



ORIGINAL ARTICLE

The Lipid Efflux Effects of Dichloromethane Extract from *Orostachys japonicus* in 3T3-L1 Adipocyte Cells

Soo-Hwan Kim¹, Hyeong-Seon Lee²¹Department of Biomedical Laboratory Science, Gimcheon University, Gimcheon, Korea²Department of Biomedical Laboratory Science, Jungwon University, Goesan, Korea

3T3-L1 지방세포에 대한 와송 디클로로메탄 추출물의 지질 대사 개선에 관한 연구

김수환¹, 이형선²¹김천대학교 임상병리학과, ²중원대학교 임상병리학과

ARTICLE INFO

Received October 10, 2019
Revised 1st November 12, 2019
Revised 2nd November 25, 2019
Revised 3rd November 25, 2019
Accepted November 26, 2019

Key words

ATP-binding cassette sub-family
A member 1 (ABCA1)
ATP-binding cassette sub-family
G member 1 (ABCG1)
Lipid metabolism
Orostachys japonicus
3T3-L1

ABSTRACT

This study investigated the improved lipid metabolism effect of 3T3-L1 cells induced by adipocytes using the dichloromethane (DCM) fraction in the organic solvent extract of Wassong (*Orostachys japonicus*). To confirm the cell cytotoxicity, each of 6 fractions of organic solvent extracts (EtOH, Hexane, DCM, EtOAc, BuOH, and H₂O) was examined using MTS assay. As a result, it was confirmed that the DCM extract was stable over the whole range of concentrations, and a DCM fraction was used to confirm the improved lipid metabolism effect. Lipid excretion was measured to confirm the change of lipid metabolism. 3T3-L1 cells induced by adipocytes were treated with DCM extract and stained with oil-red O to evaluate lipid accumulation. As a result, it was confirmed that the lipid efflux was significantly improved. In order to confirm the mechanism of lipid efflux, the mRNA expressions of ABCA1 and ABCG1, which are lipid transport proteins, were confirmed by real-time PCR. Therefore, the present study confirmed that the DCM extract from *Orostachys japonicus* has the effect of improving the lipid metabolism on 3T3-L1 adipocytes. In addition, the results of this study will be used as the basis for the development of functional foods using *Orostachys japonicus* and also for conducting research on the detailed mechanisms.

Copyright © 2019 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

서론

현재 우리나라에서 중요하게 인식되는 만성질환인 비만은 동물성식품 섭취, 인스턴트식품 섭취, 외부활동 감소 등으로 인하여 꾸준히 발생하고 있다[1]. 이러한 잘못된 식습관이나 생활습관으로 인하여 비만 뿐 아니라 심혈관계 질환의 발병률도 꾸준

하게 증가하여 주요 사망원인 중 하나가 되어 심각한 사회문제를 일으키고 있다[2, 3]. 국민건강 영양조사에 의하면, 1인당 하루 지방섭취량이 1969년에 비하여 2.8배나 증가한 것으로 보고 하였다[4]. 이러한 식습관의 변화로 인하여 발생하는 심혈관계 질환의 주요원인은 고지혈증으로 알려져 있다[5]. 심혈관계의 주요 원인인 고지혈증을 유발하는 환경적인 요인 중 가장 대표적인 요인은 고지방식이로 알려져 있고, 그중에서도 동물성 지방섭취로 인한 에너지의 과잉으로 비만과 고지혈증, 동맥경화가 발병할 가능성이 높아진다고 설명하고 있다[6]. 고지혈증은 저밀도 단백(low density lipoprotein, LDL) 과 중성지방(triglyceride, TG)농도의 상승, 그리고 고밀도 지단백(high

* Corresponding author: Hyeong-Seon Lee

Department of Biomedical Laboratory Science, Jungwon University, 85 Munmu-ro, Goesan-eup, Goesan 28024, Korea

E-mail: biohslee@jwu.ac.kr

* ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8545-9002>

density lipoprotein, HDL)의 감소, 지질 분해능력의 감소와 같은 지질이상과 함께 발병한다[7]. 고지혈증을 치료, 개선할 수 있는 치료약물이 많이 선보이고 있지만, 이러한 약물들은 심각한 체내 부작용을 일으키는 문제가 있어서 발병 후 치료하는 것 보다는 발병 전에 예방하는 것이 중요하다고 여겨지고 있으며, 이런 예방법 중 하나로 천연물을 이용한 생체 내 대사기능 활성화 및 질병 예방을 할 수 있는 천연물 유래의 기능성식품에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다[8-10]. 또한 천연물 추출물을 활용하여 비만과 고지혈증등을 예방하는 많은 연구가 시도되고 있다[11].

와송(*Orostachys japonicus*)은 바위솔, 작엽하초, 기와솔 등으로 불리는 돌나물과에 속하는 다년생 초본식물로 높은 압박이나 기와지붕에서 서식한다[12]. 한국, 일본, 중국 등 동아시아에 널리 분포하고 있으며 flavonoid [13], fatty acid [14], phenolic [15], triterpenoid 및 sterol [16] 류와 같은 다양한 생리활성 물질을 포함하고 있고, 면역개선[17], 항산화[18, 19], 항균[20] 등의 기능을 가진다고 보고한다. 또한 최근의 연구에서는 와송을 이용한 항암기전과 관련된 연구가 활발히 진행되고 있다[21, 22]. 와송은 많은 생리활성 기능과 약리적 기능을 가진 장점에도 불구하고 생육조건이 까다로워 자연에 자생하는 와송을 보기는 쉽지 않다. 따라서 최근에는 농가에서 재배하려는 노력을 기울이고 있다. 와송을 이용한 비만개선효과 연구는 이전부터 이루어져 왔다. 와송 유기용매 추출물을 이용하여 비만유도 래트에서 비만개선효과를 확인한 연구결과도 보고되고 있다[23]. 하지만 와송 추출물의 동물 모델을 이용한 비만개선 효과에 대한 연구는 비교적 많이 이루어지는 반면, 비만의 주요 원인인 감소된 지질대사의 개선효과에 대한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 실험에서는 지방세포로 유도된 3T3-L1세포에 디클로로메탄(dichloromethane, DCM)으로 추출한 와송 추출물을 처리하여, 전반적인 지질대사 개선 및 콜레스테롤 운반 단백질인 ATP-binding cassette sub-family A member 1 (ABCA1), ATP-binding cassette sub-family G member 1 (ABCG1)의 mRNA활성을 측정하였다. 본 연구를 토대로 와송 추출물을 활용한 지질대사 개선연구의 활성화와 이를 토대로 한 기능성 식품개발에 보탬이 되고자 한다.

재료 및 방법

1. 와송 DCM 추출물 준비

와송은 경상북도 김천시 감문면에 위치한 '김천와송'에서 건조된 건와송을 구입하여 분쇄하였다. 분쇄한 분말을 에탄올

(EtOH)상에서 3시간동안 끓여서 EtOH 추출물을 획득 후, 회전 감압 농축기를 이용하여 추출물의 농축이 이루어 졌다. 농축된 EtOH 추출물은 각각 헥산(Hexane), 디클로로메탄(DCM), 에틸아세테이트(EtoAc), 부탄올(BuOH), 물(H₂O) 순으로 용매 분획별 계통분획 추출을 실시하였다. 그리고 감압농축기를 이용하여 각 분획물을 감압농축한 뒤, 동결건조를 통하여 건조화시켰다. 추출과정에서 생성된 DCM 분획층을 연구에 사용하였다[24].

2. 세포배양

실험에 사용되어진 세포주는 전 지방세포(pre-adipocyte)인 3T3-L1 (Korean cell line bank, Seoul, Korea)을 구입하여 사용하였다. 배양을 위하여 사용된 배지는 RPMI1640 배지 (Gibco, Grand Island, NY, USA)에 10% fetal bovine serum (Gibco), 1% penicillin streptomycin (Gibco)를 섞어서 배양에 사용하였다. 기본적인 세포배양은 37°C, 5%의 탄산가스농도에서 배양하였다.

3. 3T3-L1 전지방세포의 지방세포분화

3T3-L1 지방세포 분화를 위하여 다음의 방법을 활용하였다 [25]. 3T3-L1 전지방세포를 1일간 배양하여 배양접시 바닥에 부착시킨 후, RPMI1640 배지에 10% fetal bovine serum, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthin (IBMX, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), 0.25 μM dexamethasone (Sigma Aldrich), 그리고 10 μM의 insulin (Sigma Aldrich)을 첨가하여 지방세포로의 분화를 유도하였다. 3일간의 배양 후 RPMI1640 배지에 10% fetal bovine serum, 10 μM의 insulin을 첨가하여 다시 3일간 배양하여 지방세포 분화를 완성하였다.

4. 세포독성 확인

분화된 지방세포에서 유기용매 추출물의 세포독성을 확인하기 위하여 MTS assay를 이용하였다. 96 well microplate에 5×10⁴개의 세포를 지방세포로 분화시킨 후, 각각의 유기용매 추출물을 0, 25, 50, 100, 200 μg/mL의 농도로 첨가하여 24시간 배양하였다. 그 후 10% 농도로 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) 시약을 처리하고 37°C에서 2시간 배양하고 Multiskan-go microplate reader (Thermo-fisher, Pittsburgh, PA, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. Oil-red O 염색

세포의 지방축적량을 확인하기 위하여 oil-red O 염색을 이용하여 세포내 지방축적을 측정하였다. 6 well plate에 3×10^5 개의 3T3-L1 세포를 배양하여 지방세포 분화 5일차에 농도 0, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 와송 DCM 추출물을 처리하였다. 분화완료 후 배양액을 제거하고, phosphate buffered saline (Gibco)으로 세척하고 10% formalin (Sigma Aldrich)으로 1시간동안 세포고정을 실시하였다. 60% isopropyl alcohol을 이용해 formalin을 세척하고 60% isopropyl alcohol에 2%의 농도로 녹인 oil-red O solution을 처리하고 10분간 염색을 실시하였다. 증류수로 3회 세척 후, 광학현미경 상에서 지방축적을 측정하였으며, 100% isopropyl alcohol을 사용하여 염색된 지방을 분리 후 Multiskan-go microplate reader를 이용하여 490 nm에서 지방함량을 정량적으로 측정하였다.

6. Real time PCR

세포내 지질배출 기전 확인을 위하여 ABCA1, ABCG1을 mRNA 단계에서 real time PCR을 이용하여 측정하였다. 6 well plate에 3×10^5 개의 3T3-L1 세포를 배양하여 지방세포 분화 5일차에 각각 농도 0, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 와송 DCM 추출물을 처리하였다. 분화 완료 후 배양액을 제거하고 phosphate buffered saline으로 세포 세척 후, TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 mRNA 분리를 실시하였다. TRIzol과 chloroform (Sigma Aldrich)를 넣고 원심분리 후, chloroform층에 추출된 mRNA를 isopropyl-alcohol (Sigma Aldrich)과 ethanol (Sigma Aldrich)을 이용하여 연속적으로 분리, 세척 후 건조하여 RNA pellet을 획득하였다. 추출된 RNA pellet은 260 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 계산하였다. 1 μg 의 total RNA에 oligo (dT)18 primer (Invitrogen)를 넣고 70°C에 10분간 반응하고 AccuPower® RT PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 42°C 60

분, 94°C 5분간 반응하여 dDNA template을 합성하였다. Real time PCR은 합성된 cDNA로부터 primer를 이용하여 증폭, 정량분석을 하기 위하여 실시하였으며 합성된 2 μL 의 cDNA와 18 μL 의 PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher), 각각 1 μL 의 forward primer와 reverse primer를 섞어준 뒤, StepOne™ real-time PCR system (Thermo Fisher)을 이용하여 PCR 분석을 실시하였다 (Table 1) [26, 27]. PCR 조건은 95°C에서 15초 denaturation, 60°C에서 15초간 annealing, 72°C에서 1분간 extend하는 조건으로 실시하였고 정량분석은 Ct 값을 이용하여 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 값을 계산하여 실시하였다.

7. 통계처리

모든 실험은 3회 반복 측정되었으며, 실험 결과는 평균 ± 표준 오차를 구하여 정리하였고, 그룹 간 유의성 ($P < 0.05$) Student's t-test로 확인하였다.

결과

1. MTS assay를 이용한 세포독성 측정

MTS assay를 이용하여 추출물의 유기용매 계통별 세포독성을 확인하였다 (Figure 1). 그 결과 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 EtOH,

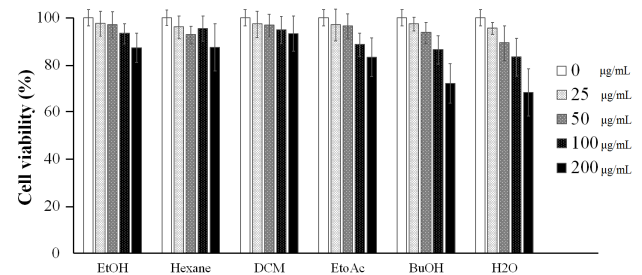


Figure 1. MTS assay of each fraction for 3T3-L1 cell viability. 3T3-L1 preadipocytes were plated at 5×10^4 cells for each wells. Each extracts were treated at 0, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Absorbance was measured at 490 nm.

Table 1. Sequence of primer for real-time PCR

Gene	Primer sequence (5' to 3')	References
ABCA1 (forward)	GGT TTG GAG ATG GTT ATA CAA TAG TTG T	[26]
ABCA1 (reverse)	TTC CCG GAA ACG CAA GTC	
ABCG1 (forward)	AGG TCT CAG CCT TCT AAA GTT CCT C	[27]
ABCG1 (reverse)	TCT CTC GAA GTG AAT GAA ATT TAT CG	
β -actin (forward)	CCG TGA AAA GAT GAC CCA GAT	
β -actin (reverse)	CAC AGC CTG GAT GGC TAC GT	

Hexane, DCM, EtoAc, BuOH, H₂O 전 분획에서 안정적인 세포 생존률을 보여주고 있으나 100, 200 µg/mL에서는 EtoAc, BuOH, H₂O층에서는 세포 생존률이 감소하는 것이 확인되었다. 하지만 EtOH, Hexane, DCM추출물의 경우는 전 농도에 높은 세포생존률이 확인되었으며 그중에서 가장 세포생존률이 안정된 DCM추출물을 이용하여 차후에 이어질 본 실험에 적용하였다.

2. Oil-red O 염색을 이용한 지질축적량 평가

지방세포로 분화된 3T3-L1 세포의 지질축적량을 평가하기 위하여 Oil-red O염색을 실시하였다(Figure 2). 그 결과 DCM추출물이 처리되지 않은 지방세포에서는 세포 전체적으로 붉은 색 색소가 침착이 된 것을 볼 수 있었다. 이는 세포내에 많은 양의 지질이 축적되어 있음을 의미하고 이는 지방세포 분화를 위한 시약처리를 통하여 지방세포가 분화되었음을 의미한다. 그 뒤에 각각 DCM추출물을 25, 50, 100 µg/mL로 처리한 경우에는 붉은색 색소 침착이 줄어들음을 육안 상으로 확인할 수 있었다. 실제로 처리한 DCM추출물의 농도가 높아질수록 붉은색의 축적된 지방이 농도 의존적으로 감소하는 것을 볼 수 있었다. DCM추출물 100 µg/mL처리군에서는 침착색소의 양의 극히 적은

것으로 보인다. 색소의 양을 정량적으로 평가하기 위하여 isopropyl alcohol로 색소를 유리시켜서 흡광도 측정을 실시한 결과(Figure 3), 육안 상으로 관찰했을 때와 마찬가지로 농도 의존적으로 색소의 양이 감소하는 것을 볼 수 있었다. 특히 DCM추출물을 50 µg/mL와 100 µg/mL처리 하였을 때에는 대조군(0 µg/mL)에 비하여 유의적으로 지방의 양이 감소한 것을 보여주고 있다.

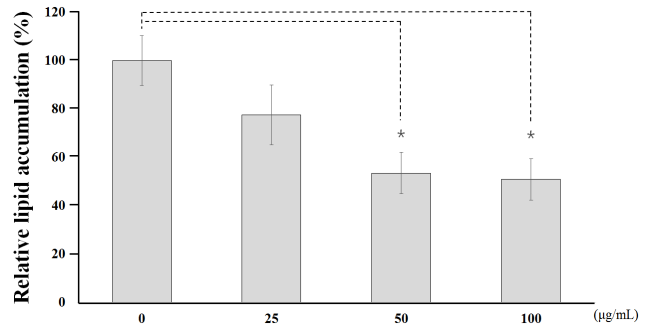


Figure 3. Relative lipid accumulation. 3T3-L1 adipocytes were cultured at 3×10^5 cells for each wells. Absorbance was measured at 490 nm (* $P < 0.05$ compare with 0 µg/mL of DCM extract treated).

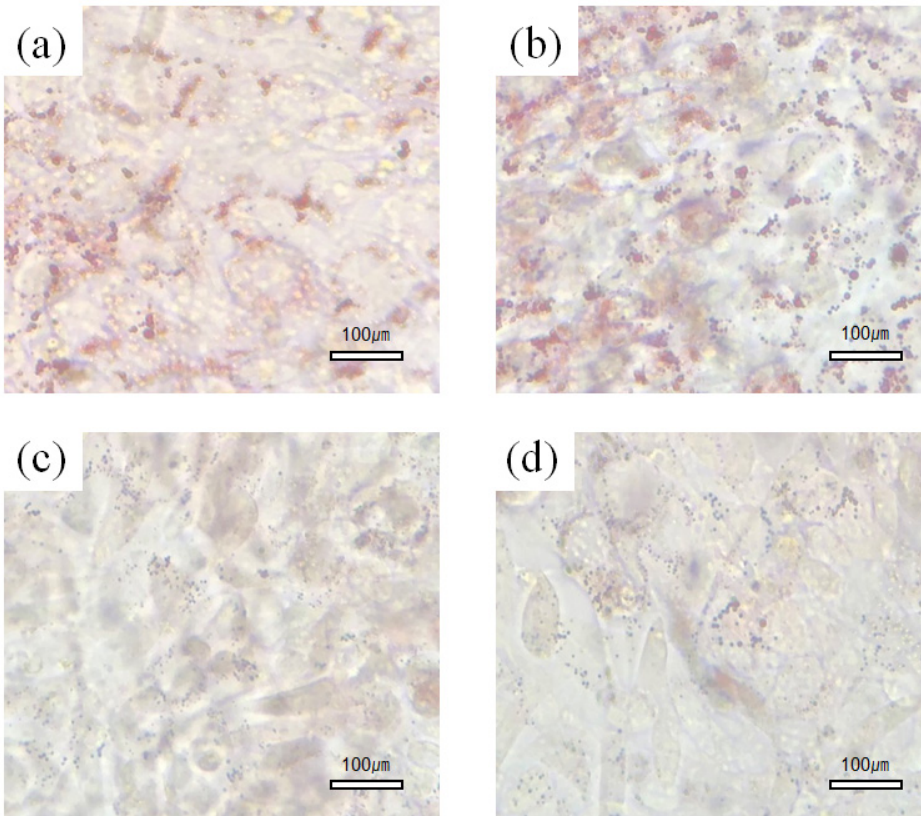


Figure 2. Oil red O staining. 3T3-L1 adipocytes were cultured at 3×10^5 cells for each wells. (a) 3T3-L1 control adipocyte (0 µg/mL), (b) 25 µg/mL of DCM fraction, (c) 50 µg/mL of DCM fraction, (d) 100 µg/mL of DCM fraction. (Scale bar=100 µm).

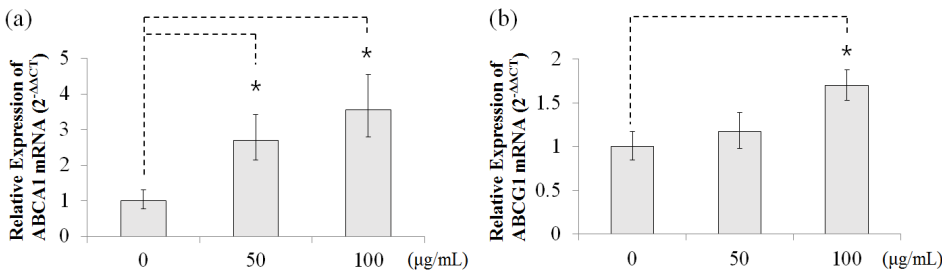


Figure 4. Relative expression of mRNA level. 3T3-L1 adipocytes were cultured at 3×10^5 cells for each wells. Each mRNA relative expression were presented at $2^{-\Delta\Delta CT}$ (a) ABCA1 mRNA expression, (b) ABCG1 mRNA expression (* $P < 0.05$ compare with 0 µg/mL of DCM extract treated).

3. Real-time PCR 분석을 통한 ABCA1, ABCG1 mRNA 측정

ABCA1과 ABCG1 단백질의 mRNA 발현 활성을 real-time PCR로 측정된 결과(Figure 4), ABCA1의 경우 DCM추출물을 50 µg/mL과 100 µg/mL 처리했을 때 모두 mRNA 발현 활성이 유의적으로 증가한 것을 볼 수 있었다. 특히 두 농도 간에서도 농도 의존적인 발현 증가 형태가 보이고 있다. ABCG1의 경우에는 50 µg/mL에서는 유의적인 발현 증가는 나타나지 않았지만 다소간의 발현 증가가 나타나고 있으며, 100 µg/mL에서는 대조군과 비교하여 확연한 발현 증가가 확인되었다. ABCG1의 mRNA 발현 역시 ABCA1과 마찬가지로 농도 의존적인 발현 증가 형태가 관찰되었다.

고찰

본 연구에서는 외송 유기용매 추출물을 이용하여 실제 지방이 축적된 세포내에서의 지질대사 개선효과를 분석하였다. 우선 추출된 외송 유기용매 추출물을 이용하여 실제 3T3-L1 세포에 대한 세포독성 확인을 위하여 MTS-assay를 실시한 결과(Figure 1), 낮은 농도(25, 50 µg/mL)에서는 EtOH, Hexane, DCM, EtoAc, BuOH, H₂O 전 분획에서 안정된 세포 생존률을 보여주고 있었으나, EtoAc, BuOH, H₂O에서는 고농도(100, 200 µg/mL)에서 다소간의 세포독성이 있었던 것으로 확인된다. 이는 각각의 유기용매가 가진 물질 용해의 특성차이에 의한 것으로 실제 유기용매에 의해 추출된 물질차이에 따른 세포독성 차이로 이해된다. 본 MTS-assay를 통하여 EtOH, Hexane, DCM 세가지 추출물에 있어서는 3T3-L1 세포에 대한 전 농도에서 다소 안정된 세포 생존률이 확인 되었으며, 그중에서도 DCM추출물이 가장 세포독성이 적은 것으로 확인 되었으므로, 외송의 DCM 추출물을 이용하여 실제 지질대사 개선효과 및 기전확인을 위하여 선택되어 사용하였다. Oil-red O 염색결과에서는 처리된 외송의 DCM 추출물의 농도에 따라서 농도 의존적으로 축적된 지방량이 감소되는 것이 확인 되었다(Figure 2). 이

는 실제 추출물에 의하여 세포내에 축적되어 된 cholesterol 등의 지방이 추출물의 특정 유효성분에 의하여 세포의 지질배출능이 강화되어 세포내 지질축적량이 감소된 것으로 사료하며, 특히 농도 의존적으로 감소한 결과를 보았을 때 이는 실제 외송의 DCM추출물이 효과가 있었음을 말해준다. 정량적 분석에 있어서도 50 µg/mL, 100 µg/mL의 농도를 처리하였을 때 대조군에 비하여 유의적인 지방축적량 감소가 확인되었으며 이는 해당 농도에서의 현저한 지질배출능 향상을 의미한다(Figure 3). 본 결과를 통하여 외송 DCM추출물의 지질 배출능 향상효과를 확인하였으며, 실제적인 지질배출능 개선효과 분석이 실시되었다. ATP-binding cassette transporter sub-family A member 1 (ABCA1)과 ATP-binding cassette sub-family G member 1 (ABCG1)은 apo-A1에 세포내 축적되어 있던 cholesterol을 제공하여 HDL cholesterol을 형성을 촉진하여 역 콜레스테롤 수송을 증가시켜 거품세포의 형성을 억제할 수 있다고 알려져 있다[28-30]. 또한 ABCA1은 VLDL cholesterol 등에 많이 포함되어 있는 triglyceride 또한 HDL cholesterol을 이용하여 감소시켜 주며, 간세포의 ABCA1을 억제시킨 결과 70% 이상 triglyceride 분비가 증가된 연구결과도 있다[31]. 본 실험에서는 HDL 콜레스테롤 형성을 촉진하고 거품세포의 지질을 배출시켜 줄 수 있는 지질수송체 단백질인 ABCA1과 ABCG1을 mRNA 단계에서 real time PCR을 통하여 측정해 보았다(Figure 4). 그 결과 ABCA1의 경우 50과 100 µg/mL 모두에서 유의적인 활성 증가가 확인되었다. 특히 50과 100 µg/mL DCM추출물 처리군간에 유의적 차이는 아니었지만 농도 의존적인 활성 증가가 보였다. 이는 앞에서 보여줬던 지질배출능의 농도 의존적 활성 증가(Figure 3)와 같은 의미를 지니는 것으로 실제 ABCA1 단백질의 활성 증가로 인한 지질 배출능의 농도 의존적 활성 증가로 해석된다. 또한 ABCG1의 발현 또한 50 µg/mL에서는 의미있는 변화는 볼 수 없었으나 100 µg/mL에서는 유의적인 활성 증가가 관찰되었다. 따라서 외송의 DCM추출물에 의하여 지질 수송 단백질인 ABCA1과 ABCG1 단백질의 활성 증가가 확인되었고 이를 통하여 실제 세포내 축적된 콜레스

테롤형태의 지질들이 세포외로 배출되었음을 의미한다. 본 연구와 같은 방법으로 추출이 이루어진 외송의 DCM 메탄 추출물의 GC-MS분석 결과 추출물에서 campesterol (캠페스테롤) 성분이 다량 함유 되어있음을 보고하였는데[24] 이 캠페스테롤은 주로 약용식물에 포함되어 있는 식물성 콜레스테롤 성분으로 체내 LDL의 농도를 낮춰주어 심혈관계 질환의 위험을 줄여준다는 보고가 있다[32]. 후속연구에서는 단일성분 캠페스테롤을 이용하여 실제 해당성분이 ABCA1과 ABCA1활성에 의한 전반적 지질대사 개선효과에 대한 연구가 필요할 것이다. 본 연구를 통하여 외송의 DCM 추출물의 지방세포로 유도된 3T3-L1세포에 대한 지질배출능 촉진효과가 확인되었다. 현대사회에 많은 사회적 문제와 경제적 문제를 야기하는 비만과 동맥경화, 고지혈증과 같은 지질대사 이상증에 본 연구결과가 도움이 되었으면 한다. 또한 DCM외에 다른 유기용매 추출물도 지질대사 개선에 도움이 되는지 후속연구가 필요하다. 본 연구를 토대로 천연물을 이용한 지질대사 개선을 위한 많은 연구가 활성화되고 효과적인 해결방안이 나왔으면 한다.

요약

본 연구는 외송 유기용매 추출물중 DCM층을 이용하여 지방세포로 유도된 3T3-L1세포에 대한 지질대사 개선효과를 확인하는 연구이다. 세포독성을 확인하기 위하여 MTS-assay를 이용하여 6가지 분획의 외송 유기용매 추출물(EtOH, Hexane, DCM, EToAc, BuOH, H₂O)에 대한 독성검사를 실시하여 세포에 대한 안정성을 확인하였다. 그 결과 DCM추출물이 전 농도에 걸쳐 안정성이 있음을 확인하고, 지질대사 개선효과를 확인하기 위하여 DCM층을 사용하였다. 우선 지질대사 개선효과를 확인하기 위하여 지질 배출능을 측정하였다. 지방세포로 유도된 3T3-L1세포에 대하여 DCM추출물을 처리한 후 oil-red O 염색을 실시하여 지질 축적량을 평가한 결과 지질 배출능이 개선된 것을 확인할 수 있었다. 또한 지질 배출능 분석을 위하여 지질수송 단백질인 ABCA1, ABCG1의 mRNA발현을 real-time PCR로 확인한 결과 DCM추출물 처리 시 유의적인 발현 증가가 나타났음을 확인 하였다. 따라서 본 연구를 통하여 외송 DCM추출물이 3T3-L1 지방세포에 대하여 지질대사 개선효과가 있음을 확인하였다.

Acknowledgements: This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIT) (No.

2017R1C1B5076022).

Conflict of interest: None

Author's information (Position): Kim SH¹, Professor; Lee HS², Professor.

REFERENCES

1. Lee JJ, Park MR, Kim AR, Lee MY. Effect of ramie leaves on improvement of lipid metabolism and anti-obesity effect in rats fed a high fat/high cholesterol diet. *Kor J Food Sci. Technol.* 2011;3:83-90. <http://doi.org/10.9721/KJFST.2011.43.1.083>
2. Lim S, Shin H, Song JH, Kwak SH, Kang SM, Yoon JW, et al. Increasing prevalence of metabolic syndrome in Korea. *Diabetes Care.* 2011;34:1323-1328. <https://doi.org/10.2337/2Fdc10-2109>
3. Ministry of Health & Welfare. Yearbook of health and welfare statistics. Seoul: Report of the Ministry of Health and Welfare; Research report. 2003. p35.
4. Ministry of Health & Welfare. 2014 National health and nutrition examination survey. Sejong: Korea Centers for Disease Control & Prevention; Research report. 2015. p110-112.
5. Krauss RM. Triglycerides and atherogenic lipoproteins: rationale for lipid management. *Am J Med.* 1998;105(1A):S58-62. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(98\)00213-7](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(98)00213-7)
6. Baumer Y, McCurdy S, Weatherby TM, Mehta NN, Halbherr S, Halbherr P, et al. Hyperlipidemia-induced cholesterol crystal production by endothelial cells promotes atherogenesis. *Nat Commun.* 2017;8:1129. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01186-z>
7. Moon SJ. Nutritional problems of Korean. *Kor J Nutr.* 1996; 29:371-380.
8. Mckenny JM. Lipid management: tools for getting to the goal. *Am J Manage Care.* 2001;7(9 Suppl):299-306.
9. Miettinen TA. Cholesterol absorption inhibition: a strategy for cholesterol-lowering therapy. *Int J Clin Pract.* 2001;55:710-716.
10. Shin MK, Han SH. Effects of methanol extracts from bamboo (*Pseudosasa japonica* Makino) leaves extracts on lipid metabolism in rats fed high fat and high cholesterol diet. *Kor J Diet Culture.* 2002;17:30-36.
11. Park JE, Kee H, Cha YS. Effect of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf extract on antiobesity in C57BL/6J mice. *Kor J Food Sci Technol.* 2010;42:586-592.
12. Kim JY, Jung EJ, Won YS, Lee JH, Shin DY, Seo KI. Cultivated *Orostachys japonicus* induces apoptosis in human colon cancer cells. *Kor J Food Sci. Technol.* 2012;44:317-323. <http://doi.org/10.9721/KJFST.2012.44.3.317>
13. Choi SY, Kim JG, Sung NJ. Studies on the physicochemical characteristics and NDMA formation of *Orostachys japonicus* A. berger. *J Kor Soc Food Sci. Nutr.* 2008;21:148-156.
14. Park HJ, Young HS, Kim JO, Rhee SH, Choi JS. A study on the chemical constituents of *Orostachys japonicus* A. berger. *Kor J Pharm.* 1991;22:78-84.
15. Park JG, Park JC, Hur JM, Park SJ, Choi DR, Shin DY, et al. Phenolic compounds from *Orostachys japonicus* having anti-HIV-1 protease activity. *Nat Prod Sci.* 2000;6:117-121.
16. Park HJ, Lim SC, Lee MS, Young HS. Triterpene and steroids from

- Orostachys japonicus*. Kor J Pharm. 1994;25:20-24.
17. Kwon J, Han KS. Effects of *Orostachys japonicus* A. Berger on the immune system. Kor J Med Crop Sci. 2004;12:315-320.
 18. Choi SY, Chung MJ, Sung NJ. Studies on the antioxidative ability of methanol and water extracts from *Orostachys japonicus* A. berger according to harvest times. J Kor Soc Food Sci Nutr. 2008;21:157-164.
 19. Lee SJ, Seo JK, Shin JH, Lee HJ, Sung NJ. Antioxidant activity of wa-song (*Orostachys japonicus* A. Berger) according to drying methods. J. Kor Soc Food Sci Nutr. 2008;37:605-611. <http://doi.org/10.3746/jkfn.2008.37.5.605>
 20. Yoon SY, Lee SY, Kim KBWR, Song EJ, Kim SJ, Lee SJ, et al. Antimicrobial activity of the solvent extract from different parts of *Orostachys japonicus*. J Kor Soc Food Sci Nutr. 2009;38:14-18. <http://doi.org/10.3746/jkfn.2009.38.1.01>
 21. Ryu DS, Baek GO, Kim EY, Kim KH, Lee DS. Effects of polysaccharides derived from *Orostachys japonicus* on induction of cell cycle arrest and apoptotic cell death in human colon cancer cells. BMB Rep. 2010;43:750-755. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2010.43.11.750>
 22. Ryu DS, Lee HS, Lee GS, Lee DS. Effects of the ethylacetate extract of *Orostachys japonicus* on induction of apoptosis through the p53-mediated signaling pathway in human gastric cancer cells. Biol Pharm Bull. 2012;35:660-665. <https://doi.org/10.1248/bpb.35.660>
 23. Kim SG, Choi J, Park HJ, Lee SM, Jung HJ. Anti-hyperlipidemic Effects of the flavonoid-rich fraction from the methanol extract of *Orostachys japonicus* in rats. Kor J Pharmacogn. 2009;40:51-58.
 24. Jeong JH, Ryu DS, Suk DH, Lee DS. Anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Orostachys japonicus* on modulation of signal pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. BMB Rep. 2011;44:399-404. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2011.44.6.399>
 25. Liu F, Kim JK, Li Y, Liu XQ, Li J, Chen X. An extract of *Lagerstroemia speciosa* L. has insulin-like glucose uptake-stimulatory and adipocyte differentiation-inhibitory activities in 3T3-L1 cells. J Nutrition. 2001;131:2242-2247. <https://doi.org/10.1093/jn/131.9.2242>
 26. Adorni MP, Cipollari E, Favari E, Zanotti I, Zimmetti F, Corsini A, et al. Inhibitory effect of PCSK9 on ABCA1 protein expression and cholesterol efflux in macrophages. Atherosclerosis. 2017;256:1-6. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.11.019>
 27. McAlpine CS, Huang A, Emdin A, Banko NS, Beriault DR, Shi Y, et al. Deletion of myeloid GSK3 α attenuates atherosclerosis and promotes an M2 macrophage phenotype. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015;35:1113-1122. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.305438>
 28. Matveev S, van der Westhuyzen DR, Smart EJ. Co-expression of scavenger receptor-BI and caveolin-1 is associated with enhanced selective cholesteryl ester uptake in THP-1 macrophages. J Lipid Res. 1999;40:1647-1654.
 29. Arakawa R, Abe-Dohmae S, Asai M, Ito JI, Yokoyama S. Involvement of caveolin-1 in cholesterol enrichment of high density lipoprotein during its assembly by apolipoprotein and THP-1 cells. J Lipid Res. 2000;41:1952-1962.
 30. Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP, et al. PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. Nat Med. 2001;7:53-58. <https://doi.org/10.1038/83348>
 31. Parks JS, Chung SK, Shelness GS. Hepatic ABC transporters and triglyceride metabolism. Curr Opin Lipidol. 2012;23:196-200. <https://doi.org/10.1097%2FMOLE.0b013e328352dd1a>
 32. Farquhar JW, Sokolow, M. Response of serum lipids and lipoproteins of man to beta-sitosterol and safflower oil. Circulation. 1958;17:890-899. <https://doi.org/10.1161/01.cir.17.5.890>