준에서의 조절은 3T3-L1, 3T3-F442A, Ob 1771 같은 preadipocyte cell line 의 in vitro 실험에서 밝혀진 바 있다¹⁰⁻¹³⁾. 현재에는 많은 pro- and anti-adipogenic transcription factor (전사 요소)들이 adipogenesis 에 영향을 준다고 알려져 있다. 지방세포 분화에 관여하는 여러 전사요소들 중에서 CCAAT-enhancer

binding protein (C/EBP- α , - β and - δ), peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR- γ and - β/δ), helix-loop-helix (HLH) (SREBP-1c) 등이 중요한 역할을 하고 있다. 그 중 C/EBP- α 와 PPAR- γ 가 가장 중요한 전사 조절인자로 알려져 있다¹⁴⁻¹⁸⁾.

항 비만 치료제 개발을 위해 지방 세포 분화 억제제를 확인한 연구로는 retinoic acid¹⁹⁾, 비타민 D²⁰⁾, PTHrP²¹⁾, α -lipoic acid²²⁾ 등이 있었고 최근에는 한약제 중 당뇨병 치료 효과가 있는 berberine²³⁾이라는 물질을 이용한 연구가 있었다. 반면에 지방 분화 억제물질들 중 하나인 human immunodeficiency virus (HIV) 감염 치료제인 protease inhibitors 는 pre-adipocyte 분화와 지방형성 (lipogenesis)을 감소시켜 말초 지방 위축증 (lipoatrophy), 내장 비만증 (visceral adiposity), 인슐린 저항성, 이상지혈증 (dyslipidemia)를 일으키는 효과가 있었다²⁴⁻³⁰⁾.

따라서 과도하게 적은 지방과 과도하게 많은 지방 둘 다 문제가 될 수 있으므로 이 두 가지가 조화를 이루는 적절한 항 비만 치료제의 개발이 필요하다.

β -glucan 은 식물성 헤미셀룰로오스 다당류 (plant hemicellulose polysaccharides, soluble fibers)로서 콜레스테롤 저하 물질로 알려져 사람에게 있어서도 혈청 콜레스테롤을 7.5% 감소시키는 것으로 알려져 있다^{31,32,33)}. β -glucan 은 식후 혈당도 감소시키는 효과가 있으며 이는 이물질의 polymer 가 물과 섞이지 않는 층을 만들어 소장에서의 당 흡수를 감소시키고³⁴⁾ 인슐린 저항성 개선 효과도 일어남이 보고 된 바 있다³⁵⁾. β -glucan 의 이러한 효과는 다량의 성분을 함유하고 있는 귀리 (oats), 보리 (barley), 콩 (beans), 껌 (gums) 과 같은 식품에서 많이 연구되었다³⁶⁻³⁹⁾.

차가버섯 (*Inonotus obliquus*)은 Basidiomycetes 의 소나무비늘버섯과 (Hymenochaetaceae)에 속한 버섯으로 16 세기부터 차가 버섯이라고 불리었다. *Inonotus obliquus* 는 버섯은 독성을 보이지 않고 암과 소화기계 질환에 효과가 있어 민간요법 치료제로 쓰여 지기도 하였다⁴⁰⁾. 최근에는 혈당감소 효과^{41,42)}, 항진균 효과⁴³⁾, 항 바이러스 효과⁴⁴⁾, 간 세포 보호 효과⁴⁵⁾, 항 암 효과⁴⁶⁻⁴⁸⁾, 항산화 및 세포 보호 효과^{49,50)}등이 다양하게 보고 되고 있다.

본 연구에서는 *Inonotus obliquus* 에서 추출한 β -glucan 의 항 비만 효과는 알려진 바 없어 3T3-L1 지방세포를 이용하여 지방세포 분화에 미치는 영향을 분석하고자 하였다.

II. 연구 방법

1. β -glucan 추출

Inonotus obliquus로부터 추출한 β -glucan 은 RNL 202 라는 상품명으로 RNL 생명과학(주)(Seoul, Korea)으로부터 기증받았다. RNL 202 는 55%이상 β -glucan 을 함유하고 있으며 β -glucan 은 미국 식품의약국 (FDA)의 GRAS (General Recognized as safe)로 승인을 얻어 식품첨가물로 널리 사용 중이다.

화학적 특성은 Ph 6.5 ± 0.2 (4mg/ml, water, 25°C), 비중: 1.00 ± 0.10 (25°C), 분자식 ($C_6H_{10}O_5$)_n, 분자량 10,000-100,000 이다.

2. 지방세포 분화 연구

1) 3T3-L1 지방세포 분화 및 β -glucan 처리

3T3-L1 세포 (ATCC, Manassas, VA)를 적당한 밀도 ($2-5 \times 10^5$)으로 폴리스티렌 배양 접시 (polystyrene culture dish)에 심어 10% fetal bovine serum (FBS, HyClone, Logan, USA)을 포함한 Delvecco's modified Eagle's medium (DMEM)배양액에서 배양 (37°C in 5% CO₂)했다. 80%정도의 세포응집을 보였을 때를 day 0 으로 지정하여 연구를 시작하였다. day 2 에 methyl -3-isobutylxanthine (IBMX, 0.5 mM), dexamethasone (DEX, 0.25 μ M), insulin (1 μ g/mL) 을 첨가하여 분화를 유도하였다. day 4 에 IBMX and DEX 은 제거하고 insulin 만 재 첨가하여 배양하고, day 6 에는 분화 유도제 없이 10% FBS 를 포함한 DMEM 배양액만으로 일정기간 배양하여 분화를 유도했다. 대조군은 day 0 부터 9 까지 β -glucan 처리 없이 분화를 유도하였고 β -glucan 처리 한 군은 day 2 부터 1 μ g/mL 의 농도를 유지하여 분화유도 하였다.

2) β -glucan 실험 농도 결정을 위한 세포독성 검사

(1) 세포 생존 측정 (MTT assay)

3T3-L1 세포에 β -glucan 농도를 control 인 0 $\mu\text{g/ml}$ 부터 1, 5, 10, 20, 50 $\mu\text{g/ml}$ 까지 달리하여 처리하였다. 농도별로 처리된 세포는 24 시간 후에 37°C 2% FBS 가 포함된 DMEM 으로 2-3 회 세척한 후 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT stock solution (5mg/ml) 200ul 를 넣고 37°C 에서 2 시간동안 배양한 후 extraction buffer (N, N-Dimethylformamide 50ml, SDS 20g, DW 50ml, pH4.7) 800ul 를 넣고 다시 37 °C 에서 20 시간 배양하였다. autoreader (Spectra Max 360, Molecular Device, Minnesota, USA) 570nm 에서 측정된 흡광도는 대조군과 비교하였다.

(2) DNA 합성 측정 (Cell proliferation test, TdR uptake test)

3T3-L1 세포에 각각 β -glucan 농도 0 $\mu\text{g/ml}$ 부터 1, 5, 10, 20, 50 $\mu\text{g/ml}$ 까지 달리하여 진행하였다. 1uCi [methyl- ^3H] Thymidine deoxyribose (TdR; Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA)을 각각의 well 에 첨가하여 12 시간 배양 후 liquid scintillation counter (Packard Instrument Co., Downers Grove, IL, USA)을 이용하여 1 분 동안 cpm 값을 측정하였다.

(3) 세포 자멸사 분석 (Flow cytometric analysis of apoptosis, cell cycle test)

3T3-L1 세포를 6 well culture plate 에 2×10^6 씩 심는다. 세포가 바닥에 차지하는 면적이 80% 정도 되었을 때 차가버섯 β -glucan 농도를 대조군인 0 $\mu\text{g/ml}$ 부터 1, 5, 10, 20, 50 $\mu\text{g/ml}$ 까지 달리하여 처리했다. 세포를 ice cold phosphate buffered

saline(PBS)로 세척하여 150 μ l PBS 를 첨가 한 후 잘 흔들어 주었다. 그다음 80% EtOH (-20 $^{\circ}$ C stored)을 한 방울씩 떨어뜨리면서 조심스럽게 흔들어 주었다. -20 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 (at least 30min)동안 저장해 두었다. 다음날 1,500rpm/5min 로 원심분리하고 PBS 로 세척한 후 RNase Solution 250ul 을 첨가하고 15 분 동안 실온에 방치 했다. propidium iodide (PI) Solution (50~100 μ g/ml in 1.12% sodium citrate) 250 μ l 를 첨가하고 실온에서 1 시간 또는 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 방치 했다. 1,500/5min 로 원심분리하고 PBS 로 세척한 후 500 μ l PBS 를 넣어 FACS Calibur[®] system (Becton Dickinson, San Jose, CA)으로 분석하였다.

3) 지방세포 전사요소들 (adipogenic transcription factors)과 β -glucan receptor

(Dectin-1) 유전자(gene) 발현 분석

(1) Total RNA 분리 및 cDNA 합성

배양된 지방세포와 20 주된 C57BL/6J mouse (SLC, Japan)의 복강 내 지방을 멸균된 15ml 튜브에 넣은 다음 TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) 1ml 를 넣고 10-20 초간 homogenizer 로 분쇄하고 실온에서 5 분 동안 정치한 다음, 0.2ml chloroform 을 넣고 흔들어 주었다 (vortexing). 그런 다음 실온에서 3 분간 다시 정치한 다음 4 $^{\circ}$ C에서 13,000rpm 으로 15 분 동안 원심분리하고 상층액을 새로운 튜브에 옮겼다. 여기에 동량의 70% ethanol 을 넣고 섞은 후 RNeasy lipid RNA extraction kit (QIAGEN, Hilden, Germany)의 column 에 0.7ml 을 넣었다. 상온에서 13,000rpm 으로 15 초간 원심분리하고 column 에 0.7ml 의 RW1 buffer 를 넣고 상온에서 13,000rpm 으로 15 초간 원심 분리하였다. 다시 column 에 0.5ml 의 RPE buffer 를 넣고 상온에서

13,000rpm 으로 10 초간 원심 분리한 다음 0.5ml 의 RPE buffer 를 넣고 상온에서 13,000rpm 으로 2 분간 원심분리 하였다. Column 을 새 튜브에 옮기고 RNase-free water 를 30-50ul 를 넣고 1 분간 원심분리 하였다. 260nm 에서 흡광도를 측정하여 정량한 다음 cDNA 합성에 이용하였다.

2ug 의 total RNA 를 이용하여 cDNA 를 합성하였으며 First strand synthesis kit (Invitrogen, USA)의 protocol 에 따라 시행하였다.

(2) Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

3T3-L1 지방 세포에서 세포 분화에 영향을 주는 여러 전사 요소 gene 들 (Table 1)과 dectin-1 및 C57BL/6J mouse 의 복강 내 지방세포에서 dectin-1 gene 에 대한 Semi-quantitative RT-PCR 을 시행하였다. 유전자 발현 량은 1.2% agarose gel 에 RT-PCR 산물을 loading 하여 EtBr 로 염색한 다음 NIH image software 를 이용하여 분석하였다. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 house keeping gene 으로 하여 상대적인 발현 량을 환산하였다.

3. 통계 분석

통계분석은 Windows 용 SPSS 11.0 program 을 사용하였으며, semi-quantitative RT-PCR 로 시행한 유전자 실험은 5-7 회 반복 수행한 결과를 통계처리 하였다. One-way ANOVA 와 t-test 를 시행하여 최소 유의성을 검정하였다. 통계적 유의성은 p 값이 0.05 이하인 경우로 하였다.

III. 결 과

1. β -glucan 실험 농도 결정을 위한 세포독성 검사: 3T3-L1 세포의 생존 및 증식에 미치는 영향.

1) 차가 버섯 추출물, β -glucan 이 3T3-L1 세포 생존률에 미치는 영향.

MTT 를 이용한 cell viability 검사 결과 $1\mu\text{g/ml}$ 만이 cell viability 90%이상을 유지하여 세포 생존률에 영향을 미치지 않는 농도로 확인 되었다 (그림 1).

2) 차가 버섯 추출물, β -glucan 이 3T3-L1 세포 증식에 미치는 영향 (proliferation assay, TdR uptake test).

TdR uptake test 를 이용한 세포 증식 검사 결과 β -glucan 은 농도가 증가함에 따라 DNA 합성이 억제되었다 (그림 2).

3) 세포 자멸사 검사 (flow cytometric analysis of apoptosis, cell cycle test).

β -glucan 을 넣지 않은 경우 (대조군, 그림 3, A)는 전체 세포 군집의 9.6%만이 세포자멸 하였고 $1\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 10.79%로 세포자멸이 증가하였으나 그 차이가 크지 않았다. 5, 10, 20, 50 $\mu\text{g/ml}$ (그림 3. C-F)농도에서는 농도가 증가함에 따라 세포 자멸 군락이 증가하였다.

4) β -glucan 실험 농도 결정

3 가지 세포 독성 실험 결과 3T3-L1 세포 분화 실험에 쓰일 β -glucan 의 농도는 세포 자연사에 영향을 가장 적게 미치는 1 $\mu\text{g/ml}$ 로 결정하여 세포 분화 실험을 진행하였다.

2. C57BL/6J mouse 의 복강 내 지방 조직과 3T3-L1 지방세포에서 β -glucan 수용체 (Dectin-1) 유전자 발현.

β -glucan 수용체인 dectin-1 은 20 주된 C57BL/6J mouse 의 복강 내 지방 조직에서 455bp 에 발현되었다 (그림 4,A). β -glucan 처리 하지 않은 대조군 3T3-L1 지방세포에서는 지방세포 분화가 될 수록 dectin-1 의 발현도 증가 하였다. 또한 day 9 에는 β -glucan 1 $\mu\text{g/ml}$ 처리 한 것이 대조군보다 dectin-1 의 발현이 유의하게 증가 하였다 (그림 4,B).

3. β -glucan 의 지방 전사요소들 (adipogenic trascription factors) 발현 억제 효과.

C/EBP- α 와 PPAR- γ 는 지방세포 분화 과정에서 중요한 전사요소이다. β -glucan 1 $\mu\text{g/ml}$ 이 3T3-L1 지방세포 분화에 영향을 미치는지 확인하기 위해 C/EBP- α 와 PPAR- γ mRNA 발현을 day 6 와 day 9 에 β -glucan 0 $\mu\text{g/ml}$ 을 넣고 실험한 대조군과 비교하였다. C/EBP- α 와 PPAR- γ mRNA 발현은 대조군에서는 분화 초기(day 0)에 적게 발현되다가 분화 말기 (day 9)에 증가하였다.

이번 실험에서는 분화 과정 day 6 에는 C/EBP- α (A)와 PPAR- γ (B) 각각 β -glucan 1 μ g/ml 을 넣은 것이 대조군보다 감소하는 경향을 보였고 day 9 에는 통계적인 유의성이 있을 정도로 확연한 감소가 나타났다 (그림 5).

4. β -glucan 이 adipocyte-specific genes (adiponectin, visfatin, LPL, aP2, apelin, RBP-4) 발현에 미치는 효과

지방세포 특이 유전자 (adipocytic-specific gene)들인 adiponectin (A), visfatin (B), LPL (C), aP2 (D) mRNA 는 β -glucan 0 μ g/ml 투여한 대조군에서는 분화 초기(day 0)에는 발현 량이 적다가 분화 말기(day9)에 증가했다. β -glucan 1 μ g/ml 투여된 3T3-L1 지방세포에서 대조군보다 분화 day 9 에 adiponectin (그림 6, A), visfatin (그림 6, B), LPL (그림 6, C), aP2 (그림 6, D) mRNA 발현이 모두 다 유의하게 감소하였다.

지방세포 특이 유전자로 알려진 apelin 은 day 0 에는 발현 량이 적다가 분화되면서 증가하였다. β -glucan 1 μ g/ml 투여하면서 분화시킨 결과 apelin mRNA 발현량이 day 6 과 day 9 모두에서 대조군보다 증가하였다. RBP-4 는 대조군에서는 분화 초기 (day 0)부터 분화 말기(day 9)까지 유의한 변화가 보이지 않았다. β -glucan 을 투여한 경우는 day 6 와 day 9 에서 모두 대조군보다 RBP-4 mRNA 발현 량이 감소하였다 (그림 7).

IV. 고 찰

차가 버섯의 세포벽을 구성하는 β -glucan 은 세포 단계에서 β -glucan 수용체, Dectin-1 을 통해서 효과를 나타낸다. Dectin 은 발견 초기에는 C-type lectin 이라고 불리기도 하였다. Dectin-1 발현은 dendritic cells, 단핵구 (monocytes), 대식세포 (macrophages), 호중구 (neutrophils), T cell 에서 발견되어 immunomodulator 및 항암 (antitumor) 효과의 기전으로 설명되고 있다 ⁵¹⁾. 쥐 조직 중에서 뇌, 근육, 피부를 제외하고는 대부분의 장기에서 발현되고 인간 조직에서도 비슷한 결과가 보고 되고 있다 ^{52,53)}. 하지만 지방 조직에서의 발현에 대해서는 자세히 언급된 바가 없어서 이번 실험에서 3T3-L1 지방세포 (adipocyte)의 dectin-1 발현을 확인하였다. dectin-1 은 C57BL/6J mouse adipose tissue 에서도 발현 되었으며 3T3-L1 지방세포에서는 분화 초기 보다 분화 된 후 더 많이 발현 되는 양상을 보였고 특이하게 분화 9 일째에 β -glucan 처리 군이 control 보다 발현이 증가되었다. 따라서 차가 버섯에서 추출한 β -glucan 이 지방세포에서 dectin-1 발현을 증가시킴을 확인 할 수 있었다.

고지혈증 감소 효과 ⁵⁴⁾와 혈당 강하 ^{41,42)}에 대한 차가 버섯 연구는 이미 여러 문헌에서 보고 되었으나 차가 버섯에서 추출 한 β -glucan 의 효과는 많이 알려진 바는 없다. 그 중에서도 지방 세포 분화와 비만에 대한 효과는 거의 알려지지 않았다. 이번 연구의 목적은 차가 버섯에서 추출한 β -glucan 이 3T3-L1 지방세포 분화 및 지방세포 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

C/EBP- α 와 PPAR- γ 는 많은 지방세포 기능성 단백질을 합성하는데 반드시 필요하기 때문에 지방형성 (adipogenesis)의 중요한 전사조절인자들이다. 따라서 이

전의 연구자들은 calcineurin 나 Kruppel-like factor KLF2 같은 물질에 의한 지방분화 억제에 C/EBP- α 나 PPAR- γ 를 중심으로 연구하였다^{55,56)}. C/EBP- α 와 PPAR- γ 는 functional lipogenic adipocyte 를 구성하는 metabolic gene 인 LPL⁵⁷⁾과 aP2⁵⁸⁾ 발현을 자극하는데 C/EBP- α 와 PPAR- γ 발현이 감소하면 LPL 과 aP2 발현도 감소한다. 이번 연구에서도 LPL 과 aP2 발현 감소가 확인되었다.

PPAR- γ 는 지방 조직에서 발현되며 지방세포 분화와 지방 축적에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다^{59,60)}. PPAR- γ 유도체인 Thiazolinediones (TZDs)는 당뇨병 치료에 쓰이는 인슐린 민감제 (insulin sensitizers)로 혈당과 고지혈증을 낮추는 역할을 한다^{61,62)}. 그러나 이 약물은 지방세포에서 유전자 발현을 증가시키고 지방세포 분화를 증가시켜⁶³⁾ 이미 여러 대사 증후군을 갖고 있는 당뇨병 환자에게 체중 증가라는 부작용이 생기도록 한다^{64,65)}. 다른 연구에서는 PPAR- γ 에서 한개의 allele 를 제거하였을 때 쥐 실험에서 고지방 식이로 인한 지방세포 비대 (adipocyte hypertrophy)와 인슐린 저항성으로부터 보호하는 것으로 나타났고⁶⁶⁾ 선택적 (selective) PPAR- γ 억제제가 항 당뇨 및 항 비만 효과를 나타내며⁶⁷⁾ 3T3-L1 비만세포에서 비만세포 분화를 억제하고 혈당 흡수 (glucose uptake)를 자극하기도 하였다⁶⁸⁾. 이는 인슐린 민감도에 있어서 PPAR- γ 의 복잡한 역할을 나타낸다.

이번 연구에서 차가 버섯에서 추출한 β -glucan 1 μ g/ml 를 3T3-L1 지방세포 분화초기부터 투여한 결과 C/EBP- α 와 PPAR- γ mRNA 발현이 대조군보다 감소되어 이 물질이 지방세포 분화를 억제함이 확인되었다.

혈류 내에 존재하는 adiponectin 은 성인의 지방세포 양과 역의 상관관계에 있다고 알려진 지방세포 특이 유전자 (adipocyte specific gene)이다^{69,70)}. 3T3-L1 지방세포를 이용한 세포 레벨 연구에서는 adiponectin 이 transferrin 수용체와

insulin responsive glucose transporter 4(GLUT4)의 세포 구획과는 다른 세포내 소포 (intracellular vesicles)에 존재한다고 추정하였다⁷¹⁾. 1 시간 정도의 짧은 인슐린 처리는 3T3-L1 지방세포에서 adiponectin 분비를 증가시킨다. 그러나 인슐린 자극된 adiponectin 의 분비가 지방세포에서만 나타나는 것인지, 분비 pathway 가 무엇인지는 아직 불명확하다^{71,72)}. 비교적 장시간의 인슐린 처리는(16-24h)은 3T3-L1 지방세포에서 adiponectin 발현이 감소되었으나⁷³⁾ 분리된 인간 지방 조직에서는 증가하였다⁷⁴⁾. 아직 지방세포와 지방조직에서 insulin 처리에 의한 adiponectin 분비는 명확치 않은 상태이다. 지방세포 분화를 자극하는 TZDs 는 3T3-L1 지방세포^{75,76)}와 분리된 인간 지방조직 모두에서 adiponectin 생성을 증가 시킨다^{77,78)}. 이번 연구에서는 지방세포 분화를 억제하는 β -glucan 처리에 의해 adiponectin 발현이 감소하였으므로 지방세포 분화가 억제되면 adiponectin 발현도 억제 된다는 것을 알 수 있었다.

Visfatin 은 최근에 새롭게 발견된 adipokine 으로 복강 내 지방인 내장 지방 (visceral fat)에서 주로 발현하고⁷⁹⁾ 제 2 형 당뇨병 환자에서 증가 한다⁸⁰⁾. 복강 내 지방의 축적은 피하지방 축적보다 인슐린 저항성 및 심혈관 질환의 위험도를 증가 시킨다⁸¹⁾. 3T3-L1 지방세포 분화에서는 insulin 이 분화를 증가시키듯이 visfatin 도 분화를 증가 시킨다⁷⁹⁾. Visfatin 은 전반적인 인슐린 민감도를 증가시키는 내분비 효과도 나타냈으나 복강 내 지방 축적의 증가를 촉진시키는 autocrine/paracrine 의 효과가 생물학 적으로 더 적절하다는 의견이 있다⁸²⁾. 이번 실험에서는 심혈관 질환의 위험성을 높이는 복강 내 지방에서 특이하게 발현되는 visfatin 이 β -glucan 처리에 의해 분화가 억제되면서 감소됨을 확인하였다.

Apelin 은 혈압을 낮추고 강력한 심장 수축제 (potent cardiac inotrope)로도 작용하며 식욕을 낮추고 뇌하수체 호르몬 분비를 조절하는 역할로 알려진 물질이다. 고 인슐린 혈증을 갖는 비만한 사람에서 plasma apelin 농도가 유의하게 상승 되어 있는데 이는 일종의 feedback loop 로 생각된다. 이는 다른 용어로 “adipo-insular axis”라고도 하는데 인슐린이 apelin 분비를 증가시키고 증가된 apelin 은 인슐린 생성과 분비를 억제하는 것을 의미한다. 이러한 되먹임 고리 (feedback loop)가 파괴되는 일종의 “apelin resistance”상태는 제 2 형 당뇨병환자에서의 고인슐린 혈증과 apelin 상승에 관여 한다 ^{83,84)}. 최근 연구에서는 3T3-L1 지방세포에서 분화 초기에는 apelin mRNA 발현이 적게 분비 되다가 분화 말기로 갈수록 증가하는 양상을 보인다. 인슐린 자극에 의해 apelin mRNA 발현이 증가하고 글루코코르티코이드 (glucocorticoid)에 의해 감소한다고 보고 되었다. 이번 연구에서 β -glucan 처리군이 대조군보다 apelin mRNA 발현이 유의하게 증가하여 위에서 언급한 adiponectin 과 visfatin 과는 반대되는 양상을 보이고 있어 apelin 에 대해서는 insulin-mimetic 효과를 보이고 있다. 이 기전에 대해서는 앞으로 연구가 필요하다 할 수 있다.

RBP-4 는 retinol (vitamin A)에 대한 유일한 특이 전사 단백질로 ^{85,86)} 인슐린 저항성 쥐 모델에서 GLUT4 가 고갈된 지방세포로부터 분비된다고 최근에 밝혀졌다. 인슐린 저항성 상태에서는 중요한 인슐린 자극된 혈당 전달체 GLUT4 의 발현이 지방세포에서 감소하고 골격근 (skeletal muscle)에서는 감소하지 않는다. 이러한 GLUT4 의 감소는 혈당 내당능 장애가 오기 전에 선행한다고 알려져 있다. 그러나 지방세포에서 GLUT4 발현이 감소하는 기전은 아직 확실치 않다 ⁸⁷⁾. 유전적으로 지방세포에서 GLUT-4 만 knockout 시킨 생쥐에서 RBP4 혈청 수치가 증가하였고 ⁸⁸⁾,

RBP4 를 주입한 생쥐에서 근육의 인슐린 signaling 이 저하되었다⁸⁹⁾. RBP-4 는 제 2 형 당뇨병환자에서 증가되어 있다^{90,91)}. 최근 연구에 따르면 인슐린 저항성 및 심혈관 질환의 위험 요소와 연관된 환자에서 RBP-4 가 증가되어 있다고 보고 되고 있다⁹²⁾. 지방세포 분화과정에서 RBP-4 발현연구는 거의 없었으며, 이번 연구에서 대조군의 경우 분화과정 중에 RBP-4 의 변화는 크게 보이지 않았으나 β -glucan 처리한 경우에는 유의하게 감소하였다.

이번 연구는 β -glucan 이 3T3-L1 지방세포에서 지방세포 분화에 중요한 역할을 하는 전사 요소인 C/EBP- α 및 PPAR- γ 감소를 통해 지방세포 분화를 억제하여 기능성 대사 유전자 (functional metabolic gene)인 aP2 와 LPL 의 감소를 가져오며 또한 지방세포 특이 유전자 (adipocyte specific gene)인 adiponectin 과 visfatin 도 감소시킨다는 것을 알 수 있었다. 그러나 β -glucan 의 투여는 apelin 의 mRNA 발현을 증가시켰으므로 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다. 차가버섯 추출물 β -glucan 의 비만 치료제로서의 가능성을 기대할 수 있으리라 생각된다.

Table 1. Genes subjected to semiquantitative RT-PCR analysis of differential expression in β -glucan from *Inonotus obliquus*-treated 3T3-L1 preadipocytes and/or adipocytes

Encoded Protein	Gene Bank	Primer sequences
C/EBP- α	M62362	Sense 5'-ACCACCATGCACCTACAG-3' Antisense 5'-TCATTGTCACTGGTCAACTC-3'
PPAR- γ 2	NM_011146	Sense 5'-TGGGTGAACTCTGGGAGAT-3' Antisense 5'-CATAGTGGAAGCCTGATGC-3'
RBP-4	M74527	Sense 5'-AGCAGCTTCCGAGTCAAG-3' Antisense 5'-TCACGAGAAAACACAAAGGA-3'
Apelin	NM_013912	Sense 5'-CTCTGGCTCTCCTTGACTG-3' Antisense 5'-TGCTTAGAAAGGCATGG-3'
Adiponectin	U37222	Sense 5'-GGAGAGAAGGGAGAGAAAGG -3' Antisense 5'-TCCTCCTTGAAGAGGCTCAC-3'
Visfatin	NM_012524	Sense 5'-GGGAAAGACCATGAGAAAGA-3' Antisense 5'-AAGGCCATTGGTTACAACAT-3'
aP2	NM_0244062	Sense 5'-TCTCCAGTGAAAACCTTCGAT-3' Antisense 5'-CTCATGCCCTTTCATAAACT-3'
LPL	NM_008509	Sense 5'-TCATCTCTTCATTGACTCC-3' Antisense 5'-GATCTTCTCGATGACAAAGC-3'
Dectin-1	AY534909	Sense 5'-AGAGGAGAAAGACAGCTTCC-3' Antisense 5'-GTTTGTAGACCTCTGATCCA-3'

C/EBP- α , CCAAT/enhancer binding protein α ; PPAR- γ , peroxisome proliferator γ -activated receptor- γ ; RBP-4, Retinol-binding protein -4; aP2, adipose fatty acid γ -binding protein; LPL, lipoprotein lipase

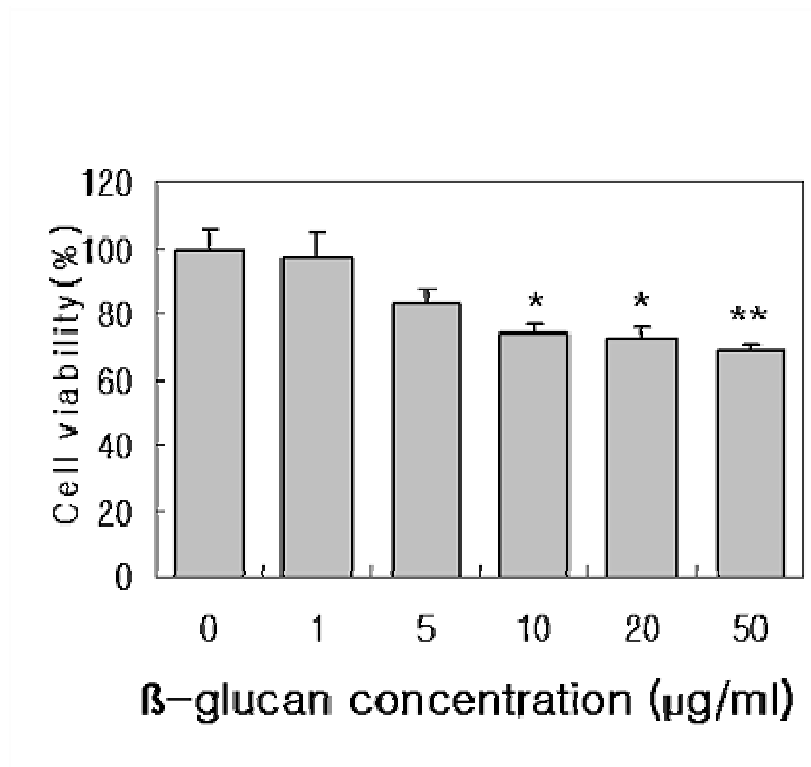


Fig.1 The effect of β -glucan on 3T3-L1 cell viability using the MTT assay.

The results present the mean \pm SD. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. 0 $\mu\text{g/ml}$ of β -glucan.

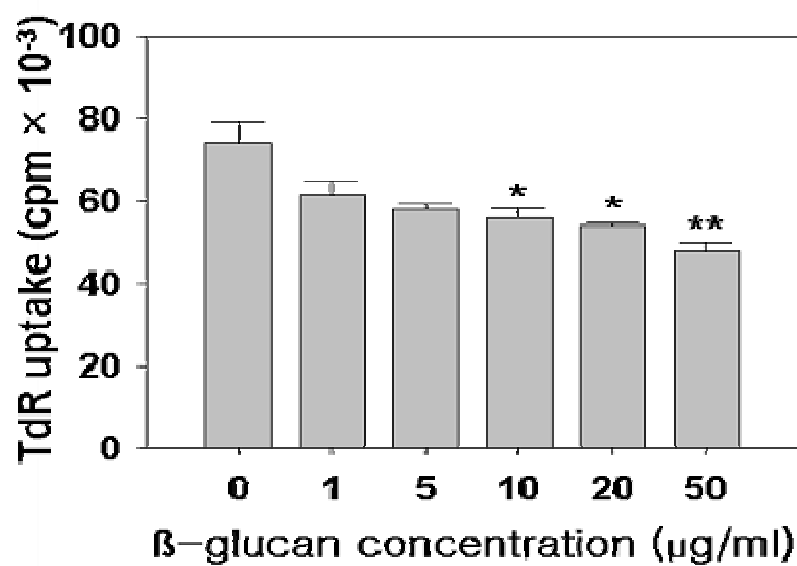


Fig.2 The effect of β -glucan on DNA synthesis in 3T3L1 cells.

The results present the mean \pm SD. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. $0 \mu\text{g/ml}$ of β -glucan.

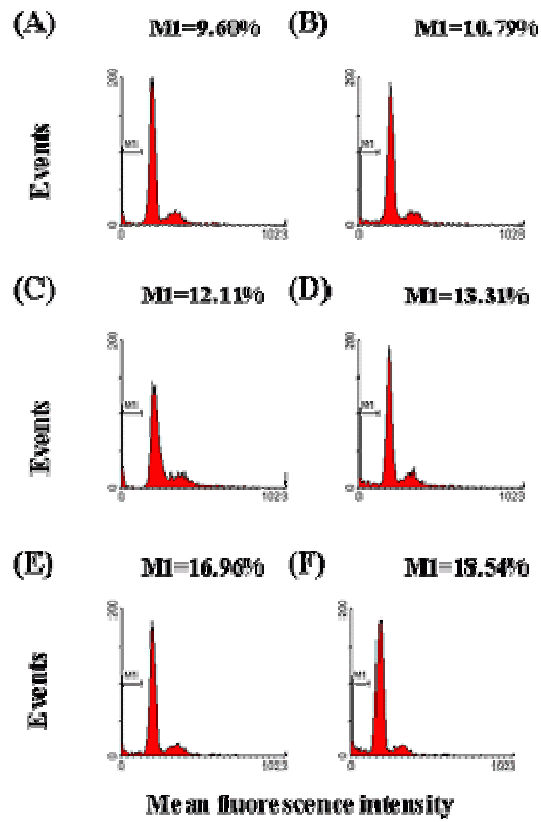


Fig.3 Flow cytometric analysis of 3T3-L1 cells after PI staining. 3T3L1 cells were incubated for 48h in the absence (A) or presence of β -glucan 1 μ g/ml (B), 5 μ g/ml (C), 10 μ g/ml (D), 20 μ g/ml (E), 50 μ g/ml (F). M1 indicates the cell populations defined as apoptotic.

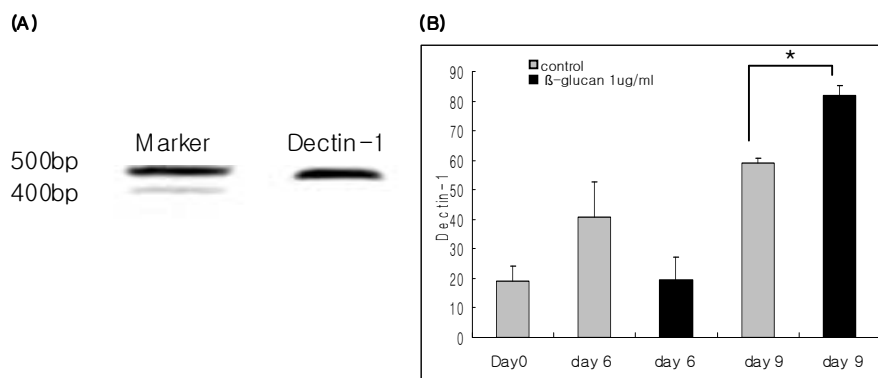


Fig.4 β -glucan receptor (Dectin-1) expression in visceral adipose tissues of C57BL/6J mouse (A) and 3T3-L1 adipocytes (B)

Dectin-1 expression was observed at 455bp. β -glucan receptor was existed in adipose tissues of mouse (A). 3T3L1 cells were treated with β -glucans 1 μ g/ml from day 2 to day 9. Semi-quantitative RT-PCR showed that mRNA levels of dectin-1 at day 9 of differentiation were increased by β -glucan (B). Data are expressed as means \pm SD. * $p < 0.05$ vs. control

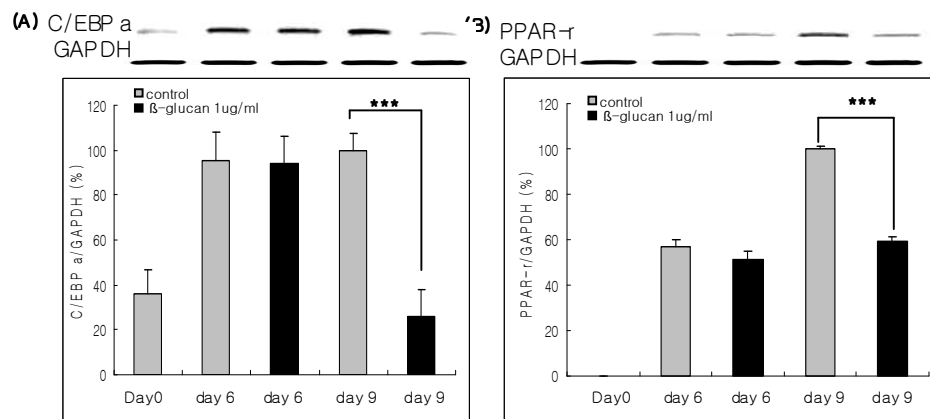


Fig.5 β-glucan inhibits adipogenic transcription factors during 3T3-L1 adipogenesis. 3T3L1 cells were treated with β-glucan 1μg/ml from day 2 to day 9. Semi-quantitative RT-PCR showed that mRNA levels of C/EBP-α(A) and PPAR-γ (B) at day 9 of differentiation were reduced by β-glucan. Data are expressed as means ± SD. *** $p < 0.001$ vs. control

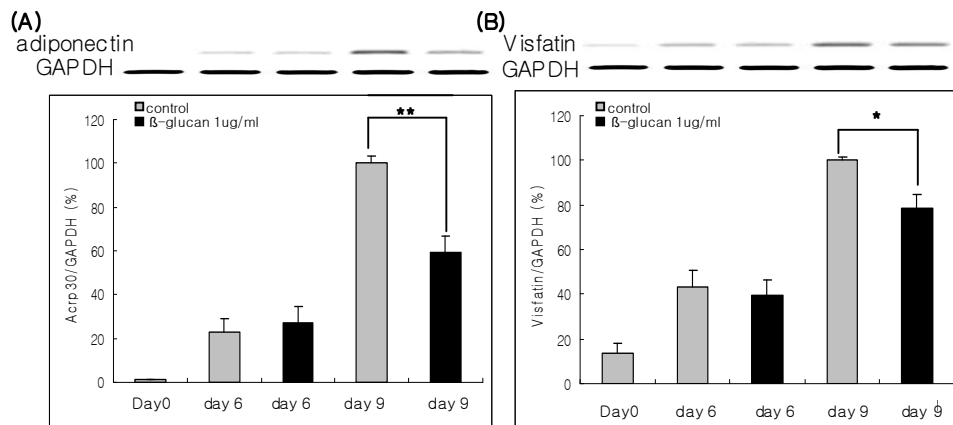


Fig.6 β-glucan inhibits adipocyte-specific genes during 3T3-L1 adipogenesis.

3T3L1 cells were treated with β-glucan 1μg/ml from day 2 to day 9. Semi-quantitative RT-PCR showed that mRNA levels of adiponectin(A), visfatin (B), LPL(C) and aP2(D) at day 9 of differentiation were reduced by β-glucan. Data are expressed as means \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control

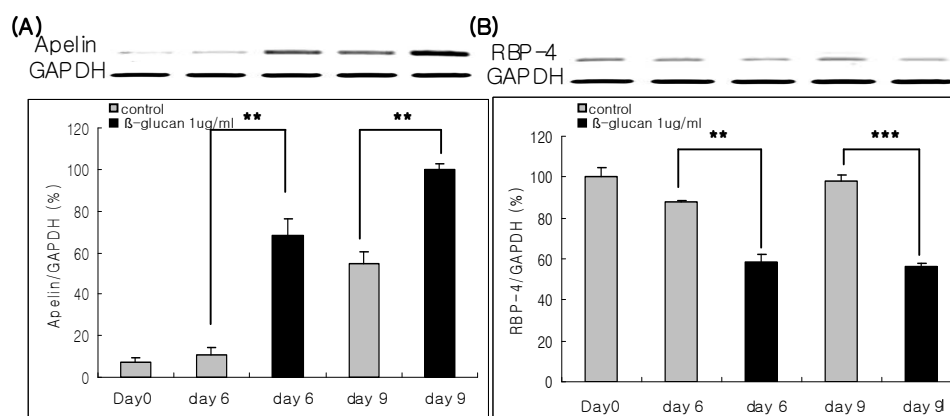


Fig.7 The change of adipocyte-specific genes by β-glucan from Chaga-mushroom during 3T3-L1 adipogenesis.

3T3L1 cells were treated with β-glucan 1 μg/ml from day 2 to day 9. Semi-quantitative RT-PCR showed that mRNA levels of apelin (A) at day 6 and 9 of differentiation were increased by β-glucan. RBP-4 mRNA levels (B) at day 6 and 9 of differentiation were reduced by β-glucan.

Data are expressed as means \pm SD. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control

V. 요약

서론: 비만은 인슐린 저항성, 제 2 형 당뇨병 및 심혈관 질환의 주요 위험 인자이다. 지방세포 분화 억제는 비만 예방과 치료에 대한 포괄적인 방법을 개발하기 위한 주요 연구 목표로 떠오르고 있다. 차가 버섯에서 추출한 β -glucan 은 식물성 헤미셀룰로오스 다당류 (수용성 fiber)로 콜레스테롤과 혈당을 감소시키는 물질로 알려져 있다.

지방세포 분화에 대한 차가 버섯 추출물, β -glucan 의 역할에 대해서는 연구된 바가 없어 3T3L1 세포를 이용하여 지방세포 분화에 미치는 영향을 연구하기로 하였다.

연구방법: 3T3L1 세포에서 지방세포 분화에 미치는 β -glucan 의 영향을 조사하기 위하여, 3T3L1 세포를 β -glucan 처리 및 미처리한 군으로 나누어 분화 시켰고 여러 지방세포 특이 전사 요소들의 발현을 조사하였다.

결과: β -glucan 은 3T3L1 세포에서 adipogenesis 에 중요한 PPAR- γ , C/EBP- α 를 하향 조절하여 지방세포로의 분화를 억제하였다. 또한 지방세포 분화에 관여하는 aP2, LPL 과 지방 세포 특이 유전자들이 β -glucan 에 의해서 억제되었다.

결론: 차가버섯 추출물, β -glucan 이 3T3-L1 세포에서 지방 전사요소들의 발현을 하향 조절하여 지방세포 분화를 억제하였고 비만 치료제로서 가능성을 보여주었다.

VI. 참고 문헌

1. A.F. Amos, D.J. McCarty and P. Zimmet. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabet Med* 1997;14:S1-S85
2. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005; 365: 1415-1428
3. Visscher TL, Seidell JC. The public health impact of obesity. *Annu Rev Public Health* 2001;22:355-75
4. Williams, G. Obesity and type 2 diabetes: a conflict of interests? *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999;23:S2-S4
5. Zeman, F. J. (Ed.), *Clinical Nutrition and Dietetics*, 2nd Edn. MacMillan Publishing Company, New Jersey 1991
6. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz D. *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1997;82:4196-4200
7. P. Trayhurn Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiol Scand* 2005; 184: 285-293
8. Spiegelman BM, Flier JS. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell* 1996;87:377-89
9. P. Trayhurn, Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiol Scand* 2005;184:285-293

10. Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 1975;5:19-27
11. Green H, Kehinde O. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell* 1976;7:105-113
12. Green H, Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 1974;3:127-133
13. Neal JW, Clipstone NA. Calcineurin mediates the calcium-dependent inhibition of adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 2000;277:49776-49781
14. Gregoire FM, Smas CM, Sul H. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 1998;78:783-809
15. Rangwala SM, Lazar M. Transcriptional control of adipogenesis. *Annu Rev Nutr* 2000;20:535-559
16. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P & Spiegelman BM. Transcriptional control of adipogenesis. *Genes Dev* 2000;14:1293-1307
17. Ntambi JM & Young-Cheul K. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 2000;130: 3122S-3126S
18. Holst D, Grimaldi PA. New factors in the regulation of adipocyte differentiation and metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:241-245.
19. T. D. Brandebourg, C. Y. Hu, Regulation of differentiating pig preadipocytes by retinoic acid. *J Anim Sci.* 2005;83:98-107

20. Kong J, Li YC. Molecular mechanism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006 May;290:E916-E924.
21. George K. Chan, Ron A. Deckelbaum, Isabel Bolivar, David Goltzman and Andrew C. Karaplis. PTHrP Inhibits Adipocyte Differentiation by Down-Regulating PPAR γ Activity via a MAPK-Dependent Pathway *Endocrinology.* 2001 Nov;142:4900-4909
22. Cho KJ, Moon HE, Moini H, Packer L, Yoon DY, Chung AS. Alpha-lipoic acid inhibits adipocyte differentiation by regulating pro-adipogenic transcription factors via mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 2003;278:34823-34833
23. Huang C, Zhang Y, Gong Z, Sheng X, Li Z, Zhang W, Qin Y. Berberine inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation through the PPAR gamma pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;348:571-578
24. Leow MKS, Addy CL, Mantzoros CS. Human immunodeficiency virus/highly active antiretroviral therapy-associated metabolic syndrome: clinical presentation, pathophysiology, and therapeutic strategies. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1961-1976
25. Caron M, Auclair M, Sterlingot H et al. Some HIV protease inhibitors alter lamin A/C maturation and stability, SREBP-1 nuclear localization and adipocyte differentiation. *AIDS* 2001;17:2437-2444

26. Dowell P, Flexner C, Kwiterovich PO & Lane MD. Suppression of preadipocyte differentiation and promotion of adipocyte death by HIV protease inhibitors. *J Biol Chem* 2000;275:41325-41332
27. Jain RG, Lenhard JM. Select HIV protease inhibitors alter fat and bone metabolism ex vivo. *J Biol Chem* 2002;277:19247-19250
28. Lenhard JM, Furfine ES, Jain RG et al. HIV protease inhibitors block adipogenesis and increase lipolysis in vitro. *Antiviral Res* 2000;47:121-129
29. Wenworth J, Burris TP & Chatterjee VK. HIV protease inhibitors block human preadipocyte differentiation, but not via the PPAR- γ /RXR heterodimer. *J Endocrinol* 2000;164:R7-R10
30. Zhang B, MacNaul K, Szalkowski D et al. Inhibition of adipocyte differentiation by HIV protease inhibitors. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 4274-4277.
31. Anderson JW, StoryL, Sieling B, Chen WJL, Petro MS & Story J. Hypocholesterolemic effect of oat bran or bean intake for hypercholesterolemic men. *American Journal of Clinical Nutrition* 1984;40:1146-1155
32. Anderson JW, Gustafson NJ. Hypocholesterolemic effects of oat and bean products. *Am J Clin Nutr* 1988;48:749-753
33. Jenkins DJA, Wolever TMS, Rao AV. Effect on blood lipids of very high intakes of fiber in diets low in saturated fat and cholesterol. *N Engl J Med* 1993;329:21-26

34. Wrsch P, Pi-Sunyer FX. The roles of viscous soluble fiber in the metabolic control of diabetes: a review with special emphasis on cereals rich in β -glucan. *Diabetes Care* 1997;20:1774-1780
35. Kay M Behall, Daniel J Scholfield, Judith G Hallfrisch, Helena G M Liljeberg-Elmsthl. Consumption of Both Resistant Starch and β -Glucan Improves Postprandial Plasma Glucose and Insulin in Women. *Diabetes Care* 2006; 29:976-981
36. Newman RK, Lewis SE, Newman CW, Boik RJ, Ramage RT. Hypocholesterolemic effect of barley foods on healthy men. *Nutrition Reports International* 1989;39:749-754
37. Kahlon TS, Chow FI, Knuckles BE, Chiu MM. Cholesterol-lowering effects in hamsters of β -glucan-enriched barley fraction, dehulled whole barley, rice bran, and oat bran and their combinations. *Cereal Chemistry* 1993;70:435-442
38. Davidson MH, Dugan LD, Burns JH, Bova J, Story K, Drennan KB. The hypocholesterolemic effects of β -glucan in oatmeal and oat bran. A dose-controlled study. *JAMA* 1991;266:1079-1080
39. Ranhotra GS, Gelroth JA, Leinen SD, Bhatti RS. Dose response to soluble fiber in barley in lowering blood lipids in hamster. *Plant Foods Hum Nutr* 1998;52:329-336
40. M. Saar, Fungi in Khanty folk medicine, *J Ethnopharmacol* 1991;31: 175-179
41. T. Mizuno, C. Zhuang, K. Abe, H. Okamoto, T. Kiho, S. Ukai, S. Leclerc and L. Meijer. Antitumor and hypoglycemic activities of polysaccharides from the

- sclerotia and mycelia of *Inonotus obliquus* (Pers.:Fr.) Pil (Aphyllorphormycetideae). International Journal of Medical Mushrooms 1999;1:301-316
42. Yang BK, Song CH, Cho KY, Michael A Wilson. Effects of *Inonotus obliquus* Mycelia on the Level of Plasma Glucose and Lipids in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. The Korean Journal of Mycology 2005;33:64-68
43. K. Kahlos. Antifungal activity of cysteine, its effect on C-21 oxygenated lanosterol derivatives and other lipid in *Inonotus obliquus*, in vitro, Applied Microbiology and Biotechnology 1994;3: 339-385
44. T. Ichimura, T. Otake, H. Mori, S. Maruyama. HIV-1 protease inhibition and anti-HIV effect of natural and synthetic water-soluble lignin-like substance, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 1999;63:2202-2204
45. Wasser SP, Weis AL. Therapeutic effects of substances occurring in higher *Basidiomycetes* mushrooms: a modern perspective. Crit Rev Immunol 1999;19(1):65-96
46. K. Kahlos, L. Kangas and R. Hiltunen. Antitumor activity of some compounds and fractions from an *n*-hexane extract of *Inonotus obliquus*, Acta Pharmaceutica Fennica 1987;96:33-40
47. A. Jarosz, M. Skorska, J. Rzymowska, J. Kochmanska-Rdest and E. Malarczyk. Effect of the extracts from fungus *Inonotus obliquus* on catalase level on Hela and nocardia cells. Acta Biochimica Polonica 1990;37:149-151

48. T. Mizuno. The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. *International Journal of Medical Mushrooms* 1999;1:9-29
49. Y. Cui, D.S Kim and K.C. Park. Antioxidant effect of *Inonotus obliquus*. *Journal of Ethnopharmacology* 2005;96:79-85
50. Ulrike Lindequist, Timo H. J. Niedermeyer and Wolf-Dieter Jlich. The Pharmacological Potential of Mushrooms. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005; 2(3):285-299
51. Andrea T. Borchers, Carl L. Keen, M. Eric Gershwin. Mushrooms, Tumors, and Immunity: An update. *Exp Biol Med* 2004;229:393-406
52. Taylor PR, Brown GD, Reid DM, Willment JA, Martinez-Pomares L, Gordon S, Wong SY. The α -glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol* 2002;169:3876-3882
53. Cario E, Brown D, McKee M, Lynch-Devaney K, Gerken G, Podolsky DK. Commensal-associated molecular patterns induce selective toll-like receptor-trafficking from apical membrane to cytoplasmic compartments in polarized intestinal epithelium. *Am J Pathol* 2002;160:165-173
54. Jae-Young Cha, Bang-Sil Jun, Ki-Soo Yoo, Jong-Ryeal Hahm, Young-Su Cho. Fermented Chaga Mushroom(*Inonotus Obliquus*) Effect on hypolipidemia and hepatoprotection in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty(OLETF) Rats. *Food Sci Biotechnol* 2006;15:122-127

55. Neal JW and Clipstone NA. Calcineurin mediates the calcium-dependent inhibition of adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 2002;277:49776-49781
56. Banerjee SS, Feinberg MW, Watanabe M, Gray S, Haspel RL, Denking DJ, Kawahara R, Hauner H, and Jain MK. The Kruppel-like factor KLF2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression and adipogenesis. *J Biol Chem* 2003;278:2581-2584
57. Schoonjans, K, Peinado-Onsurbe, J, Lefebvre, A. M, Heyman, R. A, Briggs, M, Deeb, S, Staels, B, Auwerx, J. *EMBO J* 1996;15:5336-5348
58. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 1994;8:1224-1234
59. Spiegelman BM. PPAR- γ : adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 1998;47:507-514
60. Auwerx J. PPAR γ , the ultimate thrifty gene. *Diabetologia* 1999;42:1033-1049
61. Saltiel AR, Olefsky JM. Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. *Diabetes* 1996;45:1661-1669
62. Kahn CR, Chen L, Cohen SE. Unraveling the mechanism of action of thiazolidinediones. *J Clin Invest* 2000;106:1305-1307
63. Kletzien RF, Clarke SD, Ulrich RG. Enhancement of adipocyte differentiation by an insulin-sensitizing agent. *Mol Pharmacol* 1992;41:393-398

64. Hallakou S, Doare L, Fougère F, Kergoat M, Guerre-Millo M, Berthault MF, Dugail I, Morin J, Auwerx J, Ferre P. Pioglitazone induces *in vivo* adipocyte differentiation in the obese Zucker fa/fa rat. *Diabetes* 1997;46:1393–1399
65. Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA, Rodriguez BR, Kliewer SA, Lehmann JM, Morris DC. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation by thiazolidinediones induces adipogenesis in bone marrow stromal cells. *Mol Pharmacol* 1996;50:1087–1094
66. Kubota N, Terauchi Y, Miki H *et al.* PPAR γ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 1999;4:597–609
67. Jennifer Rieusset, Fethi Touri, Liliane Michalik, Pascal Escher, Béatrice Desvergne, Eric Niesor and Walter Wahli. A New Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Antagonist with Antiobesity and Antidiabetic Activity. *Mol Endocrinol* 2002;16:2628–2644
68. Mukherjee R, Hoener PA, Jow L, Bilakovics J, Klausning K, Mais DE, Faulkner A, Croston GE, Paterniti JR. A selective peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) modulator blocks adipocyte differentiation but stimulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 2000;14:1425–1433
69. Kern PA, Di Gregorio GB, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G. Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor- α expression. *Diabetes* 2003;52:1779–1785
70. Abbasi F, Chu JW, Lamendola C *et al.* Discrimination between obesity insulin resistance relationship with adiponectin. *Diabetes* 2004;53:585–590

71. Bogan JS, Lodish HF. Two compartments for insulin-stimulated exocytosis in 3T3-L1 adipocytes defined by endogenous ACRP30 and GLUT4. *J Cell Biol* 1999; 146:609-620
72. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995;270:26746-26749
73. Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:1084-1089
74. Halleux CM, Takahashi M, Delporte ML *et al.* Secretion of adiponectin and regulation of apM1 gene expression in human visceral adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:1102-1107
75. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T *et al.* PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 2001;50:2094-2099
76. Yamauchi T, Kamon J, Waki H *et al.* The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 2001;7:941-946
77. Phillips SA, Ciaraldi TP, Kong AP *et al.* Modulation of circulating and adipose tissue adiponectin levels by antidiabetic therapy. *Diabetes* 2003;52:667-674
78. Tiikkainen M, Hakkinen A-M, Korshennikova E *et al.* Effects of Rosiglitazone and Metformin on Liver Fat Content, Hepatic Insulin Resistance,

Insulin Clearance, and Gene Expression in Adipose Tissue in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 2004;53:2169–2176

79. A. Fukuhara *et al.* Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 2005;307:426–430

80. MP Chen, FM Chung, DM Chang, JC Tsai, HF Huang and SJ Shin *et al.* Elevated plasma level of visfatin/pre-b cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:295–299

81. F. Giorgino *et al.* Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from *in vivo* and *in vitro* studies. *Acta Physiol Scand* 2005;183:13–30

82. Jaswinder K. Sethi and Antonio Vidal-Puig, Visfatin: the missing link between intra-abdominal obesity and diabetes? *Trends Mol Med* 2005;11:344–347

83. Dennis K. Lee, Susan R. George, Brian F. O'Dowd. Unravelling the roles of the apelin system: prospective therapeutic applications in heart failure and obesity. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:190–194

84. J. Boucher, B. Masri, D. Daviaud, S. Gesta, C. Guigne and A. Mazzucotelli *et al.* Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 2005;146:1764–1771

85. Blaner WS. Retinol-binding protein: the serum transport protein for vitamin A. *Endocr Rev* 1989;10:308–316

86. Newcomer ME, Ong DE. Plasma retinol binding protein: structure and function of the prototypic lipocalin. *Biochim Biophys Acta* 2000;1482:57–64

87. Shepherd PR, Kahn BB. Glucose transporters and insulin action – implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1999;341:248–257
87. Abel ED, Peroni O, Kim JK, et al. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 2001;409:729–733
89. Yang Q, Graham TE, Mody N, *et al.* Serum retinol binding protein contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 2005;436:356–362
90. Basualdo CG, Wein EE, Basu TK. Vitamin A (retinol) status of first nation adults with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Nutr* 1997;16:39–44
91. Abahusain MA, Wright J, Dickerson JW, de Vol EB. Retinol, alpha-tocopherol and carotenoids in diabetes. *Eur J Clin Nutr* 1999;53:630–635
92. Graham TE, Yang Q, Blher am, Hammarstedt A, Ciarald TPi, Henry RR, Wason CJ, Oberbach A, Jansson PA, Smith U, Kahn BB. Retinol-Binding Protein 4 and Insulin Resistance in Lean, Obese, and Diabetic Subjects. *N Engl J Med* 2006;354:2552–2563