

3T3-L1 지방세포 내의 Leptin에 미치는 Polymannuronates의 영향

김인혜 · 남택정*
부경대학교 식품생명공학부

The Effects of Polymannuronates on Leptin in 3T3-L1 Adipocytes

In-Hye KIM and Teak-Jeong NAM*
Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University,
Busan 608-737, Korea

This study evaluated polymannuronates on the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. Polymannuronates increased glucose utilization and reduced the accumulation of triglycerides in the cells. The differentiation showed the same results as Oil red O staining. Also, the polymannuronates inhibited GPDH activity as a result of the restrained adipogenesis promotion process in 3T3-L1 adipocytes. The addition of the differentiation promotion factor to 3T3-L1 promoted the differentiation of adipocytes and increased the expression of the leptin level. However the addition of polymannuronates inhibited differentiation of adipocytes and the leptin secretion level in cells by checking the leptin protein level in the culture media. As well as this, it also inhibited the transcriptional mechanism and leptin mRNA expression. These results suggest that the addition of polymannuronates improves the physiological function of 3T3-L1 cells by reducing the accumulation of triglyceride and GPDH activity, and the repressing expression of leptin at a molecular level.

Key words: Polymannuronates, Leptin, Leptin mRNA, 3T3-L1 adipocytes, Obesity

서 론

미역이나 다시마와 같은 갈조류의 30-40%를 차지하는 알긴산은 해조 다당류의 일종으로 D-mannuronate와 L-guluronate로 이루어진 구조로 혈청 지질개선효과 등의 기능성과 관련하여 많은 연구가 보고되고 있다. 이러한 알긴산은 다른 영양성분의 체내이용률을 저하시키는 반면, 혈청 중의 total cholesterol 및 triglyceride의 함량을 감소시켜 동맥경화 및 고지혈증에 효과적인 뿐만 아니라 피하지방의 축적과 비만을 해소시키는 등의 지질개선효과를 가진다 (Tsuji et al., 1968; Tsuji et al., 1974). 특히, guluronate와 mannuronate를 많이 함유하는 알긴산을 각각 구분하여 흰쥐에 급이시킨 결과 mannuronate가 많이 함유된 알긴산 급이군에서 혈청 및 간장 콜레스테롤의 저하 등 지질대사개선에 효과적인 것으로 보고하였다.

3T3-L1 세포는 mouse fibroblast인 3T3 세포에서 유래된 세포주로서 적절한 조건하에서 배양하면 adipocyte로 분화하는 성질을 가지고 있으며 (Green and Kehinde, 1974a), 분화 시 단백질들의 분비가 촉진되는 등 (Aratani and Kitagawa, 1988), 그 생물학적 특성이 잘 밝혀져 있어 지방세포의 대사과정은 물론 지방축적과 지방세포의 분화과정을 연구하는 모델로 많이 사용되고 있다 (Green and Kehinde, 1974a; Eun et al., 1993). 따라서, 분화 촉진 인자들에 의해 분화된 3T3-L1 세포

는 세포 내 지방이 축적되는 등 지방세포로서의 형태를 나타내게 되며, 지방세포 특유의 유전자 발현 및 지방축적을 유도하는 효소의 활성화가 일어나게 된다 (Ailhaud et al., 1992; Hwang et al., 2000; Kim et al., 2001). 이러한 지방세포에서 분비되는 16 kDa의 leptin 유전자 (Ob gene)와 leptin의 발현은 비만의 생리적 기전을 이해하는데 있어 새로운 가능성을 제시하게 되었다 (Zhang et al., 1994). 혈 중 leptin은 체중 및 체지방 축적과 관련이 있으며 에너지 균형유지를 위한 뇌와 지방조직 사이의 신호전달물질로 알려져 있다 (Halaas et al., 1995; Pellemounter et al., 1995; Sheila et al., 1996; Stephen et al., 1998; Hans et al., 1999; Andrea et al., 2000; Casabiell et al., 2000; Lee et al., 2000). 또한 leptin의 항비만효과 발견은 동물의 지방조직 조절이해에 큰 진전을 가져왔으며 체중과 체조직 구성 성분의 변화와 관련된 여러 가지 임상적 소견을 나타내는 병태를 이해하는데 큰 도움이 되었다.

지방세포에서 leptin과 leptin mRNA 발현은 주로 autocrin과 paracrin의 negative 피드백 신호와 다양한 인자들을 통하여 조절된다. Leptin 수준은 triglyceride 축적과 지방조직의 양과 밀접한 관련이 있으며 (Shannon and Jean-Michel, 2000; Jean, 1998), 지방세포의 leptin 분비를 자극하는 호르몬은 glucocorticoid, β -estradiol, insulin 등이며, leptin 분비를 억제하는 호르몬은 smatostatine, 성장호르몬, catecholamines 등이 있다. 그리고 leptin mRNA의 발현에는 다양한 유전인자와 환경적 인자

*Corresponding author: namtj@pknu.ac.kr

가 관여하나, leptin의 합성과 분비를 조절하는 생화학적·분자적 메카니즘은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다.

본 연구는식이섭유의 한 종류이며, 비만 억제 효과가 있다고 알려져 있는 알긴산을 저분자화 시킨 polymannuronate를 첨가하여 지방세포에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다. 즉, 3T3-L1 지방세포에 polymannuronate를 첨가하였을 때, 지방세포로의 분화를 억제하고 지방구의 축적을 감소시킬 것이라는 가설을 세우고 glucose, triglyceride, GPDH 활성 및 세포 중의 leptin 수준을 살펴보았다.

재료 및 방법

시약 및 재료

본 실험에 사용된 polymannuronate (M.W. 40 kDa)는 (주) KBP (경기도, 평택소재)에서 제공받아 사용하였다. 세포배양에 사용된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), PBS (Phosphate Buffered Saline), penicillin-streptomycin은 Gibco BRL (Gibco BRL, USA) 제품을 사용하였으며, FBS (Fetal Bovine Serum), sodium bicarbonate, trypsin, methylisobutylxanthine, dexamethasone, insulin, Oil red O는 Sigma (Sigma Chemical Co., USA) 제품을 사용하였다. 농도 측정에 사용된 측정용 kit는 신양화학 (신양화학, Korea) 제품을 사용하였으며, leptin RIA kit (Linco Research, Inc., USA)는 Linco 제품을 사용하였다. 세포 중의 total RNA는 Intron (iNtRON Biotechnology, Inc., Korea) 제품인 easy BLUE™ Total RNA Extraction kit로 추출하였다. 전기영동용 agarose는 SeaKem LE agarose (BMA, USA)를 사용하였고, 100 bp DNA ladder는 Bioneer (Bioneer Co., Korea)에서 구입하였다. cDNA 합성에 사용한 oligonucleotide primer는 제노텍에 의뢰, 합성하여 사용하였다. Western blot에 사용한 protein standard marker는 rainbow high molecular marker (Amersham Pharmacia Bioscience, England)를 사용하였고 detection reagent로는 Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution과 Super Signal West Pico Luminol/Enhancer Solution (PIERCE, USA)을 사용하였다. 또, leptin antibody는 Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) 제품을 사용하였다. 세포 배양용 culture dish, 6-well plate, coming tube 및 scraper는 Corning (Corning, USA)과 Falcon (Becton Dickinson Labware, USA) 제품을 사용하였고 그 외 RNA 실험용 시약은 molecular biology용으로 Sigma 제품과 특급시약을 사용하였다.

3T3-L1 세포배양

Mouse의 배아에서 유래한 세포주인 3T3-L1 세포는 ATCC (ATCC, USA)에서 분양받아 사용하였으며, 100 mm dish에 10% FBS를 함유한 DMEM으로 37°C, 5% CO₂가 유지되는 배양기에서 배양하였다. 세포가 confluent되면 trypsin-EDTA로 처리하여 계대배양하였으며 배지는 3일마다 교환하였다. 세포가 80% confluent되면 polymannuronate에 의한 3T3-L1 세포의 분화현상을 관찰하기 위해서 0.5 mM methyliso-

butylxanthine (M), 0.25 μM dexamethasone (D), 10 μg/mL insulin (I)이 함유된 10% FBS-DMEM으로 교환하여 분화를 유도하고 이때부터 2일에 한번씩 10 μg/mL insulin이 포함된 배양액으로 교환하였다. 즉, 3T3-L1 세포가 confluent 되면, 0.5 mM M, 0.25 μM D, 10 μg/mL I로 처리하여 10일간 분화를 유도한 것을 control로 보았다. 농도별에 따른 polymannuronate 처리군은 MDI 처리하고 10일간 분화시킨 후 무혈청배지로 배양액을 교환하였다. 24시간 후 0.5, 0.25, 0.1%의 농도별로 polymannuronate를 처리하여 48시간 더 배양하였다. 실험 종료 후 배양액, cell lysate 및 triglyceride sample을 취하여 실험에 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다.

Glucose 농도 측정 및 triglyceride 농도 측정

실험 종료 후 회수한 배양액은 원심분리 (3,000 rpm, 20 min, 4°C)하여 상층액을 회수하여 GL ZYME "Eiken" kit (신양화학, Korea)를 사용하여 Enzymatic GOD-POD법으로 세포 내 사용된 glucose 소비량을 spectrophotometer (Ultrospec 2000, Amersham Pharmacia Biotech, England)를 이용하여 측정하였다.

Triglyceride 측정은 Green and Kehinde (1974b)의 방법을 이용하였다. Trypsin-EDTA 처리로 세포를 수축시킨 다음 원심분리 (12,000 rpm, 3 min, 4°C)하여 상층액을 제거하였다. Pellet에 methanol:chloroform:H₂O=2:1:0.8의 비율로 만들어진 triglyceride extraction solution으로 세포 내 triglyceride를 추출하였다. Triglyceride의 농도는 TRIGLYZYME-V "Eiken" kit (신양화학, Korea)를 사용하여 spectrophotometer (Ultrospec 2000, Amersham Pharmacia Biotech, England)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

Cell lysate 조제 및 glycerophosphate dehydrogenase (GPDH) 활성 측정

Cell lysate는 배양액을 회수한 다음 PBS-EDTA로 세척한 후 1 μM Pepstatin A, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μM Leupeptin, 0.1 μM Aprotinin의 protein inhibitor가 첨가된 PRO-PREP Protein Extraction Solution (iNtRON, Biotechnology, Inc., Korea)로 scrapping하여 세포단백질 추출물을 취하여 원심분리 (13,000 rpm, 5 min, 4°C) 후 상층액을 회수하여 보관하였다. 회수한 cell lysate를 Buret법으로 세포 내 총 단백질량을 측정하였다. Buret법을 변형한 BIURET 시약 (신양화학, Korea)을 사용하여 흡광도를 측정 후 단백질 함량을 g/dL로 계산하였다.

Polymannuronate를 농도별로 처리한 GPDH 활성 측정은 Wise and Green (1979)의 방법을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 2.5 mM EDTA, 100 mM triethanolamine-HCl buffer, 0.12 mM NADH, 0.1 mM β-mercaptoethanol이 포함된 reaction mixture buffer에 sample을 첨가하고 0.2 mM dehydroxyacetone phosphate인 start buffer를 첨가하여 340 nm에서 흡광도를 측정하여 GPDH의 활성을 산출하였다. 효소 활성 1 unit는 1 μmol NADH/min가 산화되는 정도로 하였다.

Oil red O 염색

세포 내 지방구 생성을 확인하기 위해 Miller et al. (1996)의 방법을 일부 변형하여 Oil red O 염색을 하였다. PBS-EDTA로 세포를 세척하고 10% buffered neutral formalin으로 30분간 고정하고, 다시 70% ethanol로 1회 세척한 다음 Oil red O로 2시간 동안 염색한 후, 마지막으로 PBS로 세척 후 건조하여 광학현미경으로 관찰하였다.

Leptin radioimmunoassay 및 western blot

배양액의 leptin 농도는 ¹²⁵I-labeled LEPTIN RIA KIT (Linco Research, Inc., USA)로 측정하였다. 각 조건별로 회수한 배양액을 100 μ L를 첨가하고 RAT Leptin Antibody를 100 μ L씩 넣은 다음, 잘 혼합하여 실온에서 24시간 반응시켰다. 그 반응액에 ¹²⁵I-Rat Leptin Tracer를 100 μ L 넣은 후, 잘 혼합하여 다시 24시간 반응시켰다. 다시 Precipitating reagent 1 mL씩 첨가하여 잘 혼합한 후 4°C에서 20분간 방치하였다가 원심분리 (3,000 rpm, 30 min, 4°C)하였다. 상층액을 제거한 tube를 gamma counter (Wallac 1470 wizard, Amersham Pharmacia Biotech., England)에서 1분 간격으로 radio activity를 측정하여 ng/mL으로 나타내었다.

Western blot은 3T3-L1 지방세포를 각 조건별로 배양하여 취한 cell lysate를 동일한 농도가 되게 정량한 후 최종농도가 1 X Laemmli sample buffer와 0.1 M DDT가 되도록 희석하여 전기영동 샘플로 사용하였다. 12.5% polyacrylamide gel에 loading하여 분리시킨 단백질을 Immobilon-P membrane (Millipore, USA)으로 옮겼다. 분리된 단백질은 Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (PIERCE, USA)를 이용하여 leptin 단백질 수준을 확인하였다. Leptin에 대한 1차 항체 (Anti-Leptin polyclonal antibodies rabbit IgG)는 5% fat-free milk가 포함된 TBS-T (20 mM Tris-base, 137 mM NaCl, 1 M HCl, 0.1% Tween 20, pH 7.6) 완충용액에 희석하여 사용하였고, peroxidase labelled anti-rabbit antibodies를 희석하여 2차 항체로 사용하였다.

Leptin mRNA 분석

3T3-L1 세포내 leptin mRNA를 정량하기 위해서 RT-PCR법을 사용하였다. 각 조건별로 배양한 3T3-L1 세포의 배양액을 제거한 다음 easy BLUE™ Total RNA Extraction kit (iNtRON Biotechnology, Inc., Korea)를 사용하여 total RNA를 추출하였다. Total RNA는 0.1% diethylpyrocarbonate에 녹인 후, 260 nm/280 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 구하였다. RNA 분석은 QIAGEN one step RT-PCR kit를 사용하였는데, total RNA (5 μ g/ μ L)를 첨가하였다. 이 반응혼합물을 PCR thermal cycler 480 (TAKARA, JAPAN)으로 옮긴 후, 50°C에서 30분, 95°C에서 15분간 reverse transcription 반응시킨 다음 95°C에서 1분, 59°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 30cycle을 반응시켜 증폭시켰다. 이때 사용한 primers는 다음과 같다.

5'-CCCTACAAGACCATTGTCACC-3' (sense)

5'-GCAGCCTGCTCAAAGCCACC-3' (antisense)

통계처리

실험결과는 통계처리에 의하여, 실험 군 당 평균치와 표준편차를 계산하였고, $p < 0.05$ 수준에서 T-test로 각 실험군 간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

세포 내로의 glucose 유입 억제와 triglyceride 축적 억제

3T3-L1 지방세포에 polymannuronate를 농도별로 처리하였을 때, 배양액 중의 glucose 함량을 측정하여, 세포 내로의 유입량을 보고자 하였다. Fig. 1에서의 같이 polymannuronate의 첨가는 배양액 중의 물질들을 세포 내로 이동을 억제하는 것으로 나타났으며, polymannuronate 첨가군의 glucose 이용은 대조군에 비하여 감소하는 것으로 나타났다. Kim and Choi (1992)는 insulin이 세포 내로 유입된 glucose를 이용하여 adipogenesis를 촉진하고 lipolysis를 억제한다고 하였으며, Wendy et al. (1998)도 insulin이 glucose 수송과 leptin 분비에 중요한 인자라고 하였다. 즉, insulin이 지방세포의 glucose 이용률을 증가시켜 leptin 분비를 촉진한다고 증명하였다.

Moustaid et al. (1996)은 사람의 지방조직에서 추출한 지방세포의 배양액 중에 insulin을 첨가하여 세포의 glucose 소비량을 살펴본 결과 insulin에 의해 배양액 중의 glucose 이용이 insulin 처리군에서 매우 증가된 것으로 나타났다. 따라서, 본 연구에서도 glucose 소비량 결과 대조군은 insulin의 첨가로 세포 내로의 glucose 유입이 증가한 반면, polymannuronate군은 glucose의 세포 내 유입이 polymannuronate에 의해 저해되었으며, 농도의존적으로 감소되었다. 이것으로 보아 배양액 중에 첨가한 polymannuronate는 3T3-L1 지방세포의 glucose

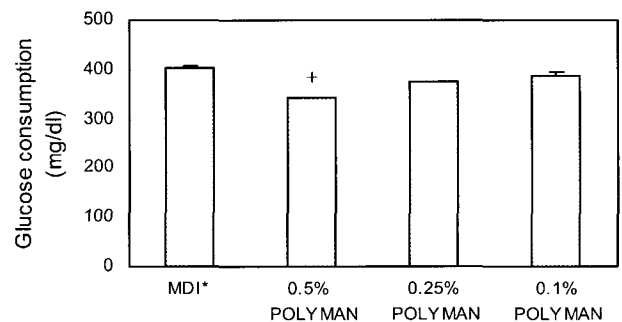


Fig. 1. Glucose consumption of 3T3-L1 adipocytes.

* Codes of 3T3-L1 adipocyte,

MDI: 0.5 mM methylisobutylxanthine,

0.25 μ M dexamethasone,

10 μ g/mL insulin,

0.5% POLYMAN; MDI with 0.5% polymannuronate,

0.25% POLYMAN; MDI with 0.25% polymannuronate,

0.1% POLYMAN; MDI with 0.1% polymannuronate.

⁺Significantly different in *t*-test from MDI ($p < 0.05$).

이용을 억제한다는 것을 확인할 수 있었다.

Fig. 2는 3T3-L1 지방세포에 polymannuronate를 첨가하였을 때, 배양액 중에 첨가한 glucose를 이용하여 triglyceride 합성 과정에 어떠한 영향을 미치는지 세포 내 triglyceride 축적량을 살펴보았다. 그 결과 polymannuronate군의 세포 내 triglyceride 축적량은 대조군에 비하여 감소하는 것으로 나타났다. 이것은 polymannuronate가 세포 내 glucose 유입을 부분적으로 억제하는 것으로 생각된다. 즉, 분화촉진인자의 첨가로 대조군은 glucose를 이용한 adipogenesis가 활발히 진행되고 있음을 알 수 있었으며, 이러한 결과는 Hwang et al. (2000), Schmidt et al., (1990)의 연구결과와 일치하였다.

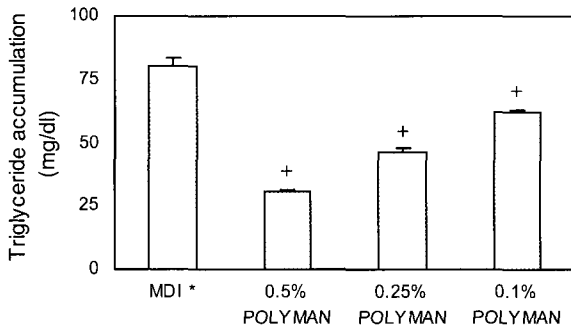


Fig. 2. Triglyceride accumulation of 3T3-L1 adipocytes.
*Refer to the footnote of Fig. 1.
†Significantly different in *t*-test from MDI ($p < 0.05$).

Glycerolphosphate dehydrogenase (GPDH) 활성 억제

전지방세포가 형태학적, 생화학적으로 완벽하게 성숙된 지방세포로 분화되는 과정에는 지방세포 유전자조절부위에 전사활성인자가 활성화되어야 한다. 현재 adipogenesis 과정의 지표들이 많이 밝혀져 있다. 여기에 관여하는 효소에는 acetyl-CoA carboxylase, glycerophosphate dehydrogenase, pyruvate carboxylase 등이 있다 (Kim and Choi, 1992; Moustaid et al., 1996; Jones et al., 1997; Hwang et al., 2000). 즉, 전지방세포가 지방세포로 분화될 때 이 효소들의 활성이 증가 또는 감소한다. 따라서 배양액 내에 첨가한 특정 인자들의 분화 촉진 및 억제 정도를 알기 위하여 이 효소들의 활성을 측정함으로써 그 정도를 확인할 수 있다. 그 중에서도 GPDH는 adipogenesis 과정이 진행되면서 그 활성이 증가하며 Schmidt et al. (1990), Wise and Green (1979), Moustaid et al. (1996)은 3T3-L1 세포가 지방세포로 전환되는 동안 GPDH 활성이 증가한다고 보고하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 GPDH의 활성은 배양액에 첨가한 특정인자들 (M, D, I, polymannuronate)의 adipogenesis 촉진 및 억제 정도를 확인할 수 있었으며, 앞 실험의 glucose 소비 농도와 triglyceride 축적량의 결과와 일치하였을 뿐만 아니라, 앞선 많은 연구 결과 (Schmidt et al., 1990; Moustaid et al., 1996; Hwang et al., 2000)들과 일치하였다.

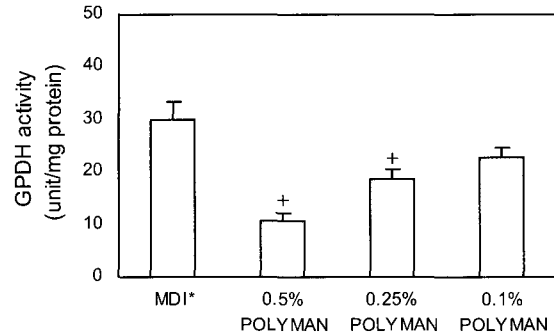


Fig. 3. GPDH activity of 3T3-L1 adipocytes.

*Refer to the footnote of Fig. 1.

†Significantly different in *t*-test from MDI ($p < 0.05$).

Oil red O 염색을 통한 polymannuronate의 지방구 생성 억제

Fig. 4는 polymannuronate의 첨가가 3T3-L1 지방세포의 지방구 생성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 Oil red O로 염색을 한 후 현미경 관찰한 것이다. MDI군은 지방 분화 촉진인자인 MDI를 배양액에 첨가한 대조군으로 세포 내에 무수히 많은 작은 지방구가 생성된 것을 확인할 수 있었다. 또한 농도별로 polymannuronate를 배양액 중에 첨가했을 때 세포의 성장 및 지방구 생성이 농도 의존적으로 감소된 것을 확인할 수 있었다. 이것은 polymannuronate의 첨가로 인하여 배양액 중에 존재하는 물질들이 세포 내로의 유입이 억제됨으로써 일어나는 결과로 추측되어진다. 본 연구에서 3T3-L1 지방세포의 Oil red O 염색 시 분화인자의 투여는 지방세포로의 분화를 촉진시켜 지방구를 많이 생성하였으며, polymannuronate의 첨가는 insulin이 유도하는 지방세포로의 분화를 억제하여 지방구 생성을 크게 감소시키는 것을 형태학적으로 확인할 수 있었다. 이는 앞의 triglyceride 축적과 GPDH 활성의 결과와도 일치하였으며, 이를 한번 더 확인해 주는 결과이다.

Polymannuronate에 의한 leptin 분비와 단백질 억제

Fig. 5는 polymannuronate의 첨가에 따른 3T3-L1 지방세포의 leptin 분비 수준을 배양액을 채취하여 RIA 분석으로 살펴본 것이다. 3T3-L1 지방세포는 분화되면 leptin이 생산되어 세포 중으로 분비되는 것으로 알려져 있다. Flier (1997), Lonnqvist et al. (1997), Ostrund et al. (1996)은 대부분 비만인이 정상인에 비해 leptin 농도가 유의적으로 높다고 하였고, 식이 조성에 따라 변화하는 leptin과 insulin 사이에 나타나는 양의 상관관계를 가진다고 하였다 (Ahern et al., 1997; Hardie et al., 1996). 또, Saladin et al. (1995)은 insulin에 의해 leptin의 형성이나 leptin의 분비가 증가된다고 하였으며, leptin의 분비는 insulin과 dexamethasone에 의해 증가된다고 하였다 (Muller et al., 1997; Fain and Bahouth, 1998). 그 결과 배양액 중의 leptin의 분비는 대조군과 비교하여 polymannuronate를 첨가한 군에서 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났는데, 세포 배양액에 증가된 leptin의 함량은 지방세포에서 합성되어 증가

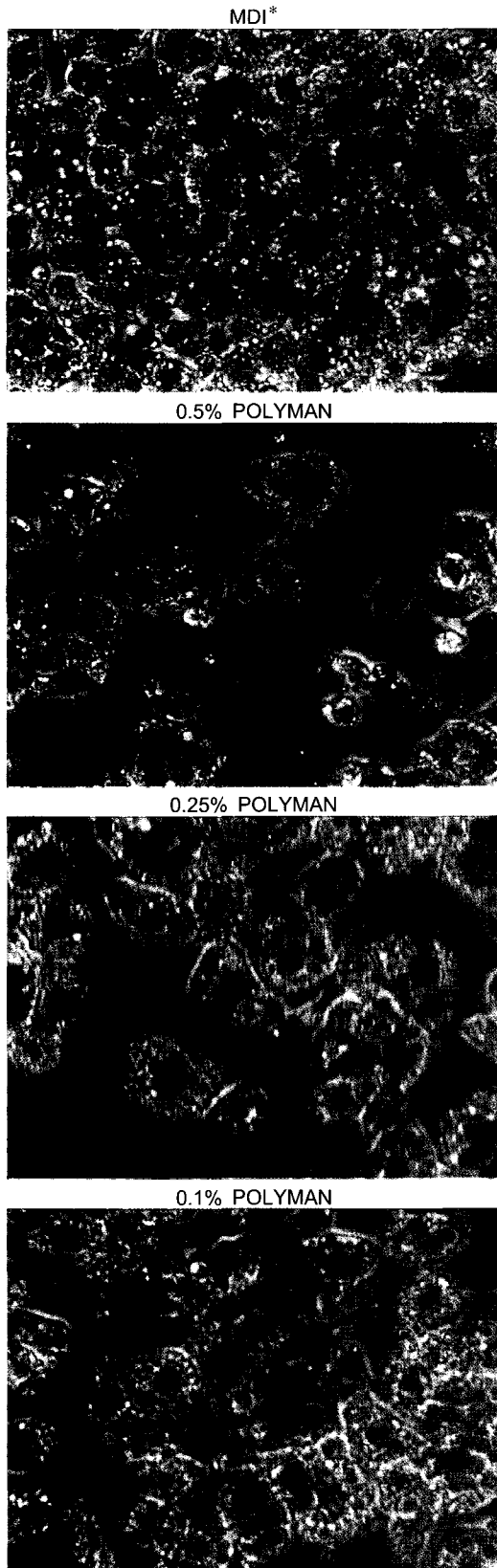


Fig. 4. Oil red O staining of 3T3-L1 adipocytes.
*Refer to the footnote of Fig. 1.

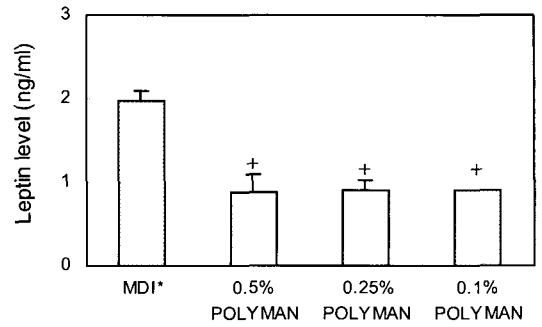


Fig. 5. The level of conditioned media on leptin secretion in the 3T3-L1 adipocytes.

*Refer to the footnote of Fig. 1.

†Significantly different in *t*-test from MDI ($p < 0.05$).

된 leptin의 양적 증가가 일차적인 증가요인이라 추정되며, 이는 앞의 결과와도 일치하였다.

Fig. 6은 polymannuronate의 첨가에 따른 3T3-L1 지방세포의 leptin 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 cell lysate를 회수하여 western blot을 통해 살펴 본 결과이다. Fig. 6에서와 같이 대조군, polymannuronate군 모두에서 leptin이 존재하였으나, polymannuronate군은 대조군보다 낮은 수준을 보였다. Slieker et al. (1996)은 dexamethasone을 포함한 다양한 종류의 스테로이드를 처리한 마우스 지방세포에서 leptin의 발현을 증가시킨다고 하였으며, insulin이 leptin 유전자의 발현을 증가시킨다는 MacDougald et al. (1995), Saladin et al. (1995), Leroy et al. (1996)의 결과와 일치하였다. 즉, 3T3-L1 지방세포에서 분화 촉진인자인 MDI투여는 지방세포로의 분화를 촉진하여 leptin의 발현을 증가시킨 반면, polymannuronate의 투여는 분화를 저해하여 leptin 발현을 억제한 것을 확인할 수 있었다.

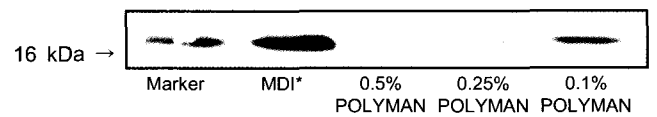


Fig. 6. Western blot for detecting the effects of polymannuronate on leptin protein levels in the 3T3-L1 adipocytes.

*Refer to the footnote of Fig. 1.

Polymannuronate에 의한 leptin mRNA 발현 억제

Fig. 7은 polymannuronate의 첨가에 따른 3T3-L1 지방세포의 leptin mRNA 수준을 세포 내의 total RNA를 추출하여 RT-PCR한 결과이다. 그 결과, leptin mRNA는 앞선 leptin의 발현 및 분비 수준과 동일한 경향으로 나타났다. 이로써 polymannuronate는 leptin mRNA의 전사적 조절 메커니즘에 관여하여 MDI가 유도하는 leptin의 합성과 분비를 억제한다는 것을 알 수 있었다. Richard and Bently (1999)는 흰쥐의 지방세포에서 leptin 발현과 leptin mRNA를 조절할 것으로 추측되는

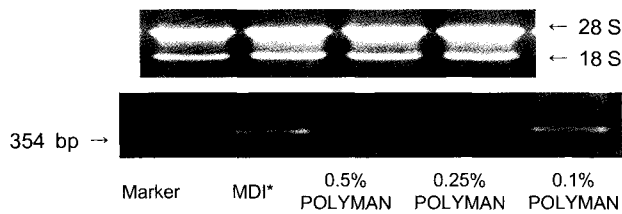


Fig. 7. Gene expression of leptin by the total RNA of 3T3-L1 adipocytes by RT-PCR analysis.

*Refer to the footnote of Fig. 1.

insulin과 dexamethasone 효과를 northern blot과 RIA 방법을 통해 살펴보았다. 그 결과, 100 nmol/L insulin 투여 후 3T3-L1 세포의 leptin mRNA 발현에는 유의적 차이가 없었으나, leptin 분비는 두 배 상승하였다. 또, 100 nmol/L dexamethasone 투여 후 leptin mRNA 발현 수준은 2-4배로 증가하였고, leptin 분비도 2배 상승하였다. 이와 같은 leptin mRNA 발현 수준상의 차이가 전사후 또는 전사상 메커니즘과 관련 있을 것으로 추측되어 전사억제제 및 단백질합성 억제제를 이용하여 실험하였다. 그 결과, 전사억제제인 actinomycine D의 처리는 dexamethasone 투여군의 leptin 분비를 감소시켰지만, insulin 투여군에는 영향을 미치지 않았다. 그리고 단백질 합성억제제인 cycloheximide 처리는 dexamethasone나 insulin투여군의 leptin mRNA 발현에 영향을 미치지 않았고 leptin 분비량은 감소시켰다. 따라서, leptin의 합성과 분비에서 insulin은 전사후 조절 메커니즘과 관련있고 dexamethasone는 전사적 메커니즘을 조절한다고 보고하였다. 그리고 Sharon et al. (1997)도 dexamethasone가 전지방세포에서 지방세포로 분화를 촉진시켜 leptin의 합성과 leptin mRNA 발현을 증가시킨다고 보고하여, 위와 동일한 경향을 보였다.

이상의 결과를 종합하면, polymannuronate는 지방분화를 유도한 3T3-L1 지방세포의 성장과 분화를 저해하고, leptin mRNA 전사 억제를 통하여 leptin 분비를 감소시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

사 사

본 연구는 해양수산개발원(수산특정연구과제, 20000031)의 지원에 의한 것임.

참 고 문 헌

- Ahren, B., S.R.L. Mansson, Gingerich and P.J. Havel. 1997. Regulation of plasma leptin in mice: Influence of age, high, fat diet, and fasting. *Am. J. Physiol.*, 273, R113-R120.
- Ailhaud, G., P. Grimaldi and R. Negrel. 1992. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Ann. Rev. Nutr.*, 12, 207-233.
- Andrea M.I., S. Felice, M. Michele, C. Massimisiano, A. Antonino, M. Costanzo, F. Gaetano, R. Giuseppe and F. Andrea. 2000. Leptin and Aging: Correlation with endocrine changes in male and female healthy adult populations of different body weight. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85, 1954-1962.
- Aratani, Y. and Y. Kitagawa. 1988. Enhanced synthesis and secretion of type IV collagen and entactin during adipose conversion of 3T3-L1 cells and production of unorthodox laminin complex. *J. Biol. Chem.*, 263, 16163-16169.
- Casabiell, X., V. Pineiro, L.F. De la Cruz, O. Gualillo, L. Folgar, C. Dieguez and F. Casanueva. 2000. Dual effect of insulin on in vitro leptin secretion by adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 276, 477-482.
- Eun J.S., J.S. Hong and J.N. So. 1993. Effects of the extracts from hoelen alba, alismatis rhizoma and atracylodes rhizoma on proliferation and differentiation of 3T3-L1 cells. *Kor. J. Pharmacogn.*, 24, 131-139. (in Korean)
- Fain, J.N. and S.W. Bahouth. 1998. Hormonal regulation of 18 S RNA, leptin mRNA, and leptin release in adipocytes from hypothyroid rats. *Metabolism*, 47, 1455-1461.
- Filer, J.S. 1997. Leptin expression and action: new experimental paradigms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 4242-4245.
- Green, H. and O. Kehinde. 1974a. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*, 3, 127-133.
- Green, H. and O. Kehinde. 1974b. Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell*, 1, 113-116.
- Hallas J.L., K.S. Gajiwala, M. Maffei, S.L. Cohen, B.T. Chait, D. Rabinowitz, R.L. Lallion S.K. Burley and J.M. Friedman. 1995. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, 269, 543-546.
- Hans F., M. Hisafumi, B. Ingvar, R. Sten, W. Kerstin and B. Ragnar. 1999. Serum Leptin levels correlate with growth hormone secretion and body fat in children. *Endocrinology*, 84, 3586-3590.
- Hardie, L.J., N. Guilhot and P. Trayhum. 1996. Regulation of leptin production in cultured mature white adipocytes. *Horm. Metab. Res.*, 28, 685-689.
- Hwang, H.J., J.H. Pyeun and T.J. Nam. 2000. The effects of alginate acid on 3T3-L1 cell's differentiation. *J. Kor. Fish Soc.*, 33, 541-545. (in Korean)
- Jean D., F. Jean and A. Johan. 1998. Leptin a pleiotropic

- hormone: physiology, pharmacology, and strategies for discovery of leptin modulators. *J. Med. Chem.*, 41, 5339-5352.
- Jones, B.H., M.K. Standridge and N. Moustaid. 1997. Angiotensin II increase lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology*, 138, 1512-1519.
- Kim, H.S., L. Liang, R.G. Dean, D.B. Hausman, D.L. Hartzell and C.A. Baile. 2001. Inhibition of preadipocyte differentiation by Myostatin treatment in 3T3-L1 cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 281, 902-906.
- Kim, Y.S. and Y.K. Choi. 1992. Adipose tissue and fat cell metabolism. *J. Kor. Soc. Study Obe.*, 1, 48-52. (in Korean)
- Lee, E.O., H.S. Park and H.D. Shin. 2000. Effect of complete fasting on body fatness, serum leptin and lipid profile in women. *Kor. J. Nutr.*, 33, 42-48. (in Korean)
- Leroy, P., S. Dessolin, P. Villageois, B.C. Moon, J.M. Friedman, G. Ailhaud and C. Dani. 1996. Expression of *ob* gene in adipose cells. *J. Biol. Chem.*, 271, 2365-2368.
- Lonnqvist, F., L. Nordfors, M. Jansson, A. Thorne, M. Schalling and P. Arner. 1997. Leptin secretion from adipose tissue in women. *J. Clin. Invest.*, 99, 2398-2404.
- Macdougald O.A., C.S. Hwang, H. Fan and M.D. Lane. 1995. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 9034-9037.
- Miller, C.W., D.A. Casimir and J.M. Ntambi. 1996. The mechanism of inhibition of 3T3-L1 preadipocyte differentiation by prostaglandin F_{2a}. *Endocrinology*, 137, 5641-5650.
- Moustaid, N., B.H. Jones and J.W. Taylor. 1996. Insulin increase lipogenic enzyme activity in human adipocytes in primary culture. *J. Nutr.*, 126, 865-870.
- Muller, G., J. Ertl, M. Gerl and G. Preibisch. 1997. Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 272, 10585-10593.
- Ostrund, R.E., J.W. Yang, S. Klein and R. Gingerich. 1996. Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age and metabolic covariates. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 81, 3903-3913.
- Pelleymounter M.A., M.J. Cullen, M.B. Baker, R. Hecht, D. Winters, T. Boone and F. Collins. 1995. Effect of the obese gene product on body weight regulation in *ob/ob* mice. *Science*, 269, 540-543.
- Richard L.B and C. Bentley. 1999. Regulation of *ob* gene expression and leptin secretion by insulin and dexamethasone in rat Adipocytes. *Diabetes*, 48, 272-278.
- Saladin R., P. De Vos, M. Guerre-Millo, A. Lerurque, J. Girard, B. Staels and J. Auwerx. 1995. Transient increases in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature*, 377, 527-529.
- Schmidt, W., G. Poll-Jordan and G. Loffler. 1990. Adipose conversion of 3T3-L1 cells in a serum-free culture system depends on epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, corticosterone, and cyclic AMP. *J. Biol. Chem.*, 265, 154890-154895.
- Shannon P.R. and W. Jean-Michel. 2000. Leptin: an essential regulator of lipid metabolism. *Comp. Biochem. Phys. part A*, 125, 285-297.
- Sharon E.M., D.R. William, J.H. Laura, H. Nigel, T. Mohammed, R.S. Jonathan and T. Paul. 1997. *Ob* gene expression and secretion of leptin following differentiation of rat preadipocyte to adipocytes in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 230, 360-364.
- Sheila C., M.K. Cynthia, E.P. Ann, G.S. Andrew, A.C. Boris and S.S. Richard. 1996. Role of leptin in fat regulation. *Nature*, 380, 677.
- Sliker, L.J., K.W. Sloop and P.L. 1996. Surface, Regulation of expression of *ob* mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J. Biol. Chem.*, 271, 5301-5304.
- Stephen C.W., J.S. Randy, P. Daniel and W.S. 1998. Michael Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science*, 280, 1378-1383.
- Tsuji, K.S., E. Oshima, A. Matuszaki, S. Nakamura, T. Innami, Tezuka and S. Suzuki. 1968. Effect of polysaccharides on cholesterol metabolism (Part 1) Studies on konnyaku powder, sodium alginate and pectin. *Eiyogaku Zashi*. 26, 113-122. (in Japanese)
- Tsuji, K.Y., E. Horid, S. Tsuji and Suzuki. 1974. Effect of a konjac flour diet on the endogenous cholesterol metabolism in rats. *Eiyogaku Zashi*. 27, 405-411. (in Japanese)
- Wendy, M.M., M.G. Francine, L.S. Kimber, V.M. Charles, M.M. Tooru, H.W. Craig, S.S. Udith and J.H. Peter. 1998. evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes. *Endocrinology*, 139, 551-558.
- Wise, L.S. and H. Green. 1979. Participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate dehydrogenase in the adipose conversion of 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.*, 254, 273-275.

Zhang Y., R. Proence, M. Maffel, M. Barone, L. Leopold and J.M. Friedman. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372, 425-432.

2004년 8월 21일 접수
2004년 10월 26일 수리