

산 · 학 · 연 논문

메밀 에탄올 추출물의 항비만 활성

황경아[†] · 황인국 · 황유진 · 조수목 · 송진 · 최정숙

농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부

Anti-Obesity Effect of Buckwheat Ethanol Extract

Kyung-A Hwang[†], In-Guk Hwang, Yu-Jin Hwang, Soo-Muk Cho,
Jin Song, and Jeong-Sook ChoeDepartment of Agrofood Resources, National Institute of Agricultural Sciences,
RDA, Wanju, Jeonbuk 55365, Korea

서론

비만은 지질 변화로 인해 과도한 체지방이 지방세포로 축적된 상태를 말하며, 전 세계적으로 비만 환자의 급증과 더불어 유병률도 꾸준히 증가하고 있다. 특히, 비만은 비만 자체로도 심각한 문제가 되지만, 비만은 제2형 당뇨병, 심혈관 질환 및 특정 유형의 암과 같은 다양한 대사 장애와 관련된 주요 위험인자로 알려지면서 비만 예방 및 치료의 필요성이 대두되고 있다(1,2).

Adipogenesis는 세포형태 변화, 호르몬 변화, 유전자 및 단백질 발현 변화가 일어나는 복합적인 과정이다. 3T3-L1 세포는 지방전구세포로서 다양한 호르몬 및 peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), cytidine-cytidine-adenosine-adenosine-thymidine (CCAAT)/enhancer binding proteins(C/EBPs), sterol regulatory element binding proteins(SREBPs) 등과 같은 지방분화 전사인자에 의해 성숙한 지방구로 분화되면서 세포 내 triglyceride(TG) 축적에 관여하는 다양한 유전자와 효소 활성이 증가된다(3,4). 따라서 이러한 전사인자의 억제제는 지방 축적 억제에서 중요한 기전이 될 수 있다.

메밀(Buckwheat)은 쌍자엽식물의 마디풀과에 속하며, 서늘한 기후와 척박한 땅에서 단기간 생육하는 식물로 세계 곳곳에서 재배되고 있으며, 우리나라에서는 막국수, 메밀부침과 메밀묵 등의 주원료로 소비되었으나, 경제성장에 따라 식생활이 서구화되면서 증가하는 각종 성인병의 예방과 치료에 메밀이 효과가 있다는 연구결과와 함께 메밀의 소비도 증가하고 있다(5).

메밀에 관한 연구로는 발아 메밀, 메밀 새싹, 메밀 껍질 등의 추출물의 항산화, 항염증, 항고지혈증(6-8), 항당뇨(9,10) 등에 관한 연구가 보고되어 있으나, 아직까지 메밀

에탄올 추출물의 지방세포 분화 억제 활성이나 지방세포 분화 조절에 관여하는 유전자 발현 및 작용 메커니즘에 관한 연구는 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 메밀 에탄올 추출물을 이용하여 3T3-L1 지방세포 분화 억제 활성 및 지방분화와 관련 있는 유전자들의 조절에 어떤 영향을 미치는지를 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용된 메밀 에탄올 추출물(buckwheat ethanol extract; BEE)은 제주 유용생물자원추출물은행(Jeju Bio-Resource Extract Bank, Jeju, Korea)에서 구입하여 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin(PS), bovine serum(BS)은 GIBCO/Life Technologies Inc.(Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. Oil Red O(ORO), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), dexamethasone, insulin, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), chloroform, formaldehyde, Dimethyl sulfoxide(DMSO), isopropanol은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 3T3-L1 전지방세포는 ATCC (Manassas, VA, USA)에서 분양받아 사용하였다.

메밀 추출물의 세포독성

메밀 추출물의 세포독성 및 적정처리농도를 결정하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 즉, 3T3-L1 세포를 1×10^4 cells/well로 microplate에 분주하고 메밀 에탄올 추출물을 농도별(50, 100, 200 μ g/mL)로 가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 MTT 용액으로 세포를 염색시킨 후 formazan은 DMSO로 용해시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[†]Corresponding author

E-mail: kah366@korea.kr, Phone: 063-238-3673

지방세포 분화유도

Pre-adipocytes를 adipocytes로 분화시키기 위하여 10% BS와 1% PS가 포함된 배지를 사용하여 confluent 상태까지 배양하였다. Confluent 상태에서 10% FBS 및 1% PS가 포함된 분화배지를 사용하여 2일간 더 배양한 후 10 µg/mL insulin, 0.1 µM dexamethasone 및 0.5 mM IBMX(MDI)가 포함된 분화배지로 교환하여 2일간 배양하였으며, 그 후 2일마다 10 µg/mL insulin이 포함된 분화배지로 교환하였다. 또한, 3T3-L1의 분화억제 정도를 확인하기 위하여 MDI 및 insulin이 포함된 분화배지로 교환할 때 100 µg/mL 메밀 에탄올 추출물을 처리하였다.

Oil Red O staining

지방전구세포 분화 시에 형성된 지방의 함량을 확인하기 위하여 분화 8일째 Oil Red O 염색을 실시하였다. 대조군(control)과 메밀 추출물이 처리된 3T3-L1 세포의 배지를 제거하고 PBS로 세척한 다음 4% formaldehyde 용액으로 30분간 고정하였다. Formaldehyde 용액 제거 후 60% isopropanol을 이용하여 세포를 세척한 다음 Oil-Red-O solution을 처리하여 30분간 상온에서 염색한 후, 증류수로 수세하고 현미경을 이용하여 관찰하였다. 이후 100% isopropanol을 처리하여 세포 지방구에 염색된 Oil-Red-O solution 염색액을 용출하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)에 의한 mRNA 분석

지방 축적 관련 유전자 발현에 메밀 에탄올 추출물이 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위하여 real time PCR을 실시하였다. 세포를 PBS로 세척하고 RNeasy kit를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출된 RNA를 정량한 후, RNA 500 ng과 reverse transcription system kit를 이용하여 cDNA를 합성하였고, real-time reaction은 SYBR Green PCR master mix로 real-time thermal cycler Qiagen rotorgene Q를 이용하여 cDNA를 증폭하였다. 모든 결과는 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)를 internal con-

trol로 사용하여 보정하였으며, 실험에 사용한 primer는 Table 1에 나타내었다.

Statistical analysis

모든 실험 결과는 SPSS ver. 12.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 이용하여 평균(mean)±표준편차(SD)로 나타냈다. 각 실험군의 분석 항목별 통계의 유의성은 Student t-test를 이용하여 $P < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

메밀 추출물의 세포독성

메밀 에탄올 추출물이 3T3-L1 지방전구세포에서 세포독성을 나타내는지 알아보기 위하여 MTT assay를 통하여 세포 생존율을 분석하였다. 50, 100, 그리고 200 µg/mL의 메밀 에탄올 추출물을 24시간 동안 처리한 결과, 메밀 추출물을 처리하지 않은 대조군(CTRL)의 세포 생존율(100%)과 비교하여 각각 97.12%, 95.78%, 그리고 81.18%의 세포 생존율을 보였다(Fig. 1). 메밀 에탄올 추출물 50과 100 µg/mL 농도에서는 소재에 의한 세포 사멸이 나타나지 않음을 확인하였으나, 200 µg/mL 농도로 처리 시 81.18%로 세포 생존하는 것을 확인함에 따라 이후 실험에서는 메밀 에탄올 추출물 농도를 100 µg/mL로 정하여 실험을 진행하였다.

3T3-L1세포에서 메밀 추출물의 adipogenesis 억제 활성

메밀 에탄올 추출물의 3T3-L1 지방전구세포의 지방 세포 분화 및 TG 축적에 미치는 영향을 확인하기 위하여 메밀 에탄올 추출물을 100 µg/mL로 처리한 후 지방전구세포에서 성숙지방세포로 분화를 유도하였다. 분화를 유도한 후 Oil Red O 염색 전후로 구분하여 지방구 생성 정도를 현미경으로 관찰하였다. Oil Red O 염색 결과,

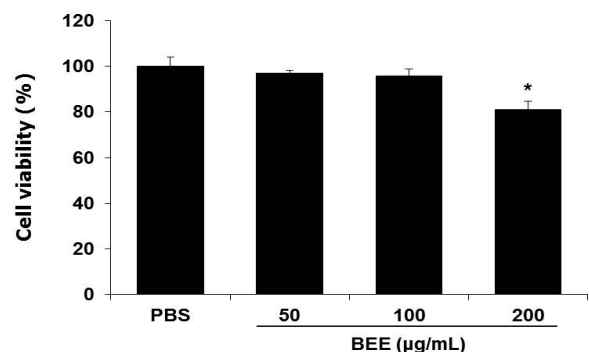


Fig. 1. Effects of buckwheat ethanol extract (BEE) on cell viability in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were treated with various concentrations (50, 100 and 200 µg/mL) of BEE for 24 h. Cell viability was measured by MTT assay. Data are expressed as the mean±SD of 3 replicates. Statistical significance is indicated * $P < 0.05$.

Table 1. 지방 축적 관련 유전자 Primer

Primer		Sequence
GAPDH	F	5'-GTATGACTCCACTCACGGCAAA-3'
	R	5'-GGTGTGGCTCCTGGAAGATG-3'
PPAR γ	F	5'-CGCTGATGCACTGCCTATGA-3'
	R	5'-AGAGGTCCACAGAGCTGATTCC-3'
C/EBP α	F	5'-AGGTGCTGGAGTTGACCACT-3'
	R	5'-CAGCCTAGAGATCCAGCGAC-3'
Fas	F	5'-CTGAGATCCCAGCACTTCTTGA-3'
	R	5'-GCCTCCGAAGCCAAATGAG-3'
aP2	F	5'-CATGGCCAAGCCCAACAT-3'
	R	5'-CGCCAGTTTGAAGGAAATC-3'

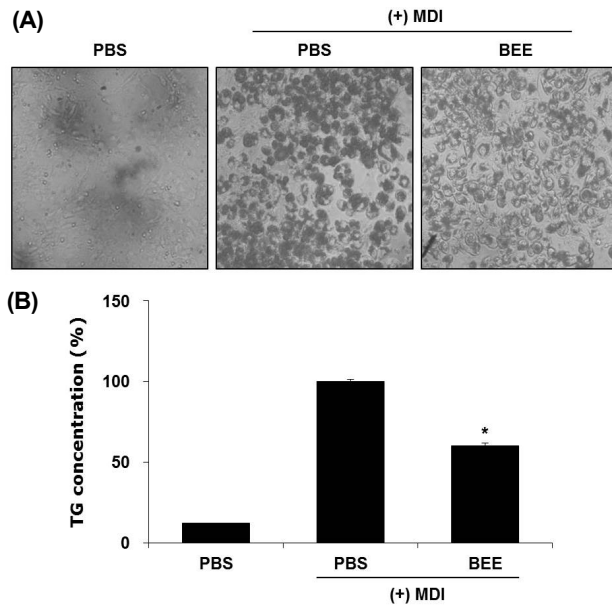


Fig. 2. Effect of buckwheat ethanol extract (BEE) on adipocytes differentiation in 3T3-L1 cells. (A) Lipid accumulation was measured by Oil Red O staining. (B) Post-confluent 3T3-L1 cells treated with 100 μ g/mL of BEE during adipocyte differentiated for 8 days and then the stained lipid accumulation content was quantified by measuring absorbance. Data are expressed as the mean \pm SD of 3 replicates. Statistical significance is indicated * P <0.05.

지방세포 분화를 유도한 대조군(control)에서는 다량의 지방이 축적되었음을 관찰할 수 있었으며, 메밀 에탄올

추출물 처리 시 3T3-L1 세포의 지방세포 분화를 억제함을 확인하였다(Fig. 2A). 염색을 통한 중성지방 축적 억제를 확인한 후 계속적으로 축적된 중성지방의 정량적 분석평가를 실시한 결과, 염색결과와 동일한 경향의 결과로서 control군에서 normal군 대비 중성지방이 8.2배 증가하는 것을 확인하였고, 메밀 추출물 처리 시 중성지방 축적이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 2B).

메밀 추출물의 지방 축적 관련 유전자 발현 억제 효과

메밀 추출물에 의한 지방 축적 억제 효과가 어떠한 작용기전에 의해 유도되는지 확인하기 위해 지방 축적 관련 유전자 PPAR γ , C/EBP α , Fas 그리고 aP2 유전자 발현량을 측정하였다. 그 결과, 지방 축적 관련 유전자 모두 메밀 에탄올 추출물 처리 시 발현이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

지방전구세포에서 지방세포로 분화되는 과정에는 여러 종류의 adipogenic factor들이 관여하고 지방세포 특이적 유전자들의 발현이 유도된다고 알려져 있으며, 그중에서도 중추적인 역할을 담당하고 있는 전사인자로는 PPAR γ 와 C/EBP α 가 있다(11,12). 또한, PPARs가 지방산 합성, 이동, 저장과 에너지 소비와 관련된 유전자의 전사를 매개하는데 이와 관련된 adipogenic marker로 Fas, aP2 등이 있으며, Fas는 지방을 생성하는 효소로써 중성지방을 합성하고 세포질에 저장하는 역할을 한다고 알려져 있다(13,14). 지방세포 분화 마지막 단계에 발현되는 유전자로 알려진 aP2는 지방산 합성, 이동, 저장 및 에너

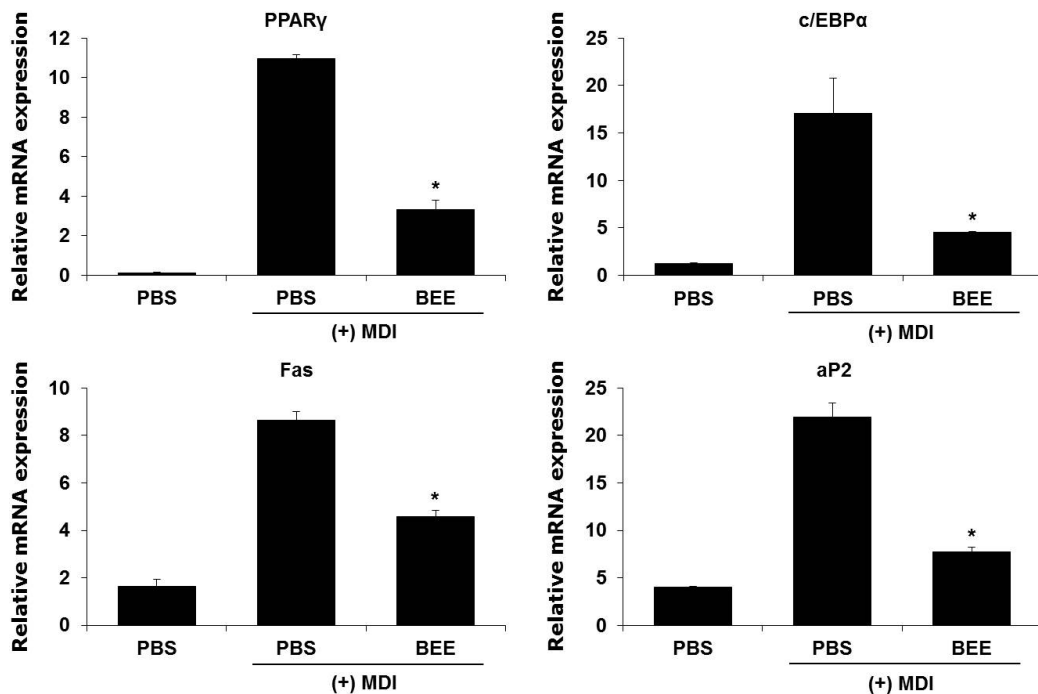


Fig. 3. Effects of buckwheat ethanol extract (BEE) on expression of adipogenic genes in 3T3-L1 cells. Post-confluent 3T3-L1 cells treated with 100 μ g/mL of BEE during adipocyte differentiated for 8 day. PPAR γ , C/EBP α , Fas and aP2, mRNA expression were evaluated by the quantitative real-time PCR. Data are expressed as the mean \pm SD of 3 replicates. Statistical significance is indicated * P <0.05.

지 소비에 관여하는 것으로 보고되고 있다(15).

이상의 결과를 살펴볼 때, 메밀 추출물은 지방전구세포에서 분화를 유도하는 전사인자인 PPAR γ 및 C/EBP α 의 발현을 억제함으로써 adipogenic marker인 Fas, aP2의 발현을 억제시키고, 이들 유전자 발현 감소가 지방구 생성을 감소시켜 지방세포로의 분화를 억제시킬 수 있을 것으로 추정된다. 따라서 메밀 추출물은 3T3-L1 지방세포의 분화와 성장, 지방축적을 억제하며 lipid 생성에 관여하는 유전자 발현 억제효과를 나타내므로 향후 항비만 기능성 소재로서의 활용이 가능할 것이라고 생각한다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ012573072017)의 지원에 의해 수행되었으며, 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Hursting SD, Hursting MJ. 2012. Growth signals, inflammation, and vascular perturbations: mechanistic links between obesity, metabolic syndrome, and cancer. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 1766-1770.
- Kopelman PG. 2000. Obesity as a medical problem. *Nature* 404: 635-643.
- Morrison RF, Farmer SR. 2000. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr* 130: 3116S-3121S.
- Ntambi JM, Kim YC. 2000. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 130: 3122S-3126S.
- Kim BR, Choi YS, Lee SY. 2000. Study on bread-making quality with mixture of buckwheat-wheat flour. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 241-247.
- Kang HW. 2014. Antioxidant and anti-inflammation effects of water extract from buckwheat. *Korean J Culinary Res* 20: 190-199.
- Wang M, Liu JR, Gao JM, Parry JW, Wei YM. 2009. Antioxidant activity of tartary buckwheat bran extract and its effect on the lipid profile of hyperlipidemic rats. *J Agric Food Chem* 57: 5106-5112.
- Choi I, Seog H, Park Y, Kim Y, Choi H. 2007. Suppressive effects of germinated buckwheat on development of fatty liver in mice fed with high-fat diet. *Phytomedicine* 14: 563-567.
- Yao Y, Shan F, Bian J, Chen F, Wang M, Ren G. 2008. D-chiro-inositol-enriched tartary buckwheat bran extract lowers the blood glucose level in KK-A y mice. *J Agric Food Chem* 56: 10027-10031.
- Kim DW, Hwang IK, Lim SS, Yoo KY, Li H, Kim YS, Kwon DY, Moon WK, Kim DW, Won MH. 2009. Germinated Buckwheat extract decreases blood pressure and nitro-tyrosine immunoreactivity in aortic endothelial cells in spontaneously hypertensive rats. *Phytother Res* 23: 993-998.
- Ahn EK, Lee JA, Seo DW, Hong SS, Oh JS. 2012. 1 β -hydroxy-2-oxopomolic acid isolated from *Agrimonia pilosa* extract inhibits adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Biol Pharm Bull* 35: 643-649.
- Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. 2001. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway. *Genes Dev* 16: 22-26.
- Sul HS, Wang D. 1998. Nutritional and hormonal regulation of enzymes in fat synthesis: studies of fatty acid synthase and mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase gene transcription. *Annu Rev Nutr* 18: 331-351.
- Schmid B, Rippmann JF, Tadayyon M, Hamilton BS. 2005. Inhibition of fatty acid synthase prevents preadipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 328: 1073-1082.
- Haunerland NH, Spener F. 2004. Fatty acid-binding proteins-insights from genetic manipulations. *Prog Lipid Res* 43: 328-349.