

갈근이 비만 랫드 간조직의 비만관련 유전자 발현에 미치는 영향

신운상 · 황귀서*
가천대학교 한의과대학

The effects of *Pueraria lobata* extract on gene expression in liver tissue of rat with estrogen-deficient obesity

Yoon Sang Shin & Gwi Seo Hwang*
College of Korean Medicine, Gachon University

Abstract

Objective : It is known that *Pueraria lobata* has an anti-osteoporetic effect, anti-cancer effect, anti-pyretic effect, and anti-diabetic effect. The aim of this study was to evaluate anti-obesity effect of *Pueraria lobata* extract (PLE), and elucidate the effect of it on gene expression related to lipid metabolism.

Method : The experiments were performed with the use of ovariectomized rats as estrogen-deficient obesity model. They were grouped NC (normal control), OC (estrogen-deficient control), PLH (100mg/kg of PLE), PLL (20mg/kg). PLE was orally administered for 6 weeks. Body weights and serum lipid level were estimated, and real-time PCR was performed to investigate the effect of PLE on gene expression in liver.

Results : PLE decreased the body weight and serum cholesterol and triglyceride, but increased HDL-cholesterol. And PLE increased leptin, CYP27, CPT1, CYP8B1, ACAT2, LDLR, and SCD1, but reduced PPAR γ , PGC1A, HMG-CoA-R, ACAT1, SCD1, and APoB gene expression in liver tissue of rat with estrogen-deficient obesity.

Conclusion : It is concluded that *Pueraria lobata* reduced body weight, and its effect was expressed by regulation of gene expression related to lipid metabolism in rats with estrogen-deficient obesity.

Key words : *Pueraria lobata*, obesity, estrogen, gene expression

I. 서론

에스트로젠은 주로 난소의 내포막세포와 황체에서 분비되며 부신피질과 고환에서도 분비된다. 에스트로젠은 여성생식기관 및 유방의 발육을 촉진하고 골 성숙과 파골세포 억제와 같은 골대사를 조절하며¹⁾, 특히,

hypothalamus에서의 leptin의 분비를 억제하여 음식 섭취를 억제하는 작용은 근육 운동량의 증가와 지방세포에서 lipogenesis 억제와 lipolysis 증가, 지방세포 분화인자의 발현 억제 등을 통해 체중조절에 관여한다.²⁾ 여성의 폐경기 증상인 열성홍조 및 심계항진, 불면증 등과 비노생식기의 위축으로 인한 요실금, 배뇨장애, 성교통, 노인성 질염, 골다공증, 치매와 같은 증상

• 접수 : 2014년 12월 16일 • 수정접수 : 2014년 12월 22일 • 채택 : 2014년 12월 26일

*교신저자 : Gwi-Seo Hwang, College of Korean Medicine, Gachon University, Seongnam 461-701, Korea
전화 : +82-31-750-5421, 전자우편 : seoul@gachon.ac.kr

은 난소기능저하로 인한 에스트로젠 결핍이 주요한 원인이라고 알려져 있다. 특히, 에스트로젠 결핍은 혈중 FSH의 증가, testosterone의 증가, 기초대사량의 감소, sex hormone binding globulin(SHBG) 감소 등을 수반하여 지방대사의 저하, 당 흡수 증가로 인한 과다한 지방 축적으로 비만을 유발한다.³⁻⁴⁾

과량의 식사로 에너지를 과잉 섭취하는 경우 주로 간 세포에서는 혈중의 glucose를 흡수하여 glycogen을 합성하고, 근육세포에서는 근육 단백질을 합성하며, 지방세포는 지방을 흡수하여 중성지방 형태로 저장하여 에너지가 부족할 때 분해하여 사용한다. 이 과정에서 분화 성숙한 지방세포는 다양한 adipokine을 분비하여 다양한 생리활성을 나타내는데, 비만이 유발되면 지방 세포에서 분비되는 호르몬, 성장인자, 사이토카인등의 과다 발현에 의해 심혈계질환 및 대사질환을 일으킬 수 있다.⁵⁾ 따라서, 폐경기 이후의 에스트로젠 결핍성 비만은 다양한 합병증을 유발할 수 있기 때문에 중년기 여성들에게서 심각한 건강 위협요인으로 작용하고 있다.

본 연구에 사용한 갈근은 다년생 콩과(Leguminosae) 식물인 칩(Pueraria lobata)의 塊根으로 發汗, 解熱, 鎮痙, 解肌, 透疹, 止渴, 止瀉, 升揚의 효능이 있어서, 傷寒에 의한 溫熱頭痛으로 목덜미가 굳어지는 것, 煩熱에 따른 消渴, 泄瀉, 痢疾, 癩疹不透, 高血壓, 心絞通 등을 치료하는데 사용되었다.⁶⁾

갈근의 주성분으로는 flavonoid 류인 daidzin, puerarin, formononetin, genistein 과 terpene 류인 kudzuaponins A1, A2, A3 등이 함유되어 있는 것으로 보고되었다.⁷⁾ 약리작용으로 갈근은 우울증 억제, 알콜대사 촉진, 골다공증 생성을 억제하는 것으로 보고되었다.⁸⁾ 또한, 주성분인 puerarin은 항당뇨효과, 미소혈관 순환개선, 혈관평활근 이완, LDL 감소효과, 항불안 효과 등이 보고되었으며⁹⁾, genistein에서도 LDL 산화억제, 암세포 성장 억제 효능이 보고되었다¹⁰⁾. 이 밖에 갈근에 함유된 isoflavone 계열의 화합물에서 estrogen 수용체에 작용하는 phytoestrogen 물질이 존재한다고 보고되었다.¹¹⁾

따라서, 갈근 추출물은 난소기능 저하로 인한 에스트로젠 결핍성 비만을 억제할 수 있을 것으로 판단되었다. 본 연구에서는 난소를 제거한 랫드의 체중 및 혈청 지질함량 및 간 조직에서 비만 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

1) 시료 제조

갈근(*Pueraria lobata*)에 30% 에탄올을 가한 후 환류 추출하였으며, 70% 에탄올로 당을 침전시켰다. 추출물을 1,500g로 원심분리하여 침전물을 제거한 다음 상층액을 증발 농축하고 동결건조한 추출물(수율 5.7%)을 PLG로 명명하여 실험에 사용하였다.

2) 실험동물 및 사육

실험동물은 오리엔탈바이오에서 암컷 S.D 랫드를 공급받아 실험실에서 1주일간 적응시킨 후 사용하였다. 사육장은 인공조명설비에 의하여 조명시간을 오전 7:00 부터 오후 7:00까지 12시간으로 조절하였으며, 실내온도는 22℃ 내외, 습도는 60% 내외로 유지하였다. 정상군 투여사료는 고휘사료(삼양사, 한국)를 사용하였으며, 그 조성은 조단백 21%, 조지방 3.5%, 조셀룰로오스 5.0%, 무기질 8.0% 등이다. 급수는 일반 상수도를 사용하였고, 사료와 급수는 제한하지 않았다.

2. 실험방법

1) 비만 동물 실험

(1) 에스트로젠 결핍성 비만유도 및 약물투여

랫드에 ketamine(유한양행)을 1 ml/kg 용량으로 근육주사하여 전신 마취를 시킨 다음, 복부털을 제거하였다. 70 % EtOH로 수술부위를 소독하고 1 cm 정도로 피부, 복근, 복막을 절개하여 난소를 노출시킨 후, 적출수술을 시행하고 다시 봉합하였다. 정상군은 랫드의 복막 절개까지만 난소절제수술과 같은 방법으로 시행하고, 난소적출은 하지 않고 다시 봉합하는 모의수술(Sham Operation)을 시행하였다.

(2) 실험군 설정 및 약물 투여

실험은 실험동물을 4 개군으로 나누어 시행하였다. 즉, (1) 복막 절개 후 난소를 적출하지 않은 모의수술

정상군 (NC) (2) 난소 적출후 약물을 투여하지 않은 실험대조군 (OC) (3) 난소 적출 후 PL 추출물을 20 mg/kg 씩 경구 투여한 군 (PLL) (4) 난소 적출 후 PL 추출물을 100 mg/kg 씩 경구 투여한 군(PLH)으로 나누었다. 실험에 사용한 동물은 모의 수술군 및 대조군은 10 마리, 약물 투여군은 8 마리씩으로 하였다. 투여 약물은 동결 건조한 추출을 200 mg/ml이 되도록 생리 식염수에 녹인 후, 1 일 1 회씩 6 주간 투여하였다. 마지막 투여 24 시간 후에 랫드를 희생시켜 혈액과 장기를 취하였다. 장기는 분리 즉시, 질소 탱크에 넣었다가 -80℃에 보관하였다.

(3) 혈청 지질 함량 측정

약물 투여 24 시간 후 채혈하고 3000 rpm 으로 10 분간 원심분리시켜 상층을 20ul씩 취하였다. Total cholesterol, TG(triglyceride), HDL(high density lipoprotein) 함량은 영동제약에서 구입한 kit를 사용하여 측정하였다.

2) 유전자 발현 실험

(1) 총 RNA 분리

랫드에서 취한 간 조직을 PBS를 넣고 균질화한 다음, 1 ml TRIzol reagent (Invitrogen, USA)를 처리하여 총 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA 용액에 200 μ l의 chloroform : isoamylalcohol (24:1)을 넣고 강하게 섞은 후 14,000 rpm으로 원심 분리하여 상층액 500 μ l를 분리하였다. 0.5ml isopropyl alcohol을 여기에 가하여 영하 20℃에서 하룻밤 RNA를 침전시킨 후 1,400 rpm으로 20분간 원심분리하였다. 상층액을 버린 후 70% 에탄올로 세척하고 자연 건조시켰다. RNase free water에서 RNA를 녹인 후 RNase-free DNase를 첨가하고 -70℃에서 저장하였다.

(2) cDNA 제조

대조군 및 실험군에서 각각 분리한 total RNA 액 1 μ l에 (1 μ g RNA 함유)에 oligo dT (농도 100 pmol) 1 μ l, RNase free water 3 μ l을 넣은 후 조심스럽게 혼합한 다음, 65℃에서 10분간 incubation하였다. Primer 가 annealing 하도록 4℃에서 약 5 분간 방치한 다음, Reverse transcriptase buffer, dNTP (각 2.5 mM), RNase inhibitor, DTT (100 nM), Reverse trans-

criptase (M-MLV 200 U/ μ l)을 첨가한 후, 아주 조심스럽게 혼합하였다. 이 후, 42℃에서 90분간 incubation 한 후, 95 도에서 5 분간 처리한 후 사용하였다.

(3) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Oligo (dT) primer (Promega, Cat.No. C1101), reaction buffer (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, pH 8.3) (Promega, Cat. No. M1705), 1 mM dNTP (Promega, Cat.No. U1515) 과 200 unit M-MLV-RT (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase) (Promega, Cat. No. M1705)를 분리한 RNA에 처리하여 역전사를 수행함으로써 cDNA를 합성하였다. PCR은 total volume 25 μ l에 10 X PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 2 pmole 의 sense 및 antisense primer를 넣은 혼합액에 cDNA 와 1.25 unit의 Taq polymerase (Promega, Cat. No. M8295)을 넣어 PCR을 시행하였다. PCR 조건은 94℃ 4 분, 30 cycles의 [94℃ (20초), 54℃ (20초), 72℃ (30초)], 72℃ 10 분이였다(Perkin Elmer, USA). 증폭된 PCR 산물을 2 % agarose gel에 전기영동하였다. 전기영동 결과 나온 band를 density 분석 프로그램인 Gel-Pro analyzer 3.1 (Media Cybernetics, USA)을 이용하여 구했다. RT PCR에 사용한 primer 는 아래 Table I에 표시하였다.

(4) Real time RT-PCR

각각의 optical tube (MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode and Optical Adhesive Films, Applied Biosystems, Cat.No. 4314320)에 3 배의 SybrGreen Mix 2.5 μ l (Sigma-Aldrich, Cat.No. S9430), 위에서 합성한 cDNA 1 μ l, 10 pmol/ μ l primer pair mix 1 μ l, 각각 2.5 mM의 dNTP 2 μ l, 10 x Tag polymerase buffer 2.5 μ l, Tag Polymerase 0.3 μ l 와 14.7 μ l H₂O를 넣고, 95℃ 5 min 1 cycle, 95℃ 30 sec, 45℃ 30 sec, 72℃ 60 sec 40 cycles, 95℃ 20 min 1 cycle로 증폭시켰다. Primer는 RT-PCR에 사용한 것을 이용하였다. PCR을 마친 후 tube를 꺼낸 다음, 반응액 5 μ l를 사용하여 3 % agarose gel에서 PCR specificity 를 측정하고, ABI PRISM® 7000 Sequence Detection

Table I. Primers

Primer	Sense (5'-3')	Antisense (5'-3')
ACAT-1	ATGTGGGAAGTAAATGAAGC	AAATACTAGCCAGACCGAAT
ACAT-2	CGGTCATGCTGATCCTCTTT	GTGTCACCAGCTCCCAAAAT
ACOX	ACTATATTTGGCCAATTTTGTG	TGTGGCAGTGGTTTCCAAGCC
ApoB	TTGACACACTGAAGTTCCTA	ACATCAAACCCTGGTATTAG
CPT1	TATGTGAGGATGCTGCTTCC	CTCGGAGAGCTAAGCTTGTGTC
CYP27	CTCAAGAGACTGTCGGCAC	CTTCTGGATCTCTGGGTT
CYP8B1	ATGAAGGCTGTGCGAGAG	TCTCTCCATCACGCTGTC
HMG-CoA-R	GCTGGTGAGTTGTCCCTTGAT	CTTCTTGGTGCATGTTCCCT
LDL-R	CTTGCCCTGATGGTATGCTA	CTTGCGCTTCAGTGACACA
Leptin	GACACCAAACCCCTCAT	CAGTGTCTGGTCCATCT
LPL	GCCCAGCAACATTATCCAGT	AGCAGCATGGGCTCCAAGA
PGC-1 α	GAAGCGGGAGTCTGAAAGG	GTAAATCACACGGCGCTCTT
PPAR γ	TCGGAGGGCTCTGTCATC	CATCTGTACTGGTGGGGACA
SCD-1	GCCCTGTACGGGATCACA	CCCAGGGCACTGATAAGGTA
SREBP-1c	GGAGCCATGGATTGCACATT	AGGAAGGCTTCCAGAGAGGA
β -Actin	CTATGAGCTGCCTGACGGTC	AGTTTCATGGATGCACAGG

ACAT-1, acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 1; ACAT-2, acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 2; ACOX, acyl-CoA oxidase; ApoB, apolipoprotein B; CPT-1, carnitine palmitoyl transferase-1; CYP27, cholesterol 27-hydroxylase; CYP8B1, cholesterol 12 α -hydroxylase; HMG-CoA-R, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase ; LDL-R, low-density lipoprotein receptor; LPL, lipoprotein lipase; PGC-1 α , peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α ; PPAR γ , peroxisome proliferator activated receptor- γ ; SCD-1, stearoyl CoA desaturase-1; SREBP-1c, sterol-regulatory element-binding protein-1c;

System (Applied Biosystems, Cat.No. 4349157)를 사용하여 real time PCR 결과를 분석하였다.

3. 통계처리

각 결과에 대한 유의성 검증은 student's t-test를 이용하였다.

III. 결과 및 고찰

에스트로겐이 결핍된 여성에게서 비만이 유발되고 동맥경화 및 순환기계 질환의 위험성이 증가한다는 것은 이미 알려져 있다.³⁾ 이는 에스트로겐이 지방대사에 관여하여 혈청 LDL -cholesterol을 억제하며 HDL-cholesterol 생성을 증가시키고, homocysteine 생성 및 혈관내 작용을 억제하는 작용과 관련이 있다.¹²⁾ 비만 상태에서는 지방세포에 지방이 축적되어 크기가 커지게 되며 이에 따라 지방세포로부터 leptin, adipo-

nectin, resistin 등의 다양한 adipokine들이 유리되게 된다. Adipokine은 Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Interlukin-6 (IL-6), Transforming growth factor- β (TGF- β), Macrophage migration inhibitory factor (MIF), leptin, Peroxisome proliferator activated receptors (PPARs), Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), adiponectin, angiotensinogen, tissue factor, resistin 등이 보고되어 있다.¹³⁾ Adipokine은 일반적으로 비만을 증가시켜 당뇨병이나 동맥경화증을 유발시키는 병리학적인 상태와 관련성이 깊다. 이러한 것은 지방세포나 혈관내피세포에서 발현되는 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), E-selectin 및 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) 의 과다발현을 증가하여 단핵세포(monocyte)가 혈관내피세포에 붙는 것을 촉진하기 때문이다.¹⁴⁾ 또한 에스트로겐은 HDL과 반응하여 콜레스테롤을 에스테르화시키고, 대식세포와 단핵구세포가 혈관벽을 통과를 억제하는 동시에 LDL의 산화를 통해 생성되는 oxLDL의 생성을 억제한다. 대식세

포가 거품세포(foam cell)로 변화하는 것은 oxLDL 생성 및 흡수와 밀접한 관련이 있으며 동맥경화증이 발생하는 시발점으로 알려져 있다. 에스트로겐은 대식세포가 거품세포가 되는 것을 억제하는 것과 함께, 지방세포로부터 동맥경화를 유발하는 사이토카인의 발현을 억제하여 평활근 세포의 분화와 증식을 억제할 수 있다.¹⁵⁾ 에스트로겐은 이런 심혈관계에 대한 작용 뿐 아니라 지방합성을 억제함으로써 지방세포내의 지방축적을 억제 한다. 이러한 작용은 주로 지방세포로 지방을 축적시키는 효소인 lipoprotein lipase (LPL)의 작용을 줄임으로써 일어난다.¹⁶⁾

본 연구에서는 갈근 추출물 (PLE)이 에스트로겐 결핍 비만동물에서의 체중 및 혈중 지질대사와 지방세포 및 지방전구세포의 유전자 발현에 미치는 영향에 대하여 실험하여 갱년기 이후 여성의 비만 및 심혈관계 질

환의 주요한 합병증으로 발병하는 고지혈증에서의 PLE의 응용가능성을 평가하고자 하였다.

우선 에스트로겐 결핍 비만상태에서 나타나는 체중에서의 PLE의 영향을 검토한 결과 PLE 투여 6 주 후, 에스트로겐 결핍 대조군에서 정상대조군에 비해서 유의성 있는 체중의 증가를 보였으며, 실험군인 갈근 추출물 고용량(PLH) 투여군에서 대조군에 비해 체중이 감소되었다(Fig. 1).

PLE가 지질대사에 대해 미치는 영향을 검토하고자 총 콜레스테롤 함량, Triglyceride 함량, HDL-cholesterol 함량을 측정하였다. 에스트로겐 결핍 비만 상태에서 정상대조군에 비하여 총 콜레스테롤 함량, Triglyceride 함량이 현저히 증가되어 있었다(Table II). 비만 랫드에 PLE를 100 mg/kg 용량으로 6 주간 투여한 고용량투여군 (PLH)의 경우, 혈중 총콜레스테롤,

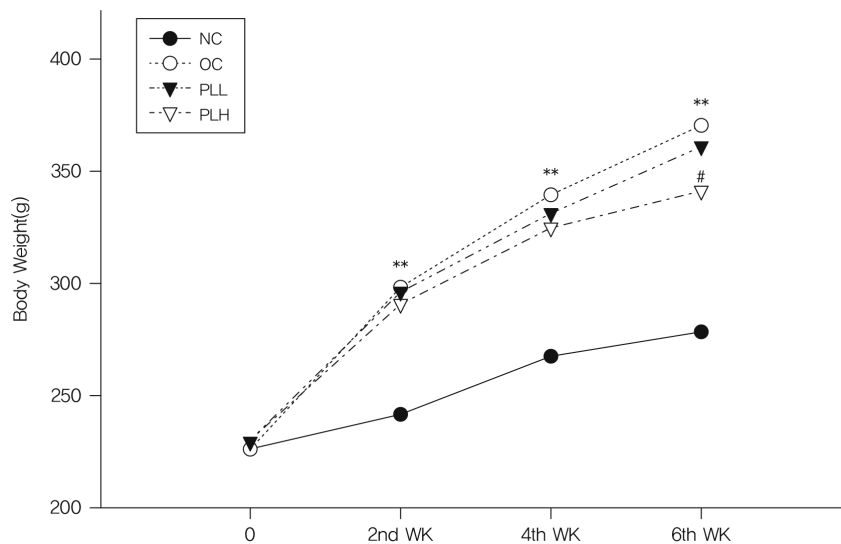


Fig. 1 Effect of PLE on change of body weight(g)

Wk	Group	NC	OC	PLL	PLH
0		225 ± 8	227 ± 11	229 ± 10	227 ± 11
2		242 ± 8	297 ± 18**	296 ± 14	292 ± 12
4		267 ± 16	340 ± 17**	331 ± 13	325 ± 16
6		278 ± 18	371 ± 18**	361 ± 18	341 ± 20#

NC: Normal control

OC: Estrogen-deficient control

PLL: OC + PLE 20 mg/kg/day, P.O. for 6 weeks

PLH: OC + PLE 100 mg/kg/day, P.O. for 6 weeks

PLE: Pueraria lobata extract

** : p < 0.01 vs NC

: p < 0.05 vs OC

Triglyceride 함량이 감소하였다. 또한, 고지혈증 상태에서 정상대조군보다 감소한 HDL-cholesterol 함량은 PLE 투여로 인해 약간 증가하였다(Table II). 이는 PLE가 지질대사에 영향을 주어 지질 침착으로 인해 발생하는 심혈관계 질환을 억제할 가능성을 시사해 준다. 본 연구에서는 에스트로겐 결핍성 비만 랫드의 체중을 감소시키고, 혈중 총 cholesterol 치와 TG를 저하시키고, HDL-cholesterol을 증가시키는 것으로 판정된 갈근 추출물 (PLE)이 실질적으로 간세포에서 cholesterol 대사에 미치는 영향을 규명하기 위하여, 지방 대사를

담당하는 간세포의 유전자 발현을 측정하였다.

Leptin은 에너지균형조절의 주요인자로 ob 유전자 발현으로 나타나는 단백질이다. Leptin은 주로 지방세포에서 분비되며, 지방세포가 커지는 경우 leptin 발현이 증가한다. Leptin은 체지방량 정보를 뇌에 전달하여 식습관과 대사, 내분비 기능 등을 조절한다. Leptin은 acetyl-CoA carboxylase의 유전자발현, 지방산합성, 지질합성을 억제한다고 알려졌다. 또한 시상하부의 leptin 수용체 (Ob-Rβ)는 에스트로겐의 상태에 따라 조절된다. 에스트로겐이 결핍된 경우 leptin 수용체가

Table II. Effect of PLE on serum lipid level of rat with obesity

Goup	Total cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)	HDL-Cholesterol (mg/dl)
NC	53.1±15.7	67.2±9.3	45.5±10.2
OC	81.2±14.2*	121.3±23.1**	33.3±7.8*
PLL	73.6±8.1	110.8±26.3	37.6±8.2
PLH	59.2±11.3#	87.2±24.3#	46.2±9.6#

NC: Normal control

OC: Estrogen-deficient control

PLL: OC + PLE 20 mg/kg/day, P.O. for 6 weeks

PLH: OC + PLE 100 mg/kg/day, P.O. for 6 weeks

PLE: Pueraria lobata extract

*: p<0.05 vs NC, **: p<0.01 vs NC

#: p<0.05 vs OC

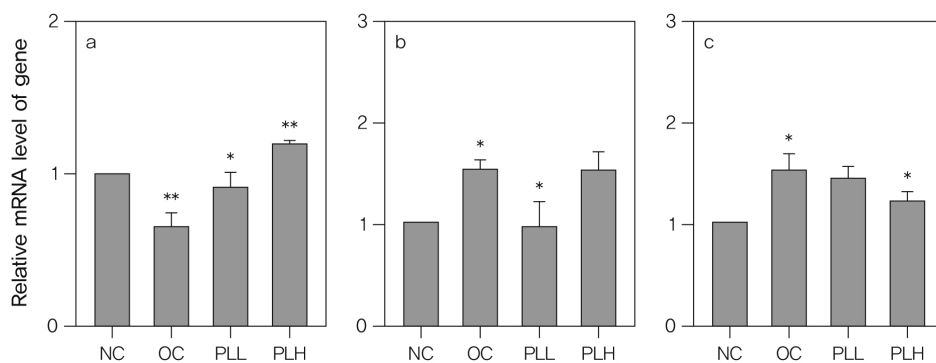


Fig. 2 Effect of PLE on the leptin(a), PPARγ(b), PGC1A(c) gene expression in liver tissue of rat with estrogen deficiency

NC: Normal control

OC: Estrogen-deficient control

PLL: OC + PLE 20 mg/kg/day, P.O. for 6 weeks

PLH: OC + PLE 100 mg/kg/day, P.O. for 6 weeks

PLE: Pueraria lobata extract

** : p < 0.01 vs NC

: p < 0.01 vs OC

: p < 0.05 vs OC

감소되며, 이는 난소 절제 수술 후에 혈청에서 비록 leptin이 증가하지만 비만이 유발되는 원인이 된다¹⁷⁾. 실험결과, 에스트로겐 결핍성 비만 랫드의 간 조직에서 leptin 발현이 억제되었으며, PLE는 간조직에서 leptin 유전자 발현을 증가시켰다(Fig. 2a).

Peroxisome proliferator activated receptors (PPARs)는 지방세포의 분화와 대사에 중요한 조절을 하는 nuclear hormone receptor superfamily에 속한다. PPAR family member로는 PPAR- α , PPAR- γ 와 PPAR- δ 가 있으며 이들 PPAR 전사인자들은 RXR (Retinoid X receptor) α 와 heterodimer을 이루어 표적 유전자의 promotor 또는 enhancer에 존재하는 PPRE (peroxisome proliferator response element)를 인지하고 표적유전자의 발현을 조절해 나간다.⁴⁵⁾ 이 중 PPAR γ 는 비만인 동물의 지방세포에서 분비가 촉진되며 골격근과 지방조직에서 지방산 흡수를 증가시키고 β -oxidation을 촉진하여 지방산 분해를 증가시킨다. 또한, PPAR γ 는 adipose tissue에서의 지방산 산화의 증가 및 지방 축적을 증가시킨다고 알려져 있다.¹⁸⁾ 실험 결과, 에스트로겐 결핍 랫드에서는 정상군에 비해 PPAR γ 발현이 증가되었으며, PLL 투여군에서 PPAR γ 발현이 감소되어 체내 지방 흡수와 축적을 억제하는 것으로 판단되었다(Fig. 2b).

Peroxisome proliferator activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC1A)는 PPAR γ 의 co-activator로 작용한다고 보고되었다.¹⁹⁾ 따라서, 체내 지방 축적을 촉진하는 작용을 한다. 실험 결과, 에스트로겐 결핍 랫드에서는 정상군에 비해 PGC1A 발현이 증가되었으며, PLH 투여군에서 PGC1A 발현이 감소하여 체내 지방을 축적하는 PPAR γ 의 작용을 억제할 것으로 판단되었다(Fig. 2c).

3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA-R)는 cholesterol을 합성하는 과정에서 HMG CoA를 mevalonate로 변환시키는 효소로 콜레스테롤 합성뿐만 아니라 정상 세포 기능에 필수적인 nonsterol isoprenoids를 생성하는 과정의 반응 결정 단계에 해당하는 효소이다²⁰⁾. 이 효소를 억제하는 경우 cholesterol 합성이 억제될 수 있다고 보고되었으며, HMG-CoA-R 활성을 억제하면 고콜레스테롤 증을 치료하는 약물이 개발될 수 있다. 실험 결과, HMG-CoA-R는 에스트로겐 결핍성 비만 랫드에서 발현이 증가하였으며 PLH 투여군은 이 유전자 발현을 억제하여 cholesterol 합성을 억제할 것으로 판단되었다(Fig. 3a).

이와 함께, Sterol Regulatory Element Binding Protein (SREBPs)도 콜레스테롤이나 다른 지방의 합성

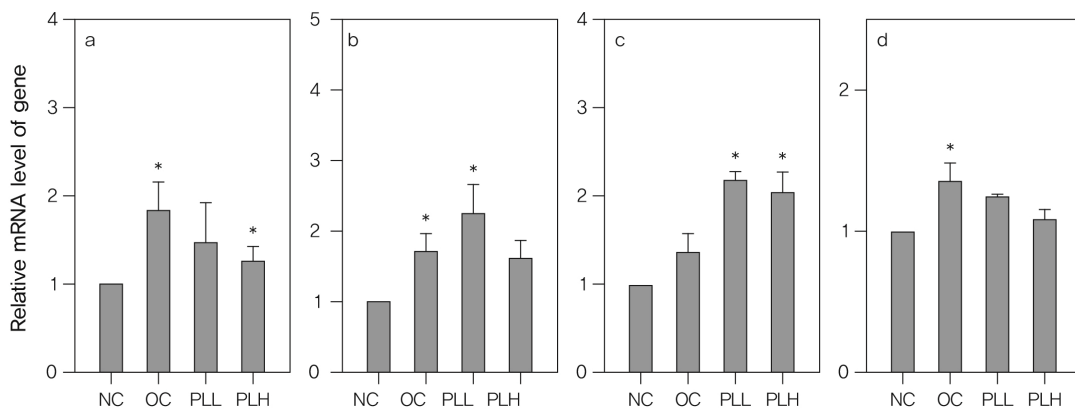


Fig. 3 Effect of PLE on the HMG-CoA-R(a), CYPB1(b), CYT27(c), SREBP1c(d) gene expression in liver tissue of rat with estrogen deficiency

NC: Normal control

OC: Estrogen-deficient control

PLL: OC + PLE 20 mg/kg/day, P.O. for 6 weeks

PLH: OC + PLE 100 mg/kg/day, P.O. for 6 weeks

PLE: Pueraria lobata extract

*: $p < 0.05$ vs NC

#: $p < 0.05$ vs OC

에 관여하는 효소의 유전자 발현을 조절하는 전사인자로서, 에스트로겐이 결핍된 경우 발현이 증가하여 고지혈증을 유발할 수 있다. 이중 SREBP2는 LDL-receptor 뿐만 아니라 콜레스테롤 생합성에 관여하는 HMG-CoA-R와 같은 효소의 합성을 증가시켜 콜레스테롤 합성 및 세포내 흡수를 증가시킨다. 이와는 달리, SREBP1c 는 Acetyl-CoA부터 지방산과 triglyceride (TG)나 phospholipid (PL) 생성에 관련된 효소의 발현을 조절하는 역할을 한다.²¹⁾ 실험 결과, 에스트로겐 결핍 랫드에서 SREBP1c 발현은 정상군에 비해 증가하였다. 그러나, PLL 투여 및 PLH 투여군에서 SREBP1c 발현은 에스트로겐 결핍 랫드군과 별다른 차이를 나타내지는 못했다(Fig. 3d). 따라서, 콜레스테롤 합성에 관련된 효소 발현은 억제하지만 지방산과 TG 합성에 관련된 효소의 발현에는 영향이 없는 것으로 판단되었다.

Cholesterol 12 α -hydroxylase (CYP8B1) 및 cholesterol 27-hydroxylase (CYP27)는 cholesterol 의 분해과정을 통해 cholic acid를 생성하는 효소이다.²²⁻²³⁾ 실험 결과, 에스트로겐 결핍 랫드에서 정상군에 비해 CYP8B1 발현이 증가되었으며, PLL 군에서 에스트로겐 결핍 랫드군에 비해 CYP8B1 발현이 증가되었다(Fig. 3b). 또한, 에스트로겐 결핍 랫드에서 CYP27

발현은 정상군에 비해 별 차이가 없었으나, PLL 투여 및 PLH 투여군에서 CYP27 발현이 증가되어 PLE는 체내 콜레스테롤 분해를 촉진할 것으로 판단되었다(Fig. 3c). 따라서, 같은 추출물 (PLE)은 HMG-CoA-R, SREBP1c 발현을 저해하여 체내 콜레스테롤 합성을 억제하고, CYP8B1 및 CYP27 의 발현을 증가시켜 콜레스테롤 분해를 촉진하여 체내 함량을 낮추는 것으로 판단되었다.

폐경 후 여성 뿐 아니라 동물의 난소를 적출하면 lipoprotein lipase (LPL)이 늘어나 지방세포내 지방이 축적되고 음식섭취가 촉진되어 몸무게가 증가되는데, 에스트로겐의 활성형인 에스트라디올 (E2)를 투여하게 되면 지방축적이 줄어든다.²⁴⁾ 본 연구 결과, 에스트로겐 결핍성 비만에서는 LPL 발현이 증가하였으며, PLE를 투여한 군에서는 발현이 억제되었다. 따라서, PLE는 LPL 발현을 억제하여 비만을 억제하는 것으로 판단되었다(Fig. 4a).

Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT)는 여러 조직의 세포막에 결합된 효소로서 ACAT1과 ACAT2의 2개의 isozyme이 존재한다. 이 효소는cholesterol와 long-chain fatty acyl-CoA 를 이용하여 cholesteryl esters (CE)를 생성하여 세포내

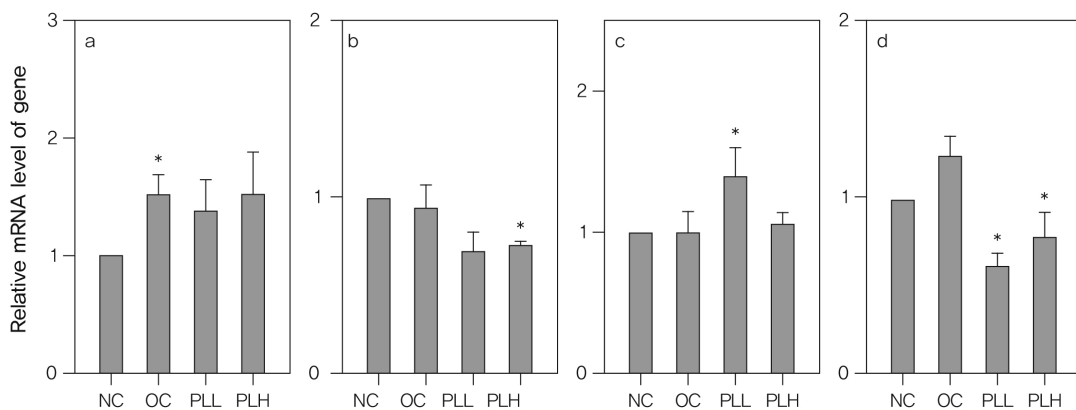


Fig. 4 Effect of PLE on the LPL(a), ACAT1(b) ACAT2(c), APoB(d) gene expression in liver tissue of rat with estrogen deficiency

NC: Normal control
 OC: Estrogen-deficient control
 PLL: OC + PLE 20 mg/kg/day, P.O. for 6 weeks
 PLH: OC + PLE 100 mg/kg/day, P.O. for 6 weeks
 PLE: Pueraria lobata extract
 **: p < 0.01 vs NC
 *: p < 0.05 vs NC
 #: p < 0.05 vs OC

에 저장형태로 바뀌주는데, 대부분의 세포에서 CE의 농도는 매우 낮다. 간 조직의 CE는 VLDL의 형태로 존재하며, steroid 호르몬을 분비하는 조직에서는 호르몬 전구체로 사용된다. 또한, 만성적으로 대식세포에 축적되는 경우 거품세포를 형성하여 초기단계의 동맥경화를 유발하는데 중요한 역할을 한다. 동맥경화나 Alzheimer's disease를 치료하는 약물 개발의 주요 목표가 되고 있다. ACAT1은 cytokine의 일종인 interferon- γ , 강력한 혈관 수축제인 Urotensin II, 합성 glucocorticoid인 dexamethasone와 같이 고혈압이나 동맥경화를 촉진하는 것으로 알려진 물질들에 의해 생성이 촉진된다.²⁵⁾ 그와는 반대로 ACAT1은 항동맥경화 작용이 있는 adipokine인 adiponectin에 의해 발현이 저하된다. 실험 결과, 에스트로겐 결핍 랫드에서 ACAT1 발현은 정상군에 비해 별 차이가 없었으나, PLH 투여군에서 ACAT1 발현이 감소되어 항 동맥경화작용이 있을 것으로 판단되었다.(Fig. 4b)

ACAT2는 ACAT1과 작용은 유사하나 약간 다르게 작용한다. 정상적인 간 조직에서의 ACAT2의 발현은 ACAT1의 약 10% 정도로 상대적으로 미약하나, 간암 세포에서는 ACAT2의 발현이 상대적으로 증가된다고 보고되었다.²⁶⁾ ACAT2의 발현은 ACAT1과는 다르게 전사인자인 Cdx2 와 HNF1 α 의 자극이 필요하다고 알려

져 있다. 실험 결과, 에스트로겐 결핍 랫드에서 ACAT2 발현은 정상군에 비해 별 차이가 없었으나, PLL 투여군에서 ACAT2 발현이 증가되었다.(Fig. 4c) 그러나, 동맥경화 유발인자로 알려진 homocysteine의 증가가 ACAT2 발현 감소로 이어졌다는 보고가 있기 때문에 정확한 기전에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다.

Apolipoprotein B (ApoB)는 lipoprotein의 protein 부분인 apolipoproteins으로 triacylglycerol (TAG) 이나 cholesterol과 결합하여 VLDL, LDL, IDL등을 형성한다. 이들은 (1) lipoprotein에 작용하는 효소의 활성 조절 (2) lipoprotein 구조 유지 (3) 세포 수용체에 리간드로 작용하여 lipoprotein의 세포내 흡수 촉진의 3가지 주요 기능을 나타낸다. 따라서, 동맥경화와 같은 질병을 유발하는 LDL이나 VLDL을 형성하는 기질로서 작용한다²⁷⁾. 실험 결과, 에스트로겐 결핍 랫드에서는 정상군에 비해 ApoB 발현이 증가하는 경향을 보였으며, PLL 투여군 및 PLH 투여군에서 ApoB 발현이 감소하여 동맥경화 예방 효과를 나타내었다.(Fig. 4d)

Acyl-CoA oxidase (ACOX)는 지방산의 beta-oxidation에 관여하는 첫 번째 효소로서 지방대사와 호르몬 생성에 중요한 역할을 한다. 또한, very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase로 알려져 있는 carnitine palmitoyl transferase (CPT)도 지방산의 beta-oxi-

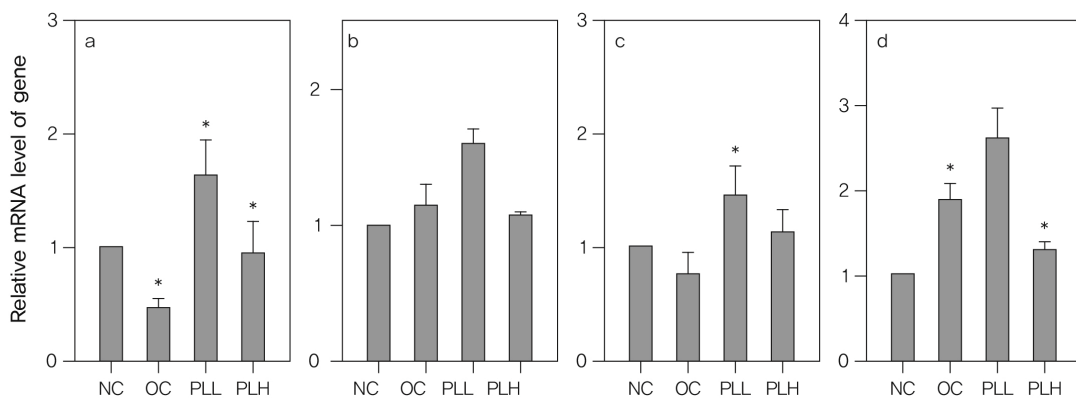


Fig. 5 Effect of PLE on the CPT1(a), ACOX(b), LDLR(c), SCD1(d) gene expression in liver tissue of rat with estrogen deficiency

NC: Normal control

OC: Estrogen-deficient control

PLL: OC + PLE 20 mg/kg/day, P.O. for 6 weeks

PLH: OC + PLE 100 mg/kg/day, P.O. for 6 weeks

PLE: Pueraria lobata extract

** : $p < 0.01$ vs NC

: $p < 0.05$ vs OC

dation 에 관여한다고 알려져 있다.²⁸⁾ 실험 결과, 에스트로겐 결핍 랫드에서 ACOX 유전자 발현은 정상군에 비해 별 차이가 없었으며, PLL 및 PLH 투여군에서도 에스트로겐 결핍 랫드군과 유의적이 차이가 없었다. (Fig. 5b)

LDL-receptor (LDLR)는 콜레스테롤이 풍부한 LDL을 세포내로 수송하여 혈중 LDL-cholesterol을 낮추는 효과를 나타낸다. 유전적으로 이 LDLR이 돌연변이된 경우 혈중 콜레스테롤을 높혀 초기에 관상동맥질환이 발생하는 고콜레스테롤혈증을 일으킨다.²⁹⁾ 실험 결과, 에스트로겐 결핍 랫드에서는 정상군에 비해 LDLR 발현이 억제되는 경향을 보였으나, PLL 투여군에서는 LDLR 발현이 증가하였다. (Fig. 5c)

Stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1)는 포화지방산 (SFA)을 단일불포화지방산으로 변화시키는 효소이다. 세포내에 SCD1의 기질인 SFA이 축적되면 염증반응, 동맥경화, steatohepatitis, 췌장 베타세포 파괴 등으로 비만과 인슐린 저항성이 유발된다.³⁰⁾ 따라서, SCD1은 염증 전구물질인 SFA를 제거하여 염증성 질환들을 억제하는 것으로 알려져 있다. 실험 결과, 에스트로겐 결핍 랫드에서는 정상군에 비해 SCD1 발현이 증가되었으며, PLL 투여군에서는 대조군에 비해 SCD1 발현이 증가하였고, PLH 투여군에서는 감소되었다. (Fig. 5d)

이상의 결과, 같은 추출물인 PLE는 에스트로겐 결핍성 비만 랫드의 체중을 감소시키며, 혈중 총콜레스테롤 함량과 TG 함량을 저하시키며, HDL-cholesterol 함량을 증가시켰다. 이는 PLE가 비만 랫드의 간으로부터 leptin 발현을 증가시키고, PPAR, HMG-CoA-R, ACAT1와 LPL 발현을 감소시켜 콜레스테롤 합성을 억제하고, LDL-R과 CYP8B1의 발현을 증가시켜 콜레스테롤 분해를 촉진시켜 나타난 결과로 사료되었다. 따라서, PLE는 에스트로겐 결핍성 랫드의 체중을 감소시키고 지질대사에 관여하는 단백질의 유전자 발현을 조절하여 갱년기 여성호르몬부족으로 발생하는 비만 및 비만 합병증에 응용될 수 있을 것으로 판단된다.

IV. 결론

같은 추출물 (PLE)이 에스트로겐 결핍 상태에서 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 난소를 적

출하여 유발된 에스트로겐 결핍성 비만 랫드의 체중변화와 혈중 지질대사, 관련효소의 발현 및 랫드의 간의 단백질 발현에 관여하는 유전자 발현을 평가하였다. 실험 결과, 같은 추출물인 PLE는 에스트로겐 결핍성 비만 랫드의 체중을 감소시키며, 고지혈증에 효과적인 것으로 나타났다. 이는 같은 추출물인 PLE가 비만 랫드의 leptin 발현을 증가시키고, PPAR, HMG-CoA-R, ACAT1와 LPL 발현을 감소시켜 콜레스테롤 합성을 억제하고, LDL-R 및 CYP8B1의 발현을 증가시켜 콜레스테롤 함량을 저하시켜 나타난 결과로 사료되었다. 따라서, PLE는 간 조직에서 지질대사에 관여하는 단백질의 유전자 발현을 조절하여 에스트로겐 결핍으로 인해 발생하는 비만 또는 비만 합병증에 효과적인 것으로 판단되었다.

참고문헌

1. Karasu T, Marczylo TH, Maccarrone M, Konje JC. The role of sex steroid hormones, cytokines and the endocannabinoid system in female fertility. *Hum Reprod Update*. 2011; 17(3):347-61.
2. Somogyi V, Gyorffy A, Scalise TJ, Kiss DS, Goszleth G, Bartha T, Frenyo VL, Zsarnovszky A. Endocrine factors in the hypothalamic regulation of food intake in females: a review of the physiological roles and interactions of ghrelin, leptin, thyroid hormones, oestrogen and insulin. *Nutr Res Rev*. 2011;22:1-23.
3. Cooke PS, Naaz A. Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004;229(11):1127-35.
4. Tchernof A, Després JP. Sex steroid hormones, sex hormone-binding globulin, and obesity in men and women. *Horm Metab Res*. 2000; 32:526-36.
5. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):85-97.
6. 정보석, 신민교, 향약대사전, 영림사, 1989;704-706.

7. Chen G, Zhang J, Jiannong Y. Determination of puerarin, daidzein and rutin in *Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Chromatogr A*. 2001;923(1-2):255-62.
8. Wang X, Wu J, Chiba H, Umegaki K, Yamada K, Ishimi Y. *Puerariae radix* prevents bone loss in ovariectomized mice. *J Bone Miner Metab*. 2003;21(5):268-75.
9. Hsu FL, Liu IM, Kuo DH, Chen WC, Su HC, Cheng JT. Antihyperglycemic effect of puerarin in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nat Prod*. 2003;66(6):788-92.
10. Qi W, Weber CR, Wasland K, Savkovic SD. Genistein inhibits proliferation of colon cancer cells by attenuating a negative effect of epidermal growth factor on tumor suppressor FOXO3 activity. *BMC Cancer*. 2011;11(1):219.
11. Kang SC, Lee CM, Choi H, Lee JH, Oh JS, Kwak JH, Zee OP. Evaluation of oriental medicinal herbs for estrogenic and antiproliferative activities. *Phytother Res*. 2006;20(11):1017-9.
12. Mendelsohn, M.E., Karas, R.H. Mechanisms of disease: the protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N. Engl. J. Med*. 1999;340:1801-1811.
13. Rasouli N, Kern PA. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(11 Suppl 1):S64-73.
14. Hsu WY, Chao YW, Tsai YL, Lien CC, Chang CF, Deng MC, Ho LT, Kwok CF, Juan CC. Resistin induces monocyte-endothelial cell adhesion by increasing ICAM-1 and VCAM-1 expression in endothelial cells via p38MAPK-dependent pathway. *J Cell Physiol*. 2011;226(8):2181-8.
15. St Clair RW. Effects of estrogens on macrophage foam cells: a potential target for the protective effects of estrogens on atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 1997;8(5):281-6.
16. Homma H, Kurachi H, Nishio Y, Takeda T, Yamamoto T, Adachi K, Morishige K, Ohmichi M, Matsuzawa Y, Murata Y. Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene. Existence of a unique estrogen response element on the lipoprotein lipase promoter. *J Biol Chem*. 2000;275(15):11404-11.
17. Gao S, Kinzig KP, Aja S, Scott KA, Keung W, Kelly S, Strynadka K, Chohnan S, Smith WW, Tamashiro KL, Ladenheim EE, Ronnett GV, Tu Y, Birnbaum MJ, Lopaschuk GD, Moran TH. Leptin activates hypothalamic acetyl-CoA carboxylase to inhibit food intake. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(44):17358-63.
18. Noh JR, Kim YH, Hwang JH, Gang GT, Yeo SH, Kim KS, Oh WK, Ly SY, Lee IK, Lee CH. Scoparone inhibits adipocyte differentiation through down-regulation of peroxisome proliferators-activated receptor γ in 3T3-L1 preadipocytes. *Food Chem*. 2013;141(2):723-30
19. Gastaldi G, Russell A, Golay A, Giacobino JP, Habicht F, Barthassat V, Muzzin P, Bobbioni-Harsch E. Upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator gene (PGC1A) during weight loss is related to insulin sensitivity but not to energy expenditure. *Diabetologia*. 2007;50(11):2348-55.
20. Jo Y, Debose-Boyd RA. Control of cholesterol synthesis through regulated ER-associated degradation of HMG CoA reductase. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2010;45(3):185-98.
21. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*. 2002;109(9):1125-31.
22. Lundell K, Wikvall K. Species-specific and age-dependent bile acid composition: aspects on CYP8B and CYP4A subfamilies in bile acid biosynthesis. *Curr Drug Metab*. 2008;9(4):323-31.
23. Meir K, Kitsberg D, Alkalay I, Szafer F, Rosen

- H, Shpitzen S, Avi LB, Staels B, Fievet C, Meiner V, Björkhem I, Leitersdorf E. Human sterol 27-hydroxylase (CYP27) overexpressor transgenic mouse model. Evidence against 27-hydroxycholesterol as a critical regulator of cholesterol homeostasis. *J Biol Chem*. 2002; 277(37):34036-41.
24. Khor VK, Dhir R, Yin X, Ahima RS, Song WC. Estrogen sulfotransferase regulates body fat and glucose homeostasis in female mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;299(4):E657-64.
25. Yang L, Yang JB, Chen J, Yu GY, Zhou P, Lei L, Wang ZZ, Cy Chang C, Yang XY, Chang TY, Li BL. Enhancement of human ACAT1 gene expression to promote the macrophage-derived foam cell formation by dexamethasone. *Cell Res*. 2004;14(4):315-23.
26. Song BL, Wang CH, Yao XM, Yang L, Zhang WJ, Wang ZZ, Zhao XN, Yang JB, Qi W, Yang XY, Inoue K, Lin ZX, Zhang HZ, Kodama T, Chang CC, Liu YK, Chang TY, Li BL. Human acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 2 gene expression in intestinal Caco-2 cells and in hepatocellular carcinoma. *Biochem J*. 2006;394(Pt 3):617-26.
27. Contois JH, McConnell JP, Sethi AA, Csako G, Devaraj S, Hoefner DM, Warnick GR. Apolipoprotein B and cardiovascular disease risk: position statement from the AACC Lipoproteins and Vascular Diseases Division Working Group on Best Practices. *Clin Chem*. 2009;55(3):407-19.
28. Poirier Y, Antonenkov VD, Glumoff T, Hiltunen JK. Peroxisomal beta-oxidation—a metabolic pathway with multiple functions. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1763(12):1413-26.
29. Navarra T, Del Turco S, Berti S, Basta G. The lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 and its soluble form: cardiovascular implications. *J Atheroscler Thromb*. 2010;17(4):317-31.
30. Brown JM, Rudel LL. Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 inhibition and the metabolic syndrome: considerations for future drug discovery. *Curr Opin Lipidol*. 2010;21(3):192-7.