

지방세포분화에서 Hibiscus 추출물에 의한 Insulin signaling 억제 효과

김진경 · 송정훈^{1*}

원광대학교 의과대학 전정와우센터, 1:성형외과학교실

Hibiscus Sabdariffa L. Inhibits the Insulin Signaling in Adipogenesis

Jin Kyung Kim, Jeong Hoon Song^{1*}

Vestibulocochlear Research Center & Department of Microbiology,
1: Plastic & Reconstructive Surgery, Wonkwang University School of Medicine

Hibiscus sabdariffa L., a tropical beverage material, is used commonly as in folk medicine against hypertension, pyrexia, inflammation, liver disorders, and obesity. However, the mechanism by which *Hibiscus sabdariffa* L. modulates adipogenic differentiation is remained to be elusive. This report was designed to investigate the inhibitory effect of Hibiscus extract on insulin signaling pathway during adipocyte differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. 3T3-L1 preadipocytes were differentiated with isobutylmethylxanthine, dexamethasone, and insulin (MDI) and followed by the addition of Hibiscus extract. Treatment with Hibiscus resulted in a decrease of lipid droplet accumulation, which was suppressed by PI-3 kinase inhibitor wortmannin in 3T3-L1 preadipocytes. Also, Hibiscus extract markedly attenuated the mRNA expression of adipogenic transcriptional factor PPAR γ and adipogenic hormone Leptin during adipogenesis. However, it did not affect the expression of adiponectin in 3T3-L1 preadipocytes differentiated with MDI mixture. Furthermore, Adipogenic differentiation by MDI mixture increased the phosphorylation and expression of PI3-Kinase and Akt in 3T3 preadipocytes, which was markedly suppressed by Hibiscus extract treatment. Taken together, our results suggest that Hibiscus extract suppressed the adipogenic differentiation of 3T3 preadipocytes through activation of PI3-Kinase and Akt signaling pathway.

Key words : *Hibiscus Sabdariffa* L., Insulin, isobutylmethylxanthine, dexamethasone

서 론

비만은 현대산업사회에서 만연하는 건강에 위협하는 영향을 끼치는 성인병 유발 인자중 하나이며 당뇨병, 고혈압, 암, 당뇨병성 및 동맥경화를 포함한 많은 병리학적 질환과 밀접한 관련이 있다¹⁻⁴. 체중감량은 2형 당뇨병의 위험성이나 혈압 그리고 혈관 내 지질축적을 줄여준다고 보고되었으며⁵, 최근 음료나 차로 마실 수 있으며 체내 지질을 감소시킬 수 있는 천연 대체물이 비만치료제로서 널리 보고되고 있다⁶. Hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.)는 차로 응용되는 전통의학에 유용한 식물의 꽃잎으로 고혈압, 발열, 간질환, 염증, 담석 및 비만에 효과가 있다^{8,9}. Hibiscus 추

출물은 췌장의 amylase를 억제하고 albino rat에서 전체 지질과 콜레스테롤, 그리고 triglyceride의 감소 효과가 보고되었으며^{10,11}, 특히 Hibiscus 물추출물은 고지혈증 예방과 항산화 효과, 그리고 항암효과가 탁월한 것으로 보고되었다^{12,13}. 그러나, 히비스커스 추출물의 세포내 지질감소효과에 대한 분자생물학적 기전에 대한 연구는 미비한 실정이다.

지방세포의 분화 (adipogenesis)는 세포 형태학적 변화, 호르몬 감수성, 다양한 지방세포의 유전자 발현 등과 연관되어 있는 복잡한 과정이다. Confluent 전구지방세포는 호르몬에 의해 clonal expansion, growth arrest를 겪으며, 동시에 지방세포의 지표 단백질들을 발현하고 세포질에 지질을 축적할 수 있는 능력을 가진 지방세포로 분화 된다¹⁴. 지방세포분화를 유도하는 호르몬 혼합물은 glucocorticoid, insulin, 그리고 cAMP를 포함하게 되는데, glucocorticoid와 cAMP는 지방세포 전사인자인 C/EBP

* 교신저자 : 송정훈, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 의과대학

· E-mail : jhsong71@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-1291

· 접수 : 2007/01/22 · 수정 : 2007/01/31 · 채택 : 2007/02/16

β 와 C/EBP δ 의 발현을 유도하고¹⁵⁾, 이 둘은 지방세포분화에서 주요하게 알려진 지방세포분화 특이적 전사인자인 C/EBP α , PPAR γ 의 발현 증가를 유도한다¹⁶⁾. 초기에 이들 전사인자들은 지방세포분화 동안 발현되는 특수 유전자인 aP2, adipisin, adiponectin를 포함한 수많은 지방세포 특이 유전자를 만들어내고, 지방세포가 만들어내는 호르몬인 Leptin을 생성하여 세포 밖으로 분비한다^{17,18)}. 지방세포에 영향을 미치는 여러 호르몬중 insulin은 insulin receptor substrate (IRS)의 phosphorylation을 유도하여 insulin signaling의 하부단계인 PI-3 kinase와 Akt를 활성화시킨다^{19,20)}.

3T3-L1 preadipocyte는 혼합 호르몬에 의해 지방세포 특이 전사인자들과 유전자를 만들어 내는 지방세포로의 분화가 가능하여 지방세포의 연구모델로 주요하게 사용되어 왔다. 본 연구에서도 3T3-L1 preadipocyte를 이용하여 최근 음료와 색소의 역할로 식품에 활용되어지는 히비스커스 추출물이 체내 지질을 줄여준다는 보고에 근거하여 히비스커스 추출물이 지방세포의 분화를 억제하는 분자 생물학적 작용 기전을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 세포주

전구지방세포인 3T3-L1 세포는 American Type Culture Collection (ATCC)로부터 구입하여 계대배양 하였다.

2) 시료

히비스커스는 허보진사 (Seoul, Korea)로부터 구입하였다.

3) 시약 및 기기

실험에 필요한 4.5 g/L glucose가 포함된 Duplecco's modified Eagle's medium (DMEM), 항생제, trypsin 및 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)는 GIBCO BRL사 (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며 배양용기 (24-well plate, 10 cm dish)는 Falcon사 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl, tetrazolium bromide(MTT), Oil red O 염색제는 Sigma사 (St. Louis, Missouri, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ , phospho-phosphatidyl inositol-3 kinase (p-PI3-K), phosphatidyl inositol-3 kinase (PI3-K), p-AKT, AKT, 그리고 β -actin 등에 대한 항체들은 모두 Santa Cruz사 (San Diego, CA, USA)에서, anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 Enhanced chemiluminescence kit (ELC kit)는 Amersham사 (Buckinghamshire, England)에서 각각 구입하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 시료의 조제

100 g의 히비스커스 분말이 300 ml의 정제수를 용매로 하루 밤 상온에서 추출한 후, 불순물은 필터페이퍼 (grade 1, Watman Ltd., Banbury, UK)를 이용하여 제거한 후,

Freezing dryer로 동결 건조하였다. 이때 추출물은 phosphate-buffered saline (PBS; pH7.4)에 100 mg/ml의 농도로 녹여 냉동보관 하였으며, 실험에 사용 시 DMEM에 희석하여 사용하였다.

2) 3T3-L1 세포주 배양 및 분화유도

전구지방세포인 3T3-L1세포는 CO₂ 세포배양기에서 (37°C, 5% CO₂) 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM으로 배양하였다. 48 시간 주기로 0.05% Trypsine-EDTA를 사용하여 계대 배양하였으며, 분양 후 계대 3~9 까지의 세포를 실험에 사용하였다. 분화를 유도하기 위해서 세포들은 MDI (0.5 mM isobutyl-methylxanthine (IBMX), 0.5 μ M dexamethasone, 1.7 μ M insulin)가 포함된 DMEM에 48 시간 배양 후 1.7 μ M insulin만 단독으로 포함된 배지로 2일마다 교체하여 배양하였다. 지방세포분화 과정 동안 히비스커스 추출물의 효과를 확인하기 위해서 분화 시약인 MDI 처리와 동시에 히비스커스 추출물을 농도별로 처리하였고, 분화여부는 유도 8일후에 확인하였다.

3) 세포생존율 측정

세포생존율은 세포 배양판 (24-well plate)에 세포 (1×10^5 cells/ml)를 1 ml씩 분주하여 12시간 이상 CO₂ 세포배양기 안에서 안정 후, 히비스커스 등을 처리한 다음, 배양액 최종 부피의 1/10 MTT 용액 (5 mg/ml in PBS)을 첨가하여 4시간 반응하였다. 생존 세포에 의해 형성된 보라색 formazan은 10% sodium-dodesyl sulfate (SDS)가 포함된 0.01 N HCl 용액 100 μ l/well을 세포에 첨가하여 용해시킨 다음 분광광도계 (ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

4) Oil Red O 염색

세포는 PBS로 3회 세척하고 3.7% formaldehyde 용액과 10분간 반응한 후 PBS로 세척하여 건조한 후 iso-propanol에 0.2%로 녹인 Oil Red O 염색액으로 30분간 염색하였다. 증류수로 세척 후 건조하여, 형광현미경 (Leica MPS60, Germany)으로 분화된 세포의 형태학적 변화 및 지질의 축적상태를 관찰하였다. 또한, iso-propanol에 녹여 분광광도계를 이용하여 510 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 지질생성정도를 비교하였다.

5) Western blot analysis

세포는 MDI와 히비스커스 등을 처리 후 포집하여, 차가운 Hank's balanced salt solution (HBSS, pH7.4)으로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 파쇄용액 (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSE, 1 μ g/ml aprotinin)과 4°C에서 30분간 반응하였다. 세포 파쇄액은 13,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여, 상층액은 BCA 용액을 이용하여 단백질을 정량 하였다. 동량의 세포파쇄액 (단백질 : 200 μ g)은 2xsample buffer와 혼합하여 100°C에서 5분 가열한 후에 12.5% SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 semi-dry 방법으로 실온에서 단위 면적당 0.8 mA 전하를 2시간 걸어주어 nitrocellulose membrane상에 이동시켰다. Nitrocellulose membrane은 blocking buffer (5% skim milk)와 상온에서 1시간 반응하여 비특이적 항체결합을 예방하였다. PPAR γ ,

phospho-PI3K, PI3-K, phospho-Akt, Akt 그리고 β -actin에 대한 항체는 0.01% (v/v)의 Tween-20이 포함된 3% skim milk/TBS에 1:1000으로 희석하여 상온에서 3시간 반응 후, 이차항체 (anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase)와 1시간 반응하였다. Nitrocellulose membrane은 TBS로 3번 세척 후 ECL kit를 사용하여 ECL 필름에 현상하였다.

6) 총 RNA의 분리

배양 세포로부터 총 RNA의 분리는 RNAzol B (Tel-Test, INC)로 제조회사가 제공하는 방법에 따라 수행하였다. 100 mm 세포 배양판에서 배양된 $3\sim 5 \times 10^6$ 세포를 PBS로 세척한 후, 1.5 ml tube에 옮기고 3,000 rpm에서 5분 원심분리하여 포집하였다. 상층액을 제거한 세포 침전물은 600 μ l RNAzol B로 용해시킨 후, 60 μ l chloroform을 첨가하여 4°C에서 5분 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 13,000 rpm, 4°C에서 20분 원심분리하여 상층액을 새로운 tube에 옮겼다. 위 상층액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 얼음에서 30분 반응시켜 13,000 rpm, 4°C에서 20분 원심분리하고, 침전물을 80% 에탄올로 세척하였다. 세척된 RNA는 건조 후, DEPC가 처리된 증류수 20 μ l로 녹이고 분광광도계에서 흡광도를 측정하여 RNA량을 정량하였다.

7) 역전사 효소 중합반응

역전사 (reverse transcription) 반응은 3~5 μ g 총 RNA와 reverse transcriptase (MMLV; GIBCO, BRL)를 이용하여 제조회사에서 제공하는 방법에 따라서 수행하였다. 총 RNA를 70°C에서 10분 변성시킨 후, 얼음 속에서 급냉 시켜서 사용하였다. 역전사 반응은 총 RNA (3~5 μ g), oligo d(T)12-18 (1 μ g), 2 μ l dNTP (10 mM), MMLV reverse transcriptase (200 U), DTT (10 mM), RNasin (1 μ l; Promega, USA)이 20 μ l 완충용액 (50 mM Tris-Cl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂)이 함유된 반응액으로 42°C에서 60분 반응하고, 역전사 반응액의 2 μ l가 함유된 30 μ l의 반응액으로 효소중합반응 (polymerase chain reaction; PCR)을 수행하였다. 약술하면, 2 μ l reverse transcription 반응액, 2 μ l dNTP (2.5 mM), 3 μ l primer (5 μ M); PPAR γ (antisense); 5' TCA GCG GGA AGG ACT TTA TG 3' ; Leptin (sense) 5' CCA AAA CCC TCA TCA AGA CCC 3' ; Leptin (antisense) 5' CTC AAA GCC ACC ACC TCT GC 3' ; Adiponectin (sense) 5' AAG GAC AAG GCC GTT CTC TCA 3' ; Adiponectin (antisense) 5' GGG TAG TTG CAG TCA GTT G 3'; Taq DNA polymerase(0.6 U; TAKARA)가 함유된 30 μ l 반응액 (20 mM Tris-Cl pH8.0, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT)을 94°C에서 5분 predenaturation시킨 후, denaturation (94°C, 45초), annealing(58°C, 45초), elongation (72°C, 60초)의 조건에서 33 cycles을 수행하였다. PCR 반응물은 1.5% agarose gel에 전개하여 확인하였다.

8) 결과 산출 방법

표시된 결과는 4번 이상의 독립적인 실험결과이며, 이들의 평균 (mean)과 표준편차 (standard deviation, S.D.)를 산출하여 결과를 표시하였다. 통계처리는 paired student's t-test 검정을 통하여 수행하였으며, p 값이 0.05 미만일 때 유의한 차이가 있다고 판정하였다.

결 과

1. MDI (hormone mixture)에 의한 지방세포 분화 효과

전구지방세포의 분화를 유도하기 위하여 전구지방세포주인 3T3-L1은 48 시간 동안 배양한 후, 분화유도 조건으로 MDI (0.5 mM isobutyl-methylxanthine (IBMX), 0.5 μ M dexamethasone 과 1.7 μ M insulin)를 48 시간 동안 처리후 세척하고, 1.7 μ M의 insulin이 포함된 배양액으로 2일마다 4일 동안 교체하면서 배양하였다. 분화과정은 형광현미경을 통해 세포질내의 지방 방울 생성 및 증가여부를 육안으로 관찰하였다. Fig. 1A에서와 같이, MDI를 처리하지 않은 전구지방세포는 길쭉한 fibroblast와 같은 형태이며 생성된 지방방울은 없었으나, MDI 처리 6일 째의 세포는 타원형으로 변성되었으며, 세포질 내 지방방울의 축적이 관찰되었다(Fig. 1A).

또한, 전구지방세포의 지방세포로의 분화를 분자생물학적 방법으로 확인하기 위해서 지방세포 분화시에 특이적으로 생성되어지는 세포내 인자들인 PPAR γ , Leptin 그리고 adiponectin의 발현정도를 RT-PCR을 통해 확인하였다. 그 결과, PPAR γ , Leptin 그리고 adiponectin은 분화유도 초기에는 발현되지 않았으나, 전구지방세포에 MDI를 처리한 3일후부터 발현이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 1B). 이상의 결과는 MDI에 의해서 전구지방세포는 형태학적 변화를 동반하는 세포내 전사인자의 발현증가를 통해 지방세포로 분화함을 알수 있었다.

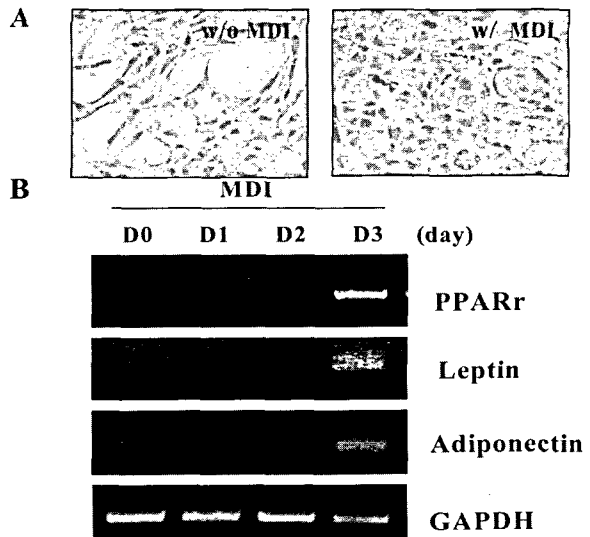


Fig. 1. The change of preadipocyte into adipocyte by MDI in 3T3-L1. 3T3-L1 preadipocytes was induced the differentiation into adipocyte as described in Materials and Methods. Cells were incubated with or without 0.5 mM isobutyl-methylxanthine (IBMX), 0.5 μ M dexamethasone and 1.7 μ M insulin (MDI) for 36h, and then, kept with insulin only for 5 days. A. Morphological changes of 3T3-L1 preadipocytes were monitored by fluorescent microscopy after 5 day of the differentiation induction. B. Time-dependent expression of adipogenic specific factors was confirmed by RT-PCR using indicated primers described in materials and method.

2. 히비스커스가 전구지방세포의 세포생존율과 분화유도에 미치는 영향

히비스커스가 전구지방세포주인 3T3-L1의 세포생존율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 히비스커스 단독을 다양한 농도로

처리한 후, 분화유도 시간인 6일째에 전구지방세포의 세포생존율의 변화를 MTT 방법으로 측정하였다. 전구지방세포의 생존율은 히비스커스 0.125 - 2 mg/ml의 농도에서는 대조군과 유사하여 히비스커스 단독에 의한 세포독성은 관찰되지 않았다(Fig. 2A).

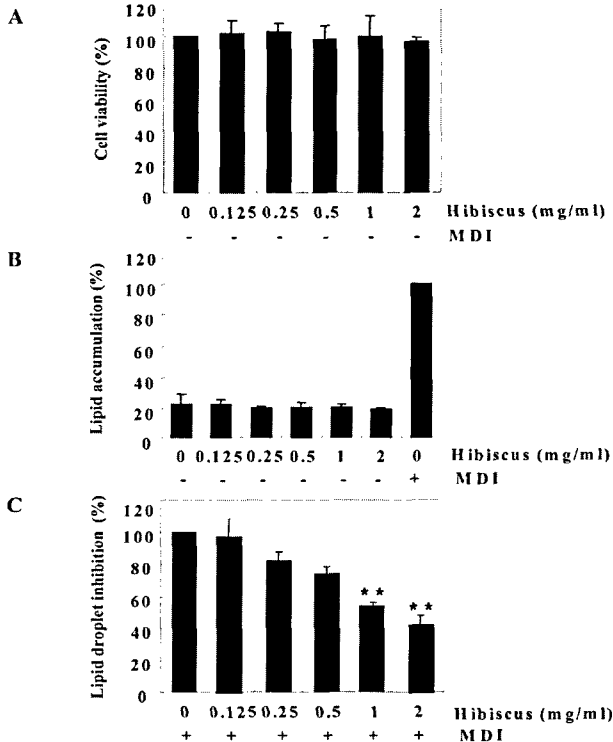


Fig. 2. Effects of Hibiscus extract on cell viability and differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. Cells were treated with various dose (0.125-2.0 mg/ml) of Hibiscus extract with or without MDI for 5days. A, cell viability was measured by MTT assay. B and C. Relative lipid accumulation after Hibiscus treatment with or without MDI was measured by Oil Red O staining. Stained oil droplets was dissolved with isopropanol and quantified by spectro-photometrical analysis at 510 nm. Results were represented as a relative percentage of differentiated cells. *, p<0.01 and **, p<0.05 by student t-test significantly different from only MDI-treated cells.

또한, 전구지방세포에서 히비스커스에 의한 지방방울 축적에 대한 영향과 MDI에 의해 분화된 지방세포의 지방생성 정도를 알아보기 위하여 히비스커스를 각각 농도별로 처리하고 6일후에 지방방울만 선택적으로 염색이 가능한 Oil Red O 염색을 실시하였다. 그 결과 분화되어지지 않은 세포의 지질생성도는 MDI에 의해 유도된 분화세포 지질의 22%에 해당하였으며, 히비스커스 단독 처리는 미분화지방세포의 지질생성에 영향을 미치지 않았다(Fig. 2B). MDI로 분화된 지방세포에 히비스커스를 동시처리 시 0.25 mg/ml 농도에서 세포내 지방생성도는 대조군의 81%를 나타냈으나 2 mg/ml 농도의 히비스커스 처리시 대조군의 51.25%를 보여 현저한 지질생성억제 현상을 보였다(Fig. 2C). 이상의 결과는 전구지방세포에서 0.125~2 mg/ml 농도의 히비스커스는 세포독성을 나타내지 않았으며, MDI에 의해 분화된 지방세포에서는 히비스커스 농도의존적으로 분화세포의 세포질 내 지질생성을 억제하였다.

3. 히비스커스가 지방세포분화 특이 전사인자에 미치는 영향
지방세포의 분화에 관여하는 PPAR γ , Leptin 그리고

adiponectin에 대한 히비스커스의 영향을 확인하기 위하여 전구 지방세포에 MDI를 처리하고 히비스커스 (2 mg/ml)를 처리한 후 3일, 5일에 세포를 포집하여 RT-PCR을 통해 이들 인자의 mRNA 발현변화를 비교하였다. 분화유도 3일째의 PPAR γ 와 Leptin의 mRNA 발현은 히비스커스를 처리한 실험군과 처리하지 않은 대조군의 발현량의 차이가 뚜렷하지 않았으나, 분화유도 5일째의 PPAR γ 와 Leptin의 발현량은 히비스커스 처리시 현저히 감소하였다(Fig. 3). 그러나, adiponectin의 경우, 분화유도 3일과 5일에서 히비스커스를 처리한 실험군의 발현량은 대조군과 유사하였으며, 히비스커스 처리에 의한 발현 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 3). 이상의 결과는 히비스커스가 지방세포분화시 발현증가되는 PPAR γ 및 Leptin mRNA의 발현의 감소를 유도하여 분화를 억제함을 시사하였다.

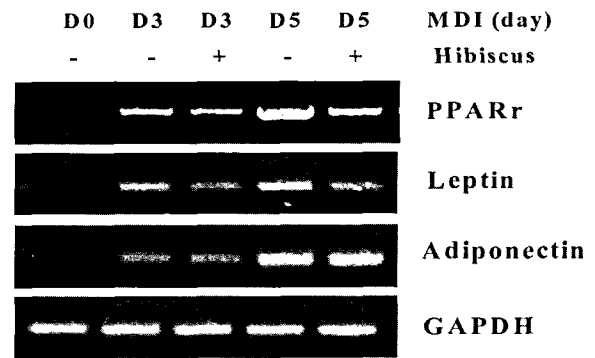


Fig. 3. Effect of Hibiscus extract on adipogenic specific factors during adipogenesis. Adipocyte differentiation was induced by treating the confluent 3T3-L1 cells with MDI in the absence or presence of 2 mg/ml Hibiscus extract. Day-dependent mRNA expressions of PPAR γ , Leptin and adiponectin from 3T3-L1 cells were measured by RT-PCR as described in materials and methods.

4. 히비스커스와 PI-3 kinase inhibitor에 의한 지질축적 억제효과
히비스커스에 의한 지방세포분화억제에서 Insulin signaling에 대한 영향을 알아보기 위하여 MDI 처리시 히비스커스와 PI-3kinase inhibitor로 잘 알려져 있는 wortmannin을 동시 처리하여 지질의 생성도를 조사하였다. 2 mg/ml의 히비스커스와 1 μ M wortmannin을 MDI와 각각 동시에 처리하였으며 이때 wortmannin은 날마다 새로운 배지에 첨가하여 교체하였다. 분화유도 5일후에 배양액을 제거하고, Oil Red O 염색을 실시한 결과, 분화유도세포에서 붉은색으로 변화하여 세포내 지질의 양이 증가함을 알수 있었다(Fig. 4A). 그러나 MDI와 히비스커스 또는 wortmannin을 각각 동시 처리한 실험군에서는 MDI 단독처리군에 비해 생성된 지질의 양이 현저하게 감소한 것을 확인할 수 있었다. Fig. 4B는 이를 iso-propanol로 녹여서 분광광도계를 이용하여 510 nm 파장에서 흡광도를 측정하고, 분화유도군을 100%로 환산, 수치화한 그래프이다. 히비스커스를 동시 처리한 실험군은 분화유도군의 46.5%, wortmannin을 동시 처리한 실험군은 분화유도군의 28% 지질형성을 보여 분화의 억제정도를 확인할 수 있었다(Fig. 4B). 이상의 결과는 MDI에 의한 분화유도시 히비스커스 추출물과 PI-3 inhibitor인 wortmannin은 지질생성을 억제하였으며, 이는 히비스커스가 insulin signaling에 관여하여 분화를 억제하였다고 판단된다.

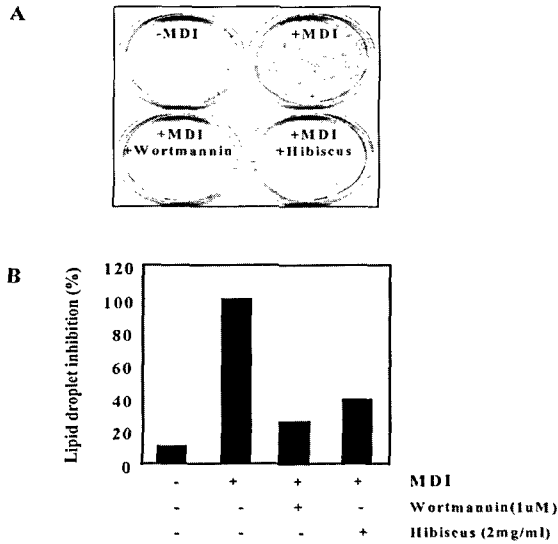


Fig. 4. Inhibition effect of lipid accumulation by Hibiscus extract and PI3-kinase inhibitors. Hibiscus extract (2 mg/ml) and PI3-kinase inhibitors, wortmannin (1 μM), were treated into cells during adipocyte differentiation. (A) After 5 days, cells were stained with Oil Red O to determine the degree of lipid accumulation. Morphological changes of cells were monitored by photograph. Stained oil droplets was dissolved with isopropanol and quantified by spectrophotometrical analysis at 510 nm. Results were represented as a relative percentage of differentiated cells. *, p<0.01 and **, p<0.05 by student t-test significantly different from MDI-treated cells.

5. 지방세포분화에서 히비스커스에 의한 Akt의 활성 억제효과
 앞에서 히비스커스는 지방세포분화시 PI-3 Kinase inhibitor와 유사하게 세포내 지방생성을 억제하는 것을 확인하였다. 따라서 히비스커스가 지방세포분화시 insulin signaling에 관련된 protein들에 미치는 영향을 확인하기 위해서, 지방세포분화의 대표적인 지표로 알려져 있는 adipogenic transcriptional factor 인 C/EBPα와 insulin signaling에 중요하게 확인되어지는 PI-3 Kinase와 Akt의 인산화를 Western blotting 방법으로 확인하였다.

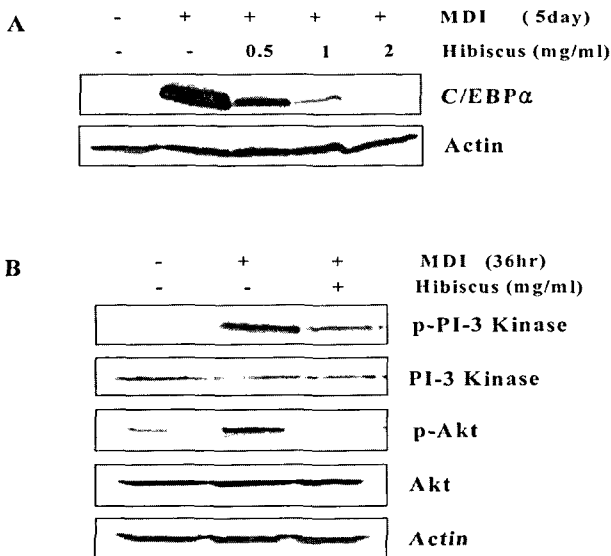


Fig. 5. Inhibitory effect of Hibiscus extract on insulin signaling-related protein during adipocyte differentiation. Confluent 3T3-L1 preadipocyte cells were induced to differentiate in media containing MDI and various dose (0.5-2 mg/ml) of Hibiscus extract. Total proteins harvested at 5 day or 36 hour from each sample. The proteins were electrophoresed on a 12% SDS polyacrylamide gel, blotted to a poly membrane, and probed with antiserum specific to C/EBPα, p-PI-3-Kinase, p-Akt, Akt and β-actin.

그 결과, C/EBPα의 발현은 MDI 처리시 증가하였으나, 히비스커스 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 5A). 또한, insulin signaling에 주요하게 관여되어 있는 PI-3 Kinase와 Akt의 인산화를 확인한 결과, MDI 처리 36 시간에 최대로 활성화 되었으며, 히비스커스를 동시 처리시 MDI 단독처리군에 비해 뚜렷하게 억제되었다(Fig. 5B). 따라서 히비스커스는 MDI에 의한 지방세포분화시 PI3 Kinase와 Akt의 인산화를 조절하여 세포내 지질생성을 억제하는 것으로 사료 되어진다.

고찰

최근 10여 년 동안 건강보조식품으로 차나 천연물의 효과에 관심이 급증하고 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 동물이나 인체의 지질형성억제나 비만억제에 대한 문제는 고혈압이나, 동맥경화 그리고 비만과 같은 성인병 때문에 주요한 이슈가 되어왔다. 특히, 히비스커스 추출물은 히비스커스 acid, 플라보노이드, polyphenol 그리고 녹는 섬유질과 같은 천연성분을 포함하고 있는 것으로 알려지고 있으며, 이들은 항고혈압, 항콜레스테롤 효과 및 비만억제효과가 있는 것으로 최근 보도되었다⁷⁻¹²). 따라서, 본 연구에서는 전구지방세포주인 3T3-L1을 대상으로 히비스커스 물추출물의 지방세포분화 억제 기전을 조사하였다. 이를 위하여 먼저 3T3-L1 전구지방세포의 분화를 유도하고자 confluent 3T3-L1 preadipocyte에 호르몬 혼합물인 MDI (isobutyl-methylxanthine, dexamethasone 및 insulin)을 처리하고 48시간 뒤에 insulin 단일 배양액으로 교체하였는데, 유도 5일째에 육안으로 세포질내의 축적된 지방방울의 형성을 관찰 할 수 있었고(Fig. 1A), 유도 날짜별로 지방세포의 특이적 지표인 PPARγ와 Leptin, adiponectin의 mRNA의 발현정도를 확인해본 결과, MDI 처리 3일후부터 이들의 mRNA 발현이 증가하였다. 이는 실험에 사용된 3T3-L1 지방전구세포가 유도시기에 적합하게 지방세포로 분화된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1B). 앞에서 분화능력이 확인된 전구지방세포에서 히비스커스 추출물의 세포독성을 확인한 결과, 0.125-2 mg/ml 농도의 히비스커스 추출물을 단독 처리시 세포독성을 보이지 않았다(Fig. 2A). 또한, 분화된 지방세포에서 히비스커스 추출물의 효과를 확인하기 위해 농도별로 처리한 후 5일째에 Oil Red O 염색을 실시하고 분광광도계로 이들의 흡광도를 측정하여 지질생성정도를 비교한 결과, 히비스커스 추출물 농도 의존적으로 지질생성을 억제하였으며, 2 mg/ml 농도의 히비스커스 추출물 처리시 대조군에 비해 약 50% 억제된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2C). 즉, 히비스커스 추출물이 MDI처리에 의한 전구지방세포의 지방생성을 억제함을 알 수 있었다.

전구지방세포가 지방세포로 분화되는 동안 발현되어 지는 많은 단백질과 유전자 및 호르몬들은 지방세포 전사인자인 C/EBPα, C/EBPβ, C/EBPδ와 PPARγ, 지방세포 내에서 생성되어지는 aP2, adipin, 과 adiponectin, 그리고 지방세포가 분비하는 호르몬인 Leptin 등이 있다. 지방세포 전사인자인 C/EBPα와 PPARγ는 세포가 분화하는 동안 주요하게 발현되어 지방세포 유전자의 promoter를 조절하여 지방세포의 분화를 유지하고 관리하며, 지

방세포 지표로 활용된다²¹⁻²³⁾. 또한 Leptin은 지방세포에서 분비하는 호르몬으로 식욕중추를 조절하여 음식섭취를 관리하는 호르몬으로 알려져 있고, 지방세포 전사인자인 C/EBPα에 의해서 그 promoter가 활성화되는 것으로 보고되어 있다^{24,25)}. 본 연구에서는 전구지방세포에 MDI 처리 날짜별로 PPAR γ 와 Leptin, 그리고 adiponectin의 mRNA 발현정도를 확인하고, 분화유도된 세포에서 히비스커스 추출물에 의한 발현량의 차이를 확인한 결과, 분화시작 3일째부터 이들 mRNA의 발현량이 증가하여 분화 5일째에 최대의 증가량을 보였다. PPAR γ 와 Leptin의 경우 히비스커스 추출물이 첨가된 실험군은 대조군에 비해 현저하게 mRNA 발현량이 감소하였고(Fig. 3), 히비스커스 추출물은 PPAR γ 와 Leptin을 억제하는 것으로 생각되어지나 adiponectin의 경우 분화시 증가된 mRNA 발현량이 히비스커스 추출물에 의해 억제되지 않았다.

지방세포분화시 insulin signaling은 잘 알려진 경로이며, PI-3 kinase와 Akt 단백질은 insulin에 의해 활성화 되어진다^{26,27)}. 본 연구에서는 insulin signaling의 관여여부를 확인하고자 PI-3 kinase inhibitor로 알려진 wortmannin을 사용하여 히비스커스 추출물에 의한 분화 억제정도를 비교하였다. 그 결과 대조군에 비해 wortmannin과 히비스커스 추출물을 처리한 실험군이 현저하게 지질축적이 억제된 것을 확인하였다(Fig. 4A). 즉, 지방세포분화시 insulin signaling의 하부에 존재하는 PI-3 Kinase가 관여함을 확인할 수 있었다. 특히, 히비스커스 추출물의 농도 의존적으로 분화 전사인자인 C/EBPα의 발현량이 MDI 처리 대조군에 비해 현저하게 억제된 것을 확인하였다(Fig. 5A). 특히, PI-3 Kinase와 Akt 단백질들은 분화가 유도된 대조군에서 활성이 증가하였고, 히비스커스 추출물 처리시 활성이 감소하였다(Fig. 5A). 이는 히비스커스 추출물에 의한 지방세포분화의 억제가 Insulin signaling과 관계된 것으로 유추되어지며, 히비스커스 추출물에 의한 Insulin signaling의 억제가 C/EBPα나 PPAR γ 의 발현을 조절하였을 가능성을 시사하였다.

요약하면, 히비스커스 추출물은 MDI 처리에 의해 전구지방세포에서 지방세포로 분화시 세포질내 지질축적을 효과적으로 억제하고, insulin signaling에 관여하는 protein들의 활성 조절, PPAR γ 와 C/EBPα의 전사 조절 및 Leptin 호르몬의 발현 억제를 통하여 지방세포분화를 억제하였다. 따라서, 히비스커스 추출물에 의한 지방세포분화 억제는 비만예방에 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 사료되며, in vivo 실험을 통한 히비스커스 효능 검증을 통해, 비만 예방 및 억제제로서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 원광대학교 2006년 교내연구비 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

1. Kuczmarski, R.J., Flegal, K.M., Campbell, S.M., Johnson, C.L. Increasing prevalence of overweight among US adults.

- The National Health and Nutrition Examination Surveys. 1960 to 1991. JAMA. 272:205-211, 1994.
2. Wolf, A.M., Colditz, G.A. Social and economic effects of body weight in the United States. Am. J. Clin. Nutr. 63: 466S-469S, 1996.
3. Pi-Sunyer, F.X. Medical hazards of obesity. Ann Intern Med. 19(7 Pt 2):655-660, 1993.
4. Update: Prevalence of overweight among children, adolescents, and adults-United States. Morb Mortal Wkly Rep. 46: 199-202, 1997.
5. Sheard, N.F. Moderate changes in weight and physical activity can prevent or delay the development of type 2 diabetes mellitus in susceptible individuals. Nutr. Rev. 61: 76-79, 2003.
6. Anne, W. Harmon, Joyce, B. Harp. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. Am J Physiol Cell Physiol. 280:C807-C813, 2001.
7. Swen, W., Ying, W., Frank, T. Anti-obesity effects of green tea: from beside to bench. Mol. Nutr. Food Res. 50: 176-187, 2006.
8. Haji, Rajaji, Haji, Takhani. The effect of sour tea (Hibiscus sabdariffa L) on essential hypertension. 65:231-236, 1999.
9. Onyenekwe, P.C., Ajani, E.O., Ameh, D.A., Gamaniel, K.S. Antihypertensive effect of roselle (Hibiscus sabdariffa) calyx infusion in spontaneously hypertensive rats and a comparison of its toxicity with that in Wistar rats. Cell Biochem Funct. 17(3):199-206, 1999.
10. El-saadany, S.S., Sitohy, M. Z., Labib, S.M. Biochemical dynamics and hypo cholesterolemic action of Hibiscus sabdariffa (Karkade). Nahrung. 35:567-576, 1991.
11. Hansawasdi, C., Kawabata, J., Kasai, T. Alpha-amylase inhibitors from roselle (Hibiscus sabdariffa Linn.) tea. Biosci Biotechnol Biochem. 64(5):1041-1043, 2000.
12. Farombi, E.O., Fakoya, A. Free radical scavenging and antigenotoxic activities of natural phenolic compounds in dried flowers. Mol Nutr Food Res. 49(12):1120-1128, 2005.
13. Hirunpanich, V., Utaipat, A., Morales, N.P., Bunyapraphatsara, N., Sato, H., Herunsale, A., Suthisisang, C. Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of Hibiscus sabdariffa L in hypercholesterolemic rats. J Ethnopharmacol. 103(2):252-260, 2006.
14. Cornelius, P., MacDounald, O.A., Lane, M.D. Regulation of adipocyte development. Annu Rev Nutr. 14:99-129, 1994.
15. Regina, P.B., Kim, J.B., Erding, H., Soner, A., Bruce, M.S. Adipocyte differentiation: a transcriptional regulatory cascade. 8:826-832, 1996.
16. Lin, F.T., Lane, M.D. CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte

- differentiation program. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(19):8757-8761, 1994.
17. Rosen, E.D., Hsu, C.H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M. W., Gonzalez, F.J., Spiegelman. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev*. 16(1):22-26, 2002.
 18. Smith, P.J., Wise, L.S., Berkowitz, R.C., Rubin, C.S. Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 263:9402-9408, 1988.
 19. Cheatham, B., Kahn, C.R. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev*. 16:117-142, 1995.
 20. Czech, M.P. Fat targets for insulin signaling. *Mol Cell*. 9: 695-696, 2002.
 21. Birkenmeier, E.H., Gwynn, B., Howard, S., Jerry, J., Gordon, J.I. Landschulz, W.H., McKnight, S.L. Tissue-specific expression, developmental regulation, and genetic mapping of the gene encoding CCAAT/enhancer binding protein. *Genes Dev*. 3(8):1146-1156, 1989.
 22. Johnson, P.F., Landschulz, W.H., Graves, B.J., McKnight, S.L. Identification of a rat liver nuclear protein that binds to the enhancer core element of three animal viruses. *Gene Dev*. 1:133-146, 1987.
 23. McKnight, S.L. *Transcriptional regulation*. Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview. 771-795. 1992.
 24. Friedman, J.M., Halaas, J.L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *nature*. 395:763-770, 1998.
 25. He, Y, Chen, H., Quon, M.J., Reitman, M. The mouse obese gene. Genomic organization, promoter activity, and activation by CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Biol Chem*. 270:28887-28891, 1995.
 26. Bluher, M., Michael, M.D., Peroni, O.D., Ueki, K., Carter, N., Kahn, B.B., Kahn, C.R. Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev. Cell* 3:25-38, 2002.
 27. Bluher, M., Patti, M.E., Gesta, S., Kahn, B.B., Kahn, C.R. Intrinsic heterogeneity in adipose tissue of fat-specific insulin receptor knockout mice is associated with differences in patterns of gene expression. *J. Biol. Chem*. 2004.