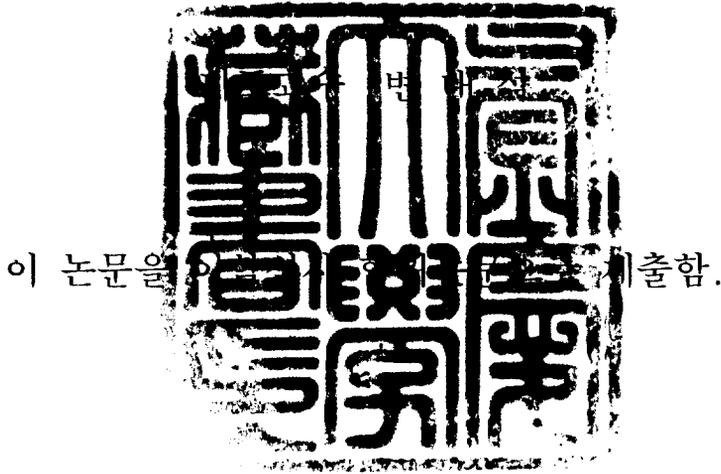


이학석사 학위논문

3T3-L1 아지방세포의 분화에 미치는
anthocyanins의 영향



2006년 2월

부경대학교 대학원

식품생명과학과

조 연 지

조연지의 이학석사 학위논문을 인준함

2005년 12월 19일

주 심 약학박사
위 원 이학박사
위 원 의학박사

최 재 수
김 형 락
변 대 석



목 차

Abstract	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	16
1. 재료	16
2. 실험방법	19
1) 3T3-L1 배양	19
2) 세포독성 실험	20
3) Oil Red O Staining	20
4) Triglycerides 측정	21
5) RNA 분리	22
6) Real-Time RT-PCR	22
7) Western Blot	23
III. 결과 및 고찰	27
1. Anthocyanins에 의한 3T3-L1 아지방 세포 증식저해	27
2. Oil red O 염색	31
3. Anthocyanins에 의한 3T3-L1 지방세포의 TG 축적 저해효과.....	37
4. Anthocyanins에 의한 전사인자 발현 억제	40
5. SREBP-1 단백질 발현에 있어서의 anthocyanin의 효과	53
IV. 참고 문헌	57

Effect of anthocyanins on the differentiation
of 3T3-L1 preadipocytes.

Yun-Ji Jo

Department of Food and Life Science, Graduate school,
Pukyong National University

Abstract

Anthocyanins are responsible for the red, purple, and blue colors of many fruits, vegetables, cereal grains, and flowers. They have anticancer, antioxidative and antiinflammatory activities. In this study, 3T3-L1 cells were treated with anthocyanins in order to examine its antiadipogenic activities. Anthocyanins were non-cytotoxic up to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in undifferentiated 3T3-L1 preadipocytes. When anthocyanins were added to 2 day postconfluent 3T3-L1 preadipocytes at the induction of differentiation, cellular triglyceride accumulation was suppressed in a dose-dependent manner. Anthocyanins dose-dependently reduced expression of transcription factors related to adipogenesis such as sterol regulatory element binding protein-1c, peroxisome proliferator-activated receptor γ , and CCAAT/enhancer binding protein- α . Furthermore, expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA was suppressed over the concentration of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anthocyanins, however, adipocyte-specific fatty acid binding protein mRNA was not changed by 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of anthocyanin treatment. Anthocyanins also dose-dependently decreased protein expression levels of 125 kDa SREBP-1. These results demonstrated that anthocyanins inhibited differentiation of 3T3-L1 preadipocytes and decreased triglyceride accumulation of mature 3T3-L1 adipocytes. Thus,

anthocyanins might be an important natural functional compound in the prevention of obesity.

1. 서론

최근 산업 발달과 소득의 증대로 식생활이 개선되고 있으며 산업발달 따른 생활의 편리성의 증대로 사람들의 육체적 노동은 감소되고 있는 실정이다. 2004년도 국민건강영양조사에 따르면 우리나라 20세 이상 성인의 30.6%가 과체중 또는 비만 (BMI: 25 이상)이며 전세계적으로 1억명 이상이 과체중이며 300만명 이상이 비만으로 그 추세가 날로 증가되고 있다 (보건복지부, 2001). 특히 한국의 식생활문화가 과거 채식 위주에서 육식위주로 변화되면서 고열량의 식단으로 변화되고 있으며, 운동량의 감소로 인한 비만이 주된 원인으로 분석되고 있다.

비만에 대한 정의는 여러 가지가 있으나 체내에 지방이 과다하게 축적된 상태로서 신체질량지수 (Body Mass Index (BMI): 체중 (kg)을 신장 (m)의 제곱으로 나눈 수치)가 25 kg/m²을 넘는 경우, 체지방양이 남자의 경우 체중의 25% 이상, 여자의 경우 체중의 30% 이상인 경우로 정의되고 있다. 비만은 인슐린 저항성, 심장병, 당뇨병, 뇌졸중, 고혈압 등의 여러 대사증후군 질환들의 원인이 되고 있다 (Solomon et al., 1997). 이러한 성인병 예방을 위하여

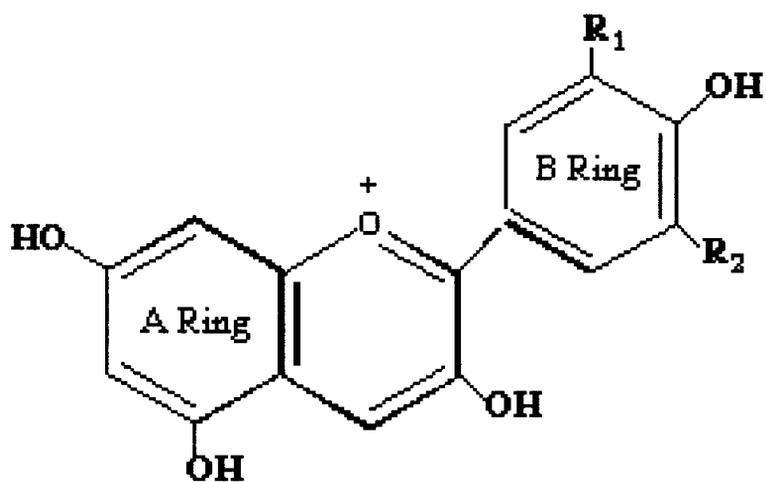
극도의 비만에 대한 긴급치료가 필요한 경우 약물요법이 사용되고 있으나, 화학요법의 경우 환자에게 주는 부담이 크다는 단점을 가지고 있기 때문에 식이요법을 통한 비만 치료 및 예방에 효과적인 식품에 대한 관심과 더불어 식품 성분의 기능성에 대해 많은 연구가 진행 되고 있다 (Noh., 2002).

Phytochemicals이란 식물에 존재하는 화합물로서 특히, 건강을 증진하고 질병을 예방하는 효과가 있는 생리활성물질로서 크게 carotinoids (α -carotene, β -carotene, capsaicin, lycopene, lutein), 함황 화합물 (allenes, allicin, sulfur allyl) 및 polyphenols (catechin, anthocyanin, isoflavone, tannin)로 대별된다. 방향족 히드록시화합물 가운데 벤젠고리 (C_6H_6)의 수소 중 두 개 이상 수산기 (OH)로 치환된 물질을 polyphenols이라고 하며, 녹차에 들어 있는 catechins, 커피에 포함되어 있는 chlorogenic acid, 딸기, 가지, 포도, 검은콩, 팥 등의 anthocyanins계 색소 등은 모두 polyphenols 화합물이다. 6종의 flavonoids (genistein, morin, naringenin, plargonodin, quercetin)를 산화된 LDL에 처리한 결과 lipid peroxides, malonaldehyde (MDA)의 생성이 저해되고 산화가 시작되기 전까지의 시간인 유도시간이 길어졌음을 확인할 수 있었으며 이로써

flavonoids가 아테롬성 동맥경화증을 개선시키는데 효과가 있다고 보고하였다 (Safari et al., 2003). 또한 Harmon et al. (2002)은 flavonoids의 한 종류인 genistein이 CCAAT/enhancer binding proteins β (C/EBP β)의 tyrosine 인산화를 억제함으로써 adipogenesis를 저해한다고 보고하였고, genistein을 rat adipocytes에 1 mM의 농도로 처리하였을 때 lipogenesis는 84% 감소하였고 lipolysis는 200% 증가함으로써 지방세포에서 지방 축적을 줄이는 효과가 있다고 보고하였다 (Szkudelska et al., 2000). 특히, 적포도주에 들어 있는 polyphenols은 간세포 내 콜레스테롤 에스테르와 유리 콜레스테롤양, 간의 지단백 marker인 apoprotein B100 (apoB 100)의 발현을 저하시킴으로써 cardiovascular disease (CVD)의 발병을 줄일 수 있다고 보고하였다 (Pal et al., 2003). 또한 적포도주의 polyphenols이 유방암 세포인 T47D, MCF-7과 MDA-MB-231의 증식을 저해함으로써 항암성이 있다고 보고하였다 (Damianaki et al., 2000).

Polyphenols 화합물에 속하는 anthocyanins은 식물의 꽃, 과일, 잎, 줄기 및 뿌리에 존재하는 선명한 적, 자, 청의 색소이며 넓은 의미에서는 flavonoids

계 색소에 속한다. Fig. 1은 anthocyanins의 기본적인 화학구조를 나타낸 것인데 R₁과 R₂의 종류에 따라 delphinidin, malvidin, peonidin, pelargonidin, cyanidin 및 petunidin으로 명명된다. Anthocyanins은 식물체에서는 주로 액포 내에 용재하는데 주로 당과 결합한 상태인 배당체로 존재하며 산, 알칼리, 효소 등에 의해 쉽게 가수분해되어 aglycone인 anthocyanidins과 당류로 분리된다. Anthocyanins은 콩류, 곡식류, 과일, 야채, 적포주 등에 많이 존재하며 항암성, 항염증성, 항산화능, 항비만 등의 기능이 있다 (Tsuda et al., 2004). 보라색 고구마에서 추출한 anthocyanins의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical제거능 실험을 통해 anthocyanins의 항산화능을 보고하였으며 (Kano et al., 2005), Muscadine 포도에서 분리한 페놀 화합물을 대장암 세포인 HT-29와 Caco-2에 처리해 항암성을 관찰한 결과 anthocyanins이 일으키는 DNA fragmentation이 flavonols와 phenolic acids보다 2~4배 더 높아 항암성이 높은 것으로 보고하였다 (Yi et al., 2005). 또한 흰색 지방조직의 지방세포 실험을 통해 cyanidin-3-O-β-D-glucoside가 비만을 상당히 저해하고 고혈당증 또한 경감시켰다고 보고하였다 (Tsuda et al., 2003). Delphinidin-3-glucoside,



delphinidin	$R_1=R_2=OH$	pelargonidin	$R_1=R_2=H$
malvidin	$R_1=R_2=OCH_3$	cyanidin	$R_1=OH, R_2=H$
peonidin	$R_1=OCH_3, R_2=H$	petunidin	$R_1=OCH_3, R_2=OH$

Fig. 1. Basic chemical structures of the major anthocyanidins

cyanidin-3-galactoside, pelargonidin-3-galactoside, anthocyanidins, cyanidin, delphinidin, pelargonidin, malvidin와 같은 anthocyanins을 쥐의 췌장 β -세포에 처리했을 때 인슐린 분비능이 증가됨으로써 anthocyanins이 제2형 당뇨병의 치료와 예방에 있어서 효과가 있을 것이라고 보고하였다 (Jayaprakasam et al., 2005). Mouse 배아에서 유래된 3T3-L1 아지방 세포는 섬유 아세포 형태를 나타내지만 단일 층의 confluent 상태가 되면 세포끼리 접촉으로 인하여 G_0/G_1 의 성장이 중지된다 (Harmon et al., 2001). 3-isobutyl-1-methylxanthine, dexamethasone 및 insulin (MDI)처리를 하고 이를 동안 배양하면 아지방 세포는 다음 세포주기인 G_1/S 로의 진입과 동시에 분화되기 시작한다 (Green et al., 1974; Rubin et al., 1978). Fig. 2는 아지방 세포에 MDI를 처리한 후 adipogenesis에 관여하는 여러 전사인자를 나타낸 것이다. 분화 초기에 아지방 세포는 2~3개의 유사핵분열과정을 거치게 된다 (Bernlohr et al., 1985; Cornelius et al., 1994). G_1 에서 S 기로의 진행은 망막모세포종의 단백질인 Rb의 인산화를 통해서 조절이 되는데 retinoblastoma protein (Rb)의 인산화는 전사인자와의 결합을 끊게 함으로써 G_1/S 로 진행되게 한다. 이러한 Rb가 C/EBP

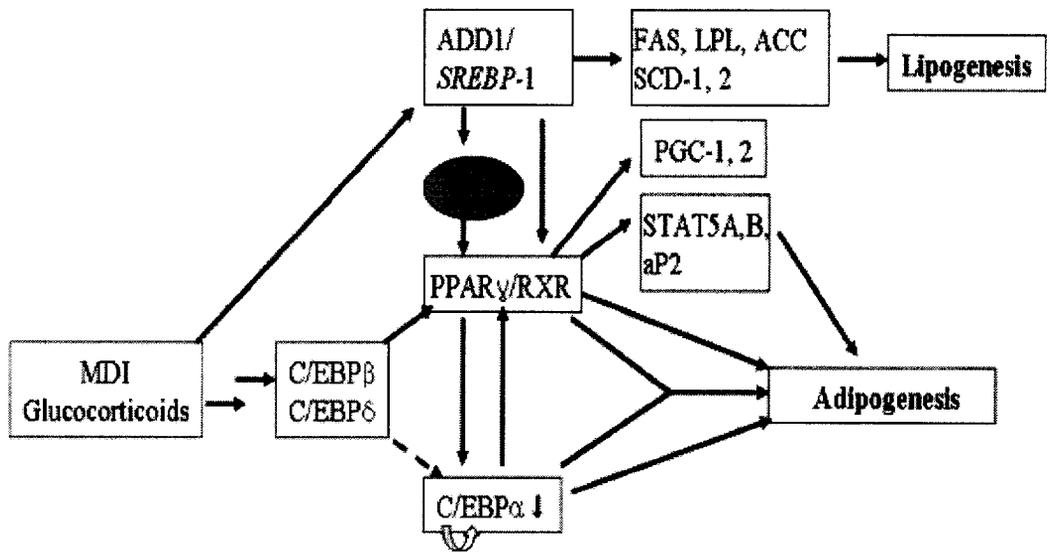


Fig. 2. A model of the transcriptional cascade leading to adipogenesis

족의 전사인자와 결합되어 작용한다고 알려져 있으며 C/EBPs는 지방세포의 분화에 있어서 중요한 전사인자로서 이량체를 형성할 수 있는 기능을 가진 류신 지퍼 결합 영역과 기본적인 DNA 결합 영역을 C말단에 가지고 있으며 C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ 및 C/EBP ζ 가 지방조직에서 발현된다 (Darlington et al., 1998; Rangwala et al., 2000). MDI로 분화를 유도시키면 4시간 이내에 C/EBP β 와 C/EBP δ 가 유도되어 C/EBP β/δ heterodimer를 형성하게 되고, peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)와 C/EBP α 를 활성화시킨다 (Cao et al., 1991; Yeh et al., 1995; Tang et al., 1999). C/EBP α 는 항핵유사분열기능을 가지며 활성화된 PPAR γ 와 결합한다 (Tang et al., 1999). 이러한 전사인자들의 활성화는 adipin, adipocyte-specific fatty acid binding protein (aP2), stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1), glucose transporter-4 (GLUT-4), phsphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), leptin, CD36, insulin receptor 등과 같은 지방세포 특이 유전자들을 활성화시킨다 (Hawang et al., 1996; Ross et al., 1990; Mckeeon et al., 1991). PPAR γ 는 또한 retinoid X receptor (RXR)과도 이량체를 형성하는데 lipoprotein lipase (LPL), PEPCK,

acetyl CoA carboxylase (ACC)와 같은 지방세포 특이유전자를 활성화시킨다 (Rangwala et al., 2000). Insulin에 의해 C/EBP α 의 mRNA 발현 수준이 증가되는데 3T3-L1 아지방 세포에 MDI를 처리하여 분화 유도를 시키면 C/EBP β 와 C/EBP δ 는 MDI를 처리한 직후부터 2일 때까지 증가하고 C/EBP β 는 1.6배 이상 증가한다. PPAR γ_2 와 C/EBP α 는 분화 유도시킨 후 4일째부터 급격히 증가하며 C/EBP α 는 50배 이상 증가하고 PPAR γ_2 는 40배 이상 증가하는 것으로 보고되고 있다 (Kim et al., 1998; Yagi et al., 2004).

지방세포 특이 유전자 중 sterol regulatory element binding proteins (SREBPs)는 helix-loop-helix를 가진 류신 지퍼 전사인자로서 SREBP-1a, -1c 및 2가 있으며 cholesterol, fatty acid, TG, phospholipid 및 LDL receptor의 생산과 흡수에 관련된 유전자를 조절하는 전사인자이다 (Brown et al., 1997; 1998; Spiegelman et al., 1998). SREBPs는 막 결합 단백질로서 소포체 막 단백질 내부에서 불활성화 상태의 전구체로 합성이 된다. 이 전구체는 bHLH-Zip 영역을 가지고 있는 NH₂-말단과 조절기능을 갖는 590-aa의 COOH-말단 영역으로 구성되어 있으며 NH₂-말단은 막과의 결합이 분해되어 핵 형태 (nSREBP)로

핵 속으로 들어가서 목적유전자들을 전사 활성화시킨다. 활성화형태의 nSREBP와 막과의 결합이 분해되기 위해서는 두 단계의 연속적인 분해가 필요하며 초기에는 COOH-말단 영역이 SREBP cleavage activating protein (SCAP)과 결합하며 소포체에서 콜레스테롤이 부족하게 되면 SCAP은 스테롤의 부족을 감지하여 SREBPs를 소포체에서 두 종의 단백질 분해 효소가 있는 골지체로 이동시킨다 (Goldstein et al., 2002). Site-1과 Site-2 단백질 분해효소의 연속적인 작용에 의해서 SREBPs와의 결합이 분해되어서 골지체와 결합하게 된다 (Horton et al., 2002). 활성화된 SREBPs는 핵 내로 이동하여 세포 내 콜레스테롤, 인지질, TG를 증가시키는 유전자들을 활성화시키게 된다. SREBP-1a와 -1c는 TG와 인지질, 지방산 합성에 관여하는 유전자들을 활성화시키며 SREBP-2는 콜레스테롤 합성과 LDL receptor의 활성화에 관여한다 (Horton et al., 1998). SREBPs의 mRNA와 단백질 발현은 insulin에 의해 증가되며 (Sewter et al., 2002; Nadeau et al., 2004), 비만이나 제2형 당뇨병과 같이 insulin 저항성이 있는 상태에서는 SREBP-1의 발현 수준이 낮는데 이것은 지방세포에서 분비되는 TNF- α 가 SREBPs의 조절을 악화시키기 때문인 것으로 보고되고 있다

(Sewter et al., 2002). 지방세포 특이 유전자인 PPARs는 핵에 존재하는 호르몬 수용체의 한 종류이며 지질, 포도당 대사 및 에너지 항상성과 관련된 유전자를 조절하는 전사인자로서 PPAR α , β , γ 및 δ 의 네 종류가 있다. PPAR α 는 간, 신장, 갈색지방조직, 근육, 심장에서 주로 발현이 되어 막을 통한 지방산의 이동, 지방산 산화 등과 같이 간에서 지방산의 분해를 조절하고 PPAR β 는 많은 조직에서 발현되지만 장, 신장, 심장 등과 같은 곳에서 특히 높게 발현이 되어 뇌에서의 acyl-CoA synthetase 2의 발현을 조절한다 (Desvergne et al., 1999; Lim et al., 1999). PPAR γ 는 주로 지방조직과 대식세포에서 발현이 되며 번역 개시점과 splicing정도에 따라 PPAR γ 는 PPAR γ_1 과 PPAR γ_2 로 나뉘는데 PPAR γ_2 가 주로 지방조직에서 발현이 되는데 지방산을 TG의 형태로 저장하는 기능이 있으며 RXR α 와 heterodimer를 형성하여 aP2, LPL, ACC, PEPCCK와 같은 지방세포 유전자의 발현에 관여한다 (Rangwala et al., 2000).

PEPCCK는 oxaloacetate를 phosphoenolpyruvate로 전환시키는 글리세롤 신생과정을 촉진하는 중요한 효소로서 간, 흰색지방조직과 부신 피질, 소장, 유선에서 많이 발현된다 (Granner et al., 1985). TG의 합성을 위해 필요한

glycerol-3-phosphate를 에너지 공급이 제한된 단식시에 글리세롤 신생과정은 지방조직에서 지방산 방출을 조절하는데 단식시에 PEPCCK의 발현수준을 증가시켜 글리세롤 신생과정을 증가시켜 지방조직에서의 지방산 방출을 감소시킨다 (Reshef et al., 1969; 1970). 혈중 지방산의 수준이 증가하면 인슐린 저항성이 생기고 당뇨병이 발병하게 되는데 PEPCCK는 혈중 지방산 수준을 감소시켜 인슐린저항성을 개선시키는 기능도 있다 (Lewis et al., 2002). Insulin은 PEPCCK의 전사를 억제시키지만 cAMP, glucocorticoids, triiodothyronine은 전사를 촉진시킨다 (Reshef et al., 1970). 아지방 세포에서는 PEPCCK는 발현이 되지 않았지만 지방세포로 분화되는 동안에 PEPCCK의 유전자 발현 양이 증가하고 또한 insulin의 첨가에 따라 증가한다 (Dani et al., 1986).

aP2는 주로 지방세포와 대식세포에서 발현되며 세포 내 지방산의 수송과 대사와 관련된 낮은 분자량의 세포질 단백질이며 긴 사슬 지방산과 친화도가 높다. 세포막을 통한 세포 내 지방산의 유입과 유출은 확산에 의해서거나 단백질이 매개해서 일어난다. 미토콘드리아, 소포체, 핵, 지방방울, 페록시좀과 같은 세포 내 여러 소기관과의 지방산의 이동은 aP2에 의해서 매개된다. 또한 aP2

는 지방산 한 분자와 결합하면 인슐린 수용체 티로신 키나아제에 의해서 티로신 잔기가 인산화되는데 이로써 aP2가 인슐린 신호전달에 있어 중간매개 역할을 한다고 추측할 수 있다. Kletzien et al., (1992)은 제2형 당뇨병 모델로써 비만을 유도시킨 쥐에게 pioglitazone을 투여하였을 때 aP2의 발현이 증가하고 혈당지수와 인슐린 수준이 감소됨을 보였다. 이것으로 인슐린 민감성과 인슐린의 작용에 있어 매개하는 역할을 한다고 보고하였다. 지방세포로 분화되면서 aP2의 mRNA 발현 수준이 현저히 증가하며 insulin과 고지방식이도 aP2의 mRNA 발현 수준을 증가시킨다 (Kim et al.,1998 ; Tontonoz et al., 1994; Margareto et al., 2001).

비만으로 인한 여러 가지 질환과 소비되는 비용 등을 고려해 볼 때 지방 축적을 저해하여 체중을 감소시켜 비만을 억제하는 천연적인 기능성 성분을 찾는 것이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 flavonoids계 색소 중 하나인 anthocyanins을 3T3-L1 지방세포에 처리하여 지방 축적의 억제효과와 adipogenesis에 관여하는 전사인자들의 변화를 분석하여 anthocyanins에 의한 아지방 세포가 지방세포로의 전환억제 작용을 살펴보았다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), penicillin-streptomycin mixture, 0.25% Trypsin-EDTA, TRIzol reagent는 Gibco BRL 제품 (Life Technologies, Gibco BRL, USA)을 사용하였으며, fetal bovine serum (FBS)은 Hyclone 제품 (Hyclone, USA)을 사용하였다. Sodium bicarbonate, sodium pyruvate, dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxan, insulin, methylthiazole tetrazolium (MTT), dimethylsulfoxide (DMSO), GPO-trinder, Hanks' balanced salt buffer (HBSS), glycerol standard는 Sigma 제품 (Sigma Chemical Co., USA)을 사용하였다. Culture dish, 6-well plate, 96 well plate, centrifuge tube, scrapper는 Corning 제품 (Corning, USA)과 Falcon 제품 (Becton Dickinson Labware, USA)을 사용하였고 Protein standard marker는 rainbow high molecular marker 제품 (Amersham Pharmacia Bioscience, England)을 사용하였고 Western Blot Chemiluminescence Reagent 는 Perkin Elmer Life science 제품 (MA, USA)을 사용하였다. Mouse polyclonal anti-SREBP-1과

secondary antibody는 Santa Cruz 제품 (Santa Cruz, Biotechnology, Inc. USA)을 사용하였다. Table 1은 이번 실험에 사용된 A-1575 포도에서 추출한 anthocyanins의 구성성분을 나타내었다.

Table 1. Component of semi-purified anthocyanins from epidermal tissue of the highly pigmented A-1575 wine grape

Anthocyanin	Concentration (mg/g dry weight)	(%)
Delphinidin	110.6	17.3
Cyanidin	25.9	4.1
Petunidin	132.5	20.8
Peonidin	64.3	10.1
Malvidin	305.0	47.8

2. 실험방법

1) 3T3-L1 배양

3T3-L1 세포는 KCLB (KCLB, Korea)에서 분양을 받아 사용하였으며 4.5 g/L glucose, 10% fetal bovine serum, penicillin /streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin in 0.85% saline), 1% 100 μM sodium pyruvate를 함유한 DMEM으로 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 3T3-L1 아지방 세포가 70~80% confluent 되면 PBS로 한번 씻어내고 0.25% Trypsin-EDTA를 처리하여 계대 배양하였으며 배지는 3일마다 교환하였다. 3T3-L1 아지방 세포의 지방세포로의 유도는 100% confluent 이틀 후 500 μM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 250 nM dexamethasone, 170 nM insulin (MDI)을 함유한 배지로 유도하였으며 3일 후에 MDI 배지는 10% FBS와 170 nM insulin을 함유한 DMEM 배지로 각 실험날짜까지 이틀에 한번 교환하였다. 결과에 나와 있는 시간과 농도에 따라 anthocyanins을 처리하였으며, 대조군으로 DMSO을 처리하였으며 그 농도는 0.5%를 넘지 않도록 하였다. Anthocyanins 은 50 mg/ml 의 stock solutions으로 DMSO에 녹인 후, filter로 멸균하여 -20 $^{\circ}\text{C}$

에 보관하여 사용하였다.

2) 세포독성 실험

3T3-L1 아지방 세포에 대한 anthocyanins의 독성을 분석하기 위하여 96-well tissue culture에 1×10^5 cells/well의 농도로 10% FBS를 함유한 DMEM에 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 24시간 후 배지는 무혈청 배지로 교환하였으며 8, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 anthocyanins을 처리하여 37°C, CO₂ 배양기에서 24 시간과 48 시간 동안 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고 5 mg/mL 의 MTT를 배지로 10배 희석시킨 후 그 희석액 200 μl 를 cell에 처리하였다. 4시간 후 MTT를 제거하고 DMSO 100 μl 를 첨가하여 plate shaker로 흔들어 준 다음 ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Oil Red O Staining

0.7 g Oil red O를 200 mL의 isopropanol에 녹여서 Oil red O stock solution을 만들고 60% Oil red O stock solution과 40% D.W.의 비율로 Oil red O working solution을 만들었다. 배지를 제거한 후 PBS로 세포를 씻고

formalin 1 ml를 넣고 실온에서 1시간 방치시켰다. Formalin을 제거하고 60% isopropanol로 씻고 말린 후, Oil red O working solution 960 μ l를 넣고 1시간 염색한 후 증류수로 4번 반복해서 씻어내고 100% isopropanol로 탈색된 용액을 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) Triglycerides 측정

Cell을 HBSS로 두 번 세척하고 trypsin-EDTA로 세포를 떼어낸 후 sonicator를 이용해 균질화시키고 그 중 10 μ l를 취해서 10 μ l의 tert-butanol, 5 μ l의 tritonx-100-methanol mixture (1:1, v/v)를 넣었다. TG의 농도는 GPO-trinder를 이용하여 측정하였다. TG reagent에 10 ml의 D.W., free glycerol reagent에 40 ml의 D.W.를 넣고 reconstitute reagent를 만든 다음 0.8 ml의 free glycerol reagent에 각각 10 μ l water (blank), 10 μ l glycerol standard (2.5 mg/ml standard), 10 μ l sample을 넣고 37°C에서 5분 동안 반응시키고 540 nm에서 초기 흡광도를 측정하였다. 그 후 0.2 ml의 TG reagent에 각각 10 μ l water (blank), 10 μ l glycerol standard (2.5 mg/ml standard), 10 μ l

sample을 넣고 37℃에서 5분 동안 반응시키고 540 nm에서 최종 흡광도를 측정하여 TG의 양을 standard curve에 따라 계산하였다.

5) RNA 분리

Cell을 trypsin-EDTA로 세포를 떼어낸 후 Trizol 1 ml, 0.2 ml chloroform을 넣고 15초간 강하게 흔들어주고 4℃, 12,000×g에서 15분간 원심분리시켰다. 원심분리 후 새 튜브에 수용층을 담고 0.5 ml isopropyl alcohol을 넣고 10분간 실온에 둔 후 4℃, 12,000×g에서 10분간 원심분리시켰다. 상층액을 버리고 75% ethanol 1 ml을 섞어주고 4℃, 7,500×g에서 5분간 원심분리시켰다. RNA pellet을 5분~10분 실온에서 말리고 RNA free water에 녹여서 55~60℃에서 10분간 incubation시키고 260 nm에서 흡광도를 측정해 RNA농도를 계산하였다.

6) Real-Time RT-PCR

12.5 μl의 2.5 mM Sybr Green RT-PCR MIX (Qiagen, USA), 1.25 μl의 0.5 μM forward primer, 1.25 μl의 0.5 μM reverse primer 0.5 μM, 0.25 μl

의 QuntiTect RT Mix, 1 μ l의 50 ng/ μ l RNA를 최종 부피가 25 μ l가 되도록 RNase free D.W.를 PCR 튜브에 각각 분주하고 잘 섞어준 뒤 spin down시킨 후 50 $^{\circ}$ C 30분, 95 $^{\circ}$ C 15분, 94 $^{\circ}$ C 15초, 50 $^{\circ}$ C 1분에서 35 cycle로 프로그램을 구성하였다. 그리고 각 primer는 Bioneer (Bioneer Co., Korea)에 의뢰하여 합성하였다. 목적유전자에 대한 각 primer의 서열은 Table 2와 같다.

Table 2. Primer sequences used in this study

Gene	Sequences	GenBank Accession
SREBP-1	F: AGC TCA AAG ACC TGG TGG TG R: TCA TGC CCT CCA TAG ACA CA	AF374266
aP2	F: AAAAACACCGAGATTTTCCTTCA R: TCACGCCTTTCATAACACATTC	M84651
C/EBP-α	F: TTA CAA CAG GCC AGG TTT CC R: AAC TCC AGT CCC TCT GGG AT	NM007678
PEPCK	F: ATGCTGATCCTGGGCATAAC R: AACTTCATCCAGGCGATGTC	AF009605
PPAR γ	F: CCAACTTCGGAATCAGCTCT R: AAGGTGGAGATGCAGGTTCT	NM011146

F: Forward, R: Reverse

7) Western Blot

3T3-L1 cells을 차가운 PBS로 씻고 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium dodecyl sulfate, protease inhibitor cocktail 100 μ l)를 넣고 cell scraper로 cell을 모은 뒤 12,000 rpm, 4°C에서 20 분간 원심분리시켰다. 원심분리 후 상층액에 SDS-PAGE용 sample buffer를 3:1의 비율로 첨가하여 100°C에서 1분간 가열하여 전기영동용 sample을 만들었다. 3T3-L1 세포의 단백질 40 μ g을 10% SDS polyacrylamide gel에 loading시켜 150 V에서 1시간 30분 동안 전기영동하여 단백질을 분리시켰다. Transfer buffer에 membrane과 pad, filter paper를 30분 담가두고 sandwich를 조립한 뒤 400 mA에서 2시간 동안 transfer시켰다. 그 후 membrane을 10% skin milk buffer로 실온에서 1시간 blocking시켰다. SREBP-1c 1차 항체를 plain buffer에 1:500으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시키고 washing buffer로 10분씩 2번 세척하고 난 후 SREBP-1c 2차 항체를 5% milk buffer에 1:5000으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시키고 washing buffer로 10분간 2번 세척하였다. Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer Life

Science, USA)를 사용하여 Kodak X-ray film에 1분간 감광시킨 후 현상하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Anthocyanins에 의한 3T3-L1 아지방 세포 증식저해

Anthocyanins의 세포증식 저해를 알아보기 위해 분화되기 전의 3T3-L1 아지방 세포를 96 well에 배양시키고 8, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 anthocyanins을 24시간, 48시간 동안 처리하였다. Anthocyanins의 세포독성 결과는 Fig. 3에 나타내었으며 anthocyanins의 농도와 처리시간에 따라 대조군에 비해 세포의 수가 줄어들지 않았으며 세포증식이 저해되지 않았음을 확인할 수 있었다. 이 결과로 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지의 anthocyanins이 3T3-L1 아지방 세포에 독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다.

미토콘드리아의 탈수소효소에 의해 노란색의 수용성 MTT tetrazolium을 자주색의 비수용성 MTT formazan으로 환원시킨다. 이러한 formazan의 흡광도는 540 nm의 파장에서 최대가 되며 이 파장에서 측정된 흡광도는 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 반영해 세포독성을 알아볼 수 있는 실험이다. Zhang et al. (2004)은 anthocyanins의 aglycone인 anthocyanidin에 속하는 malvidin, pelargonidin, pelargonidin, delphinidin 및 petunidin의 5종류를 대장암, 유방

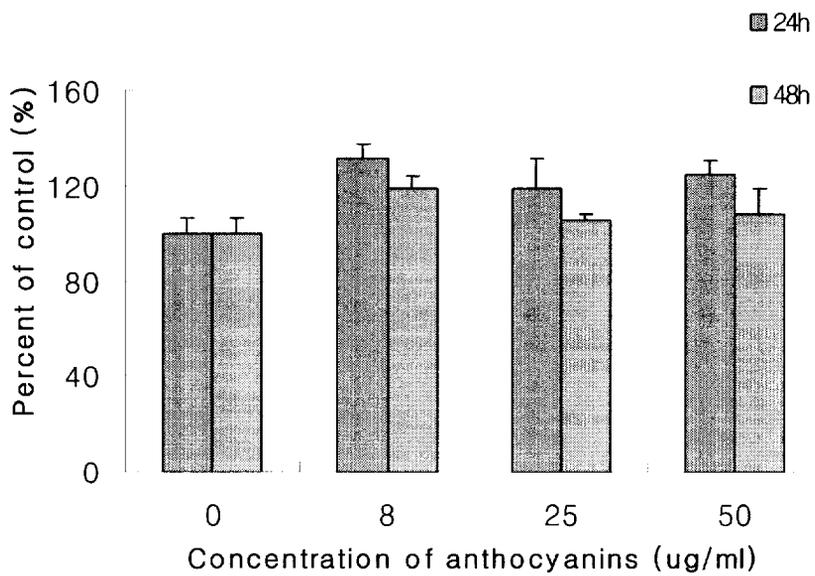


Fig. 3. Effect of anthocyanins on 3T3-L1 preadipocytes proliferation

Anthocyanins was added to preconfluent preadipocytes in 8, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ concentrations.

암, 폐암세포 등에 처리하여 세포증식 저해효과를 측정한 결과 malvidin을 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 위암세포인 AGS는 69%, 대장암세포인 HCT-116는 75.7%, 폐암세포인 NCI-H460은 67.7%, 유방암세포인 MCF-7은 74.7%, 중앙신경계 암세포인 SF-268은 40.5% 가량 세포증식이 감소되었고, pelargonidin을 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리했을 때 위암세포인 AGS는 64%, 대장암세포인 HCT-116는 63%, 폐암세포인 NCI-H460은 62%, 유방암세포인 MCF-7은 34%, 중앙신경계암세포인 SF-268은 40.5% 가량 세포증식이 감소되었다, 그리고 cyanidin, delphinidin 및 petunidin을 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 유방암세포인 MCF-7만 각각 47%, 66%, 53% 가량 세포증식이 감소되었다. 그러나 이러한 암세포의 증식 저해작용은 5종류의 anthocyanidins의 처리농도가 높기 때문인 것으로 사료된다. Harmon et al., (2001)은 anthocyanins과 같은 flavonoid계에 속하는 genistein과 naringenin이 3T3-L1 아지방 세포의 세포증식을 억제하였다고 보고하였다. 그러나 정상 섬유 아세포인 3T3-L1 아지방 세포의 세포증식이 저해되었다는 것은 항지방형성인자로서 genistein과 naringenin이 작용했다기보다 이 두 flavonoid계 화합물이 3T3-L1세포에 독성을

나타내는 것으로 생각되며 또한 두 화합물의 처리 농도가 지나치게 높았던 것도 세포증식이 저해된 이유 중 하나라고 생각된다.

2. Oil red O 염색

Anthocyanins의 처리에 의한 3T3-L1 지방세포의 지방방울 형성에 관한 영향을 확인하기 위해 Oil red O로 염색하였다. Confluent된 이틀 후 DMSO 또는 anthocyanins이 함유된 MDI 배지를 첨가하여 (0일) 3T3-L1의 아지방 세포의 지방세포로의 분화를 유도하였고 7일째 되는 날 Oil Red O용액으로 세포의 지방을 염색시키고 100% isopropanol로 탈색시켜 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 DMSO를 처리한 대조군에 비하여 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 anthocyanins을 처리한 실험군이 대조군에 비하여 약 35.3% 낮았으며, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 anthocyanins을 처리한 실험군은 약 49.4% 낮았다. 이러한 결과는 anthocyanins에 의해 3T3-L1의 지방방울 형성이 억제되었다는 것을 나타낸다.

Fig. 5는 3T3-L1 아지방 세포의 분화 유도 시간에 따라 anthocyanins에 의한 지방축적의 변화를 Oil red O염색을 통해 알아본 결과로서 MDI를 처리함에 따라 지방세포로의 분화가 유도되면서 세포 내의 지방축적은 0일째에 비해 3일째에는 10% 가량 증가했으나 9일째에는 3배 이상 증가함을 확인할 수 있

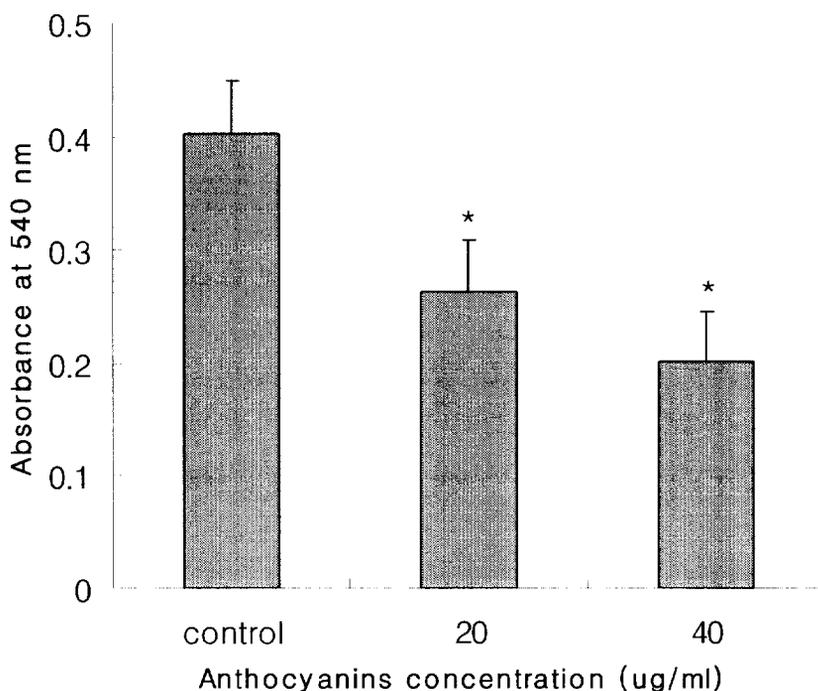


Fig. 4. Effect of anthocyanins on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes

After 2-day postconfluence, 3T3-L1 adipocyte differentiation was initiated by addition of 100 μM IBMX, 1 μM DEX, 20 $\mu\text{g/ml}$ INS, 40 $\mu\text{g/ml}$ of anthocyanins until 7 days. Stained lipids were extracted with 100% isopropanol and measured absorbance at 500 nm.

: Significantly different in ANOVA test ($p < 0.05$).

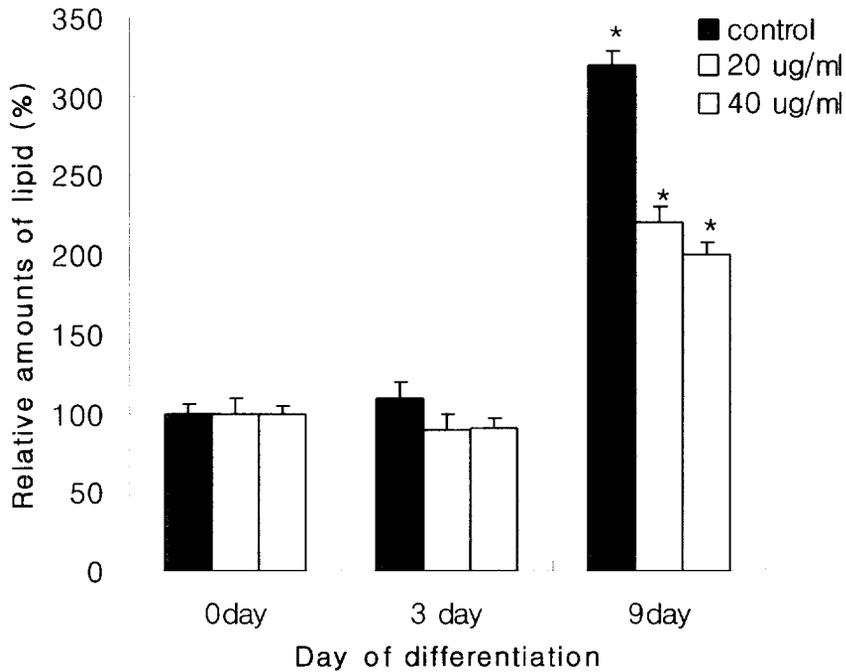


Fig. 5. Effect of anthocyanins on lipid accumulation in 3T3-L1 cells with treatment for different durations

Fully differentiated adipocytes were treated with 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ of anthocyanins at 0, 3 and 9 days. Stained lipids were extracted with 100% isopropanol and measured absorbance at 500 nm.

: Significantly different in ANOVA test ($p < 0.05$).

었다. 그리고 DMSO를 처리한 대조군에 비하여 3일 때에는 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 anthocyanins을 처리했을 때 20% 가량 감소하였으며, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 anthocyanins을 처리했을 때는 21% 가량 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다. 또한 9일 때에 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 anthocyanins을 처리했을 때는 대조군에 비하여 지방축적이 100% 가량 감소하였고 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 anthocyanins을 처리했을 때는 대조군에 비하여 120% 가량 감소하였음을 확인할 수 있었다. 즉, 지방세포로의 분화가 유도되면서 3T3-L1세포 내의 지방 축적량은 증가하였지만 anthocyanins에 의하여 지방축적이 저해됨을 확인할 수 있었다. Harmon et al. (2001; 2002)은 naringenin과 daidzein 그리고 genistein으로 지방 축적 억제효과를 분석한 결과, naringenin와 daidzein은 지방 축적 저해효과가 없었던 반면, genistein은 대조군에 비해 세포 내 지방 축적을 40% 억제시켰다고 보고하였다. 동일한 flavonoid계 화합물인 anthocyanins도 genistein과 마찬가지로 지방방울을 억제하는데 효과가 있음을 알 수 있었다. 또한 Lin et al. (2005)은 3T3-L1 세포에 녹차의 catechin 성분 중 epigallocatechin gallate (EGCG)를 0~200 μM 의 농도로 처리하여 Oil red O염

색을 통하여 지방축적을 분석한 결과 EGCG의 양이 증가함에 따라 비례하여 지방방울도 억제됨을 보고하였다. 이는 본 실험결과와 일치하였고 polyphenol 화합물이 지방축적을 억제함을 알 수 있었다.

Fig. 6은 3T3-L1의 형태를 나타낸 사진으로서 A는 3T3-L1 세포가 유도되기 전 세포 밀도가 100% confluent 되고 2일 째의 세포 형태로서 길게 뻗은 섬유아세포 형태를 보여준다. B는 3T3-L1을 지방세포로 분화 유도한 2일 후의 형태이며 C와 D는 각각 분화유도하고 6일과 8일 지난 뒤의 세포 형태이다. 분화 유도시키고 시간이 지남에 따라 세포 모양이 둥글해지고 지방방울들이 형성됨을 현미경으로 관찰 할 수 있었다. Gomez et al. (2003)는 MDI를 처리하지 않은 아지방 세포의 10일 째 세포 형태와 MDI를 처리해서 완전히 지방세포로 분화시킨 10일 째 세포의 형태를 나타내었는데 지방세포로 분화시키지 않은 아지방 세포는 섬유아세포 형태를 나타낸 반면 지방세포로 분화시킨 세포는 크고 둥근 지방방울들이 가득 찬 형태를 나타내었고 시간이 지날수록 지방방울이 가득 찬 형태를 나타낸 본 실험결과와 일치하였다.

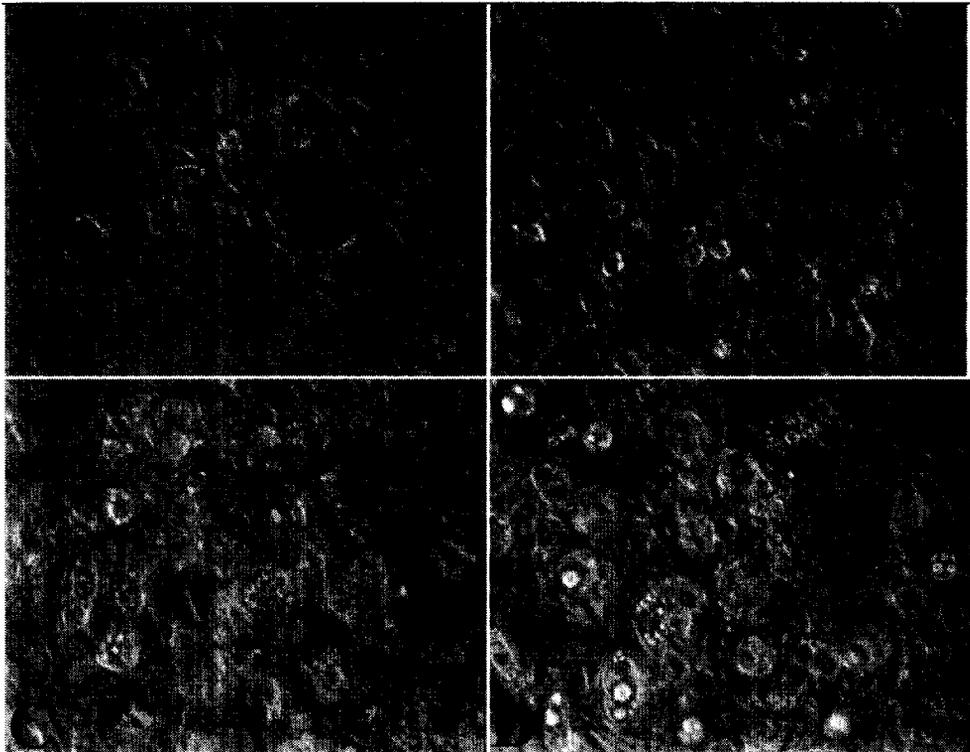


Fig. 6. Microscopic morphology of 3T3-L1 during differentiation

- (A) 3T3-L1 preadipocytes after 2 day confluency.
- (B) 3T3-L1 adipocytes after 2 day induction.
- (C) 3T3-L1 adipocytes after 6 day induction.
- (D) 3T3-L1 adipocytes after 8 day induction.

3. Anthocyanins에 의한 3T3-L1 지방세포의 TG 축적 저해효과

3T3-L1 아지방 세포의 지방세포로의 분화유도에 따른 TG의 축적에 대한 anthocyanins의 억제효과를 측정하기 위하여 MDI를 처리함과 동시에 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 anthocyanins을 3T3-L1에 처리하였고 분화유도 후 7일째 되는 날 TG와 단백질 양을 측정하였다. Fig. 7에 그 결과를 나타내었는데 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 anthocyanins을 처리했을 경우 대조군에 비하여 TG의 양이 46% 가량 감소하였고, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 anthocyanins을 처리했을 경우에는 52% 가량 감소하였다.

Furuyashiki et al. (2004)는 3T3-L1의 분화과정 동안 4 종류의 녹차 catechin을 5 μM 로 처리했을 때 3T3-L1의 지방축적이 대조군에 비해 (-)-catechin 3-gallate (CG)는 67%, (-)-epigallocatechin (EGC)은 77%, (-)-epicatechin 3-gallate, (ECG)는 75%, (-)-epigallocatechin 3-gallate (EGCG)는 84% 감소하였음을 보고하였다. Harmon et al. (2001)은 flavonoid계 화합물인 genistein을 3T3-L1 지방세포에 처리하여 지방축적을 분석한 결과 대조군에 비해 40% 가량 감소시켰다고 보고하였으며 또한 Tsuda et al. (2003)의 연구에서는 쥐에게 12주 동안 cyanidin- 3-O- β -D-glucoside와 함께 고지방식을 급이

하여 체중과 지방조직의 무게를 측정한 결과 고지방식이와 cyanidin-3-O-β-D-glucoside를 함께 급이한 쥐의 체중과 지방무게는 고지방식이만을 급이한 쥐에 비해 훨씬 낮았다. 또한 Kawakami et al. (2005)는 4주령의 쥐에 콩의 이소플라본 aglycone과 glucoside을 총 식이 무게에 대해 0.1%로 40일 동안 급이하였을 때 대조군에 비하여 간과 혈청의 총 콜레스테롤 수준과 TG 수준이 감소하였다고 보고하였다. Yugarani et al. (1992)의 연구에서는 쥐에게 고지방식과 함께 2.5% cholesterol, 16% lard와 polyphenolic 화합물인 morin과 tannic acid를 각각 10주간 급이하였을 때 혈청 TG의 수준은 공히 65% 가량 감소하였다고 보고하였다. 이상의 결과는 polyphenolic과 마찬가지로 anthocyanins의 한 종류인 cyanidin-3-O-β-D-glucoside이 고지방식으로 인해 형성되는 지방조직의 증가를 저해하였다는 것을 나타내며 anthocyanins이 지방세포의 지방축적을 억제한 본 실험결과와 일치하였다.

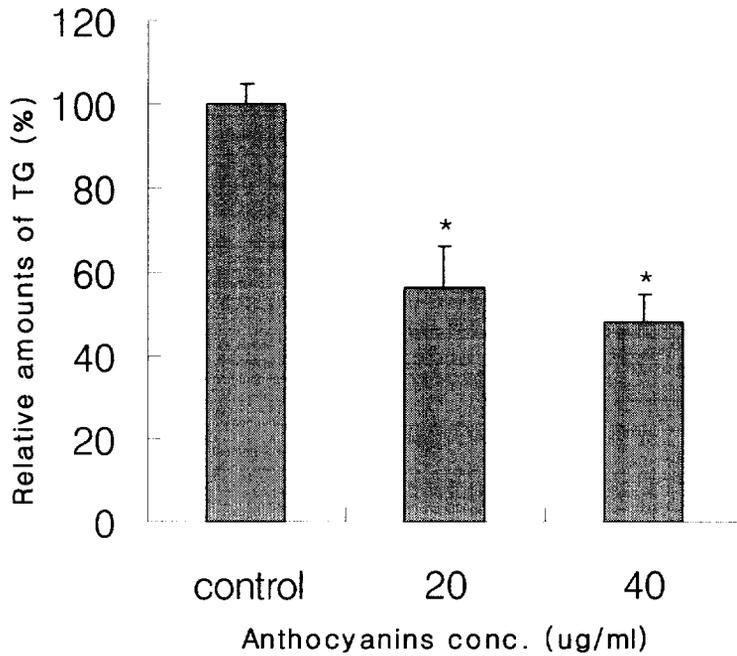


Fig. 7. Effect of anthocyanins on lipid accumulation in 3T3-L1 cells

After 2-day postconfluence, 3T3-L1 preadipocytes were differentiated by addition of 100 μM IBMX, 1 μM DEX, and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ INS containing 20 and 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of anthocyanins until 7day. Whole cell lysates were measured by TG assay.

: Significantly different in ANOVA test ($p < 0.05$).

4. Anthocyanins에 의한 전사인자 발현 억제

3T3-L1 야지방 세포의 지방세포로의 분화에 있어서 많은 전사인자들이 필요하며 분화됨에 따라 지방세포로부터 여러 지방세포 특이 유전자들이 발현된다. Anthocyanins의 처리에 따라 SREBP-1c, PPAR γ , C/EBP α , PEPCk, aP2의 mRNA 발현 수준에 대한 영향을 알아보기 위하여 real time RT-PCR을 통해 분석하였다.

Fig. 8은 지방산 합성효소를 활성화시켜 궁극적으로 TG의 합성을 조절하는 SREBP-1c의 mRNA 발현 수준을 나타내었는데 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 anthocyanins을 처리했을 경우 대조군 보다 7%, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 anthocyanins을 처리했을 경우에는 7.5%, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 anthocyanins을 처리했을 경우는 14%, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 anthocyanins을 처리했을 경우에는 42%, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 anthocyanins을 처리했을 경우 48%, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 anthocyanins을 처리했을 경우에는 69% 가량 SREBP-1c의 mRNA 발현 수준이 감소하였다.

Sewter et al. (2002)는 사람의 지방세포에 100 nmol/L의 농도로 insulin을 24시간 동안 처리한 결과 insulin을 처리하지 않은 대조군에 비해 insulin을 처

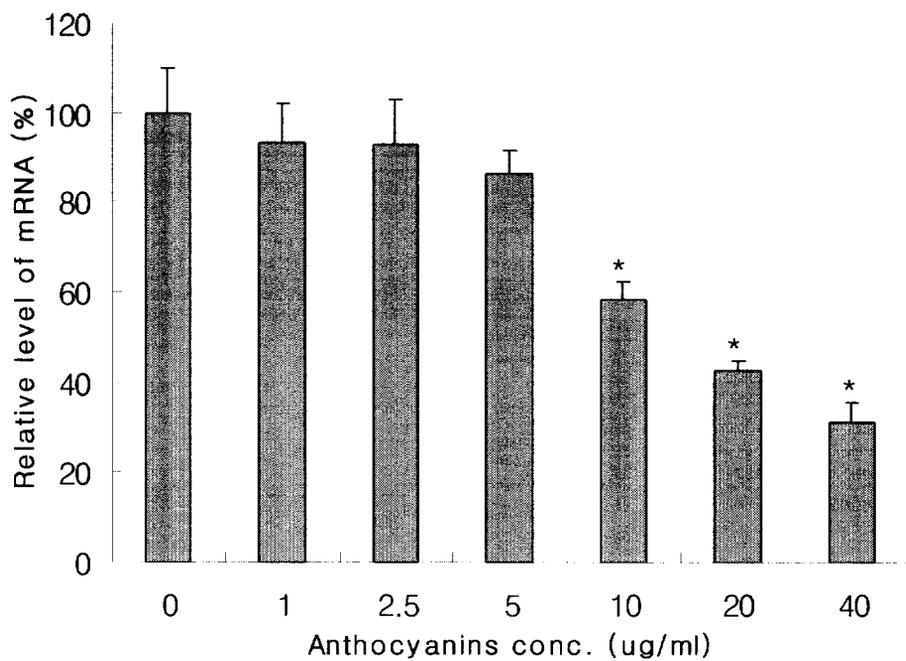


Fig. 8. Effect of anthocyanins on the expression of SREBP-1c mRNA

Total RNA was extracted with TRIZOL reagent and 50 ng of total RNA was used for real-time RT-PCR.

: Significantly different in ANOVA test ($p < 0.05$).

리했을 때의 SREBP-1의 mRNA 발현 수준이 3배 가량 증가하였음을 보고하였으며, Ide et al. (2001)은 쥐에게 식이에 sesamin을 0.1%, 0.2%, 0.4%로 첨가하여 급이하였을 때 sesamin을 0.1%와 0.2% 첨가식은 SREBP-1의 mRNA 발현 수준을 25~30% 감소시켰으며 sesamin을 0.4% 첨가식은 50% 가량 감소시켰음을 보고하였다. 또한 Tsuda et al. (2003)는 쥐에게 고지방식이와 cyanidin-3-glucoside (C3G)가 풍부한 식이를 주었을 때 간과 흰색지방세포에서의 SREBP-1의 mRNA 발현 수준을 RT-PCR을 통해 분석한 결과 SREBP-1 mRNA 발현 수준은 크게 감소했음을 보고하였으며, 이는 본 실험과 일치하였다.

Fig. 9는 지방세포의 분화에 있어 중요한 역할을 하는 PPAR γ 의 mRNA 발현 수준을 나타내었는데 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 anthocyanins을 처리했을 경우 대조군 보다 15%, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 anthocyanins을 처리했을 경우에는 20%, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 anthocyanins을 처리했을 경우는 24%, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 anthocyanins을 처리했을 경우에는 30%, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 anthocyanins을 처리했을 경우 33%, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 anthocyanins을 처리했을 경우에는 47% 가량 PPAR γ 의 mRNA 발현 수준이 감

소하였다. Kim et al. (2000)은 3T3-L1의 분화되기 전의 아지방 세포에서의 PPAR γ mRNA 발현 수준에 비해 지방세포로 분화되고 난 후의 mRNA 발현 수준이 현저히 증가하였음을 Northern blot을 통하여 증명하였고 Yagi et al. (2004)는 3T3-L1이 지방세포로 분화가 유도되어 PPAR γ_1 은 분화되기 전보다 mRNA 발현양이 전보다 10배 이상 증가하였고 PPAR γ_2 는 40배 이상 증가하고 C/EBP α 와 비슷한 시기인 4일 째부터 발현 양이 급격하게 증가하였음을 보고하였다. 그리고 Heim et al. (2004)은 골수 기질세포를 지방세포로 분화시켰을 때 3일 째의 PPAR γ_2 의 발현 양이 분화시키지 않은 아지방 세포의 PPAR γ_2 의 발현 양보다 7.1배 증가하였다고 보고하였고 Margareto et al. (2001)는 고지방 식이를 급이한 쥐의 지방세포에서의 PPAR γ_2 의 mRNA 발현 수준이 대조군보다 2.5배 높았다고 보고하였다. 그러나 3T3-L1에 genistein을 처리하였을 때 PPAR γ_2 의 mRNA 발현 수준은 3일 째에는 분화된 지방세포 대조군보다 2.3배 감소되었으며 21일 째에는 2배 감소되었음을 보고하였다. 그리고 Furuyashiki et al. (2004)는 tea catechin의 성분 중 (-)-catechin 3-gallate (CG)를 지방세포로 분화 후 5일 째의 3T3-L1에 5 μ M의 농도로 처리했을 때 PPAR γ_2 의 mRNA 발현

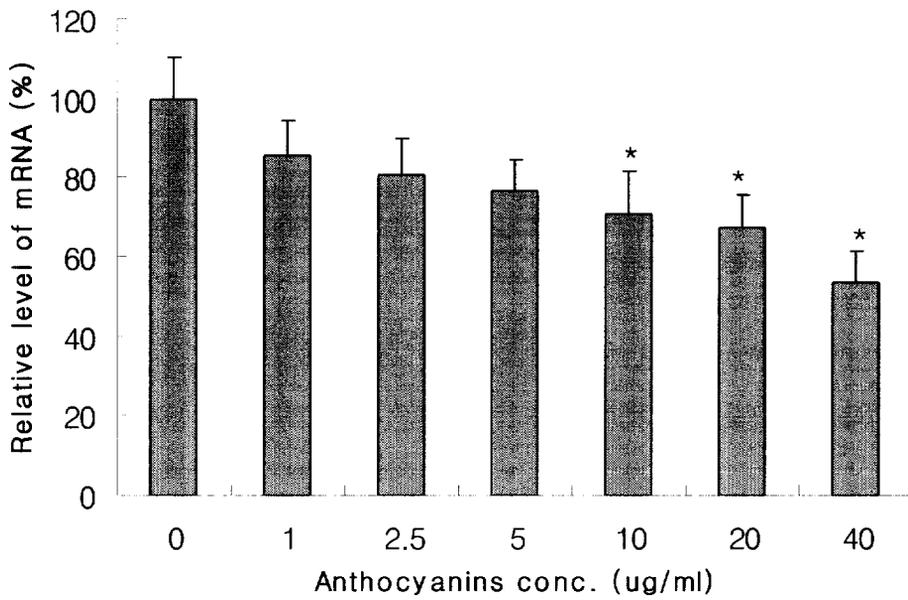


Fig. 9. Effect of anthocyanins on the expression of PPAR γ mRNA

Total RNA was extracted with TRIZOL reagent and 50 ng of total RNA was used for real-time RT-PCR.

: Significantly different in ANOVA test ($p < 0.05$).

양은 대조군에 비해 62% 가량 감소하였고 10 μM 의 농도로 처리하였을 때는 95% 가량 감소하였으며 30 μM 의 농도로 처리하였을 때는 100% 가량 감소하였다고 보고하였다. 또한 Tea catechin의 성분 중 (-)-epigallocatechin 3-gallate (EGCG)를 분화 후 8일 째의 3T3-L1 지방세포에 10 μM 의 농도로 처리했을 때는 PPAR γ_2 의 mRNA 발현 수준은 대조군에 비해 53% 가량 감소하였고 30 μM 의 농도로 처리했을 때는 69% 가량 감소하였음을 보고하였다. 이와 같은 사실로 지방세포로 분화되면서 PPAR γ 의 mRNA 발현 수준은 증가하지만 여러 flavonoid계 성분들이 PPAR γ 의 mRNA 발현 수준을 감소시킨다는 것을 알 수 있었고 anthocyanins에 의해서 PPAR γ 의 mRNA 발현 수준이 감소되었음을 확인한 본 실험과 일치하였다.

C/EBP α 는 PPAR γ 와 결합하여 adipsin, aP2, SCD-1, GLUT-4, PEPCK, leptin, CD36, insulin receptor 등과 같은 지방세포 특이 유전자들을 활성화시키는 중요한 전사인자이다. Fig. 10은 C/EBP α 의 mRNA 발현 수준을 나타내었는데 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 anthocyanins을 처리했을 경우 대조군보다 18%, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 anthocyanins을 처리했을 경우에는 30%, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 anthocyanins을

처리했을 경우 39%, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 anthocyanins을 처리했을 경우에는 63%, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 anthocyanins을 처리했을 경우 68%, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 anthocyanins을 처리했을 경우에는 79% 가량 C/EBP α 의 mRNA 발현 수준이 감소하였다. Kim et al., (1998)은 3T3-L1 지방세포에서 insulin에 의해 C/EBP α 의 mRNA 발현 수준이 증가하였음을 보고하였다. Yagi et al. (2004)는 3T3-L1 아지방 세포에 MDI를 처리 하여 분화를 유도시켜 시간이 지남에 따라 유전자들의 발현 수준을 알아보았는데 C/EBP β 와 C/EBP δ 는 MDI를 처리한 0일 때에서부터 2일 때까지 증가하고 그 후로는 서서히 감소했는데 C/EBP β 는 1.6배 이상 증가하였다. 그리고 PPAR γ_2 와 C/EBP α 는 분화 유도시키고 난 4일 때부터 급격히 증가했는데 C/EBP α 는 50배 이상 증가하였으며 PPAR γ_2 는 40배 이상 증가하였음을 보고하였다. Insulin을 3T3-L1 지방세포에 처리하였을 때 처리시간, 처리농도가 증가함에 따라 C/EBP α 의 발현양도 함께 증가함을 보고하였다. Heim et al. (2004)은 골수 기질세포를 지방세포로 분화시켜 genistein을 처리한 결과 분화시킨지 3일 때의 C/EBP α 의 발현양이 분화시키지 않은 대조군보다 4.1배 증가하였고 C/EBP α 의 mRNA 발현 수준은 3일 때에는

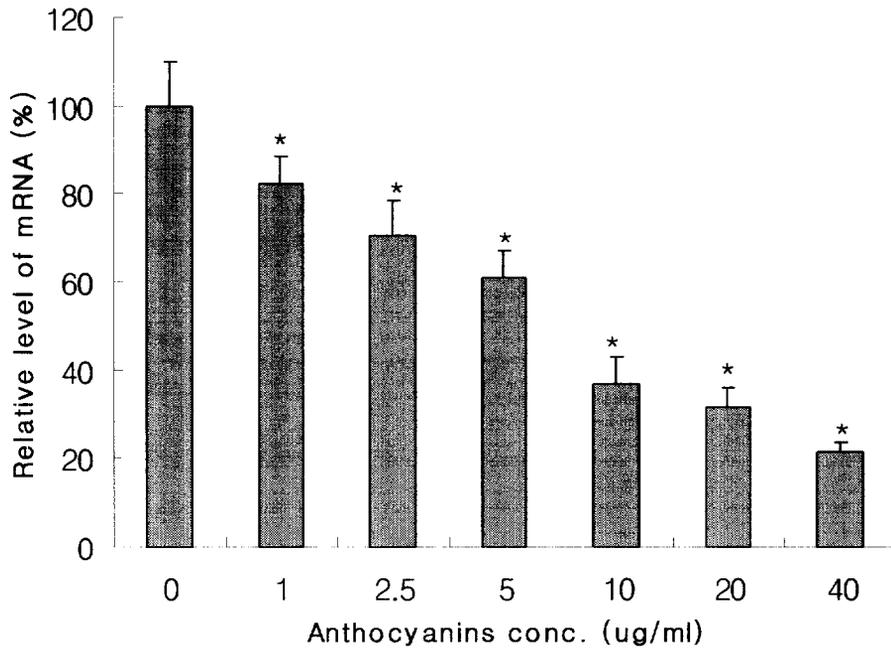


Fig. 10. Effect of anthocyanins on the expression of C/EBP α mRNA

Total RNA was extracted with TRIZOL reagent and 50 ng of total RNA was used for real-time RT-PCR.

: Significantly different in ANOVA test ($p < 0.05$).

지방세포로 분화된 대조군보다 2.3배 감소하였다고 하였다. 이와 같은 사실로 지방세포로 분화되면서 C/EBP α 의 발현 수준이 증가하지만 여러 flavonoid계 성분들이 PPAR γ 의 발현을 감소시킨다는 것을 알 수 있었고 anthocyanins에 의해서 C/EBP α 의 발현이 감소되었음을 확인한 본 실험과 일치하였다.

Fig. 11은 글리세롤신생합성을 조절하는 효소인 PEPCK의 mRNA 발현 수준을 나타내었는데 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 anthocyanins을 처리했을 경우 대조군보다 8%, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 anthocyanins을 처리했을 경우에는 11%, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 anthocyanins을 처리했을 경우는 16%, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 anthocyanins을 처리했을 경우에는 21%, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 anthocyanins을 처리했을 경우 21%, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 anthocyanins을 처리했을 경우에는 62% 가량 PEPCK의 mRNA 발현 수준이 감소하였다. Tontonoz et al. (1995)는 3T3-F442가 분화 유도되면서 PEPCK의 mRNA 발현 수준이 현저히 증가됨을 보고하였으며 Vijayan et al. (1997)은 flavonoid계에 속하는 β -naphthoflavone를 무지개 송어에 처리하여 간의 PEPCK의 mRNA 발현 수준이 감소하였음을 보고하였고 Yamada et al. (2005)는 쥐의 간세포인 H4IIE 세포에 녹차의 성분인 epigallocatechin gallate

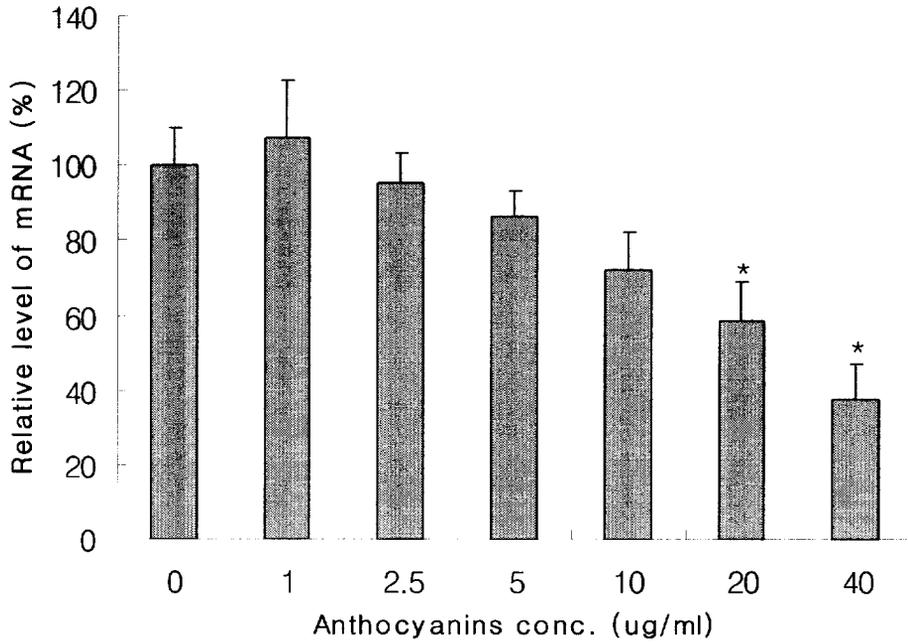


Fig. 11. Effect of anthocyanins on the expression of PEPCK mRNA

Total RNA was extracted with TRIZOL reagent and 50 ng of total RNA was used for real-time RT-PCR.

* : Significantly different in ANOVA test (* $p < 0.05$).

를 0~100 uM의 농도로 처리하였을 때 PEPCK의 mRNA 발현 수준이 감소하였음을 보고하였다. 이와 같은 사실로 지방세포로 분화되면서 PEPCK의 발현 수준이 증가하지만 여러 flavonoid계 성분들이 PEPCK의 발현을 감소시킨다는 것을 알 수 있었고 anthocyanins에 의해서 PEPCK의 mRNA 발현 수준이 감소되었음을 확인한 본 실험과 일치하였다.

Fig. 12는 aP2의 mRNA 발현 수준을 나타내는데 aP2의 mRNA는 대조군과 비슷했으며 유의적으로 차이가 나지 않았다. Kim et al. (1998)은 3T3-L1 아지방 세포를 지방세포로 충분히 분화시킨 후 insulin을 첨가함에 따라 24시간 내의 aP2의 mRNA 발현 수준이 증가함을 보고 하였으며 Kim et al. (2000)와 Tontonoz et al. (1995)는 3T3-L1의 분화되기 전의 아지방 세포에서의 aP2의 mRNA 발현 수준에 비해 지방세포로 분화된 후의 mRNA 발현 수준이 현저히 증가하였음을 Northern blot을 통하여 증명하였다. 또한 Margareto et al. (2001) 고지방 식이를 급이한 쥐의 지방세포에서의 aP2의 mRNA 발현 수준이 대조군보다 2.5배 높았다고 보고하였으며 이와 같은 사실은 지방세포로 분화되면서 aP2의 발현 수준은 증가하며 anthocyanins은 aP2의 mRNA 발현

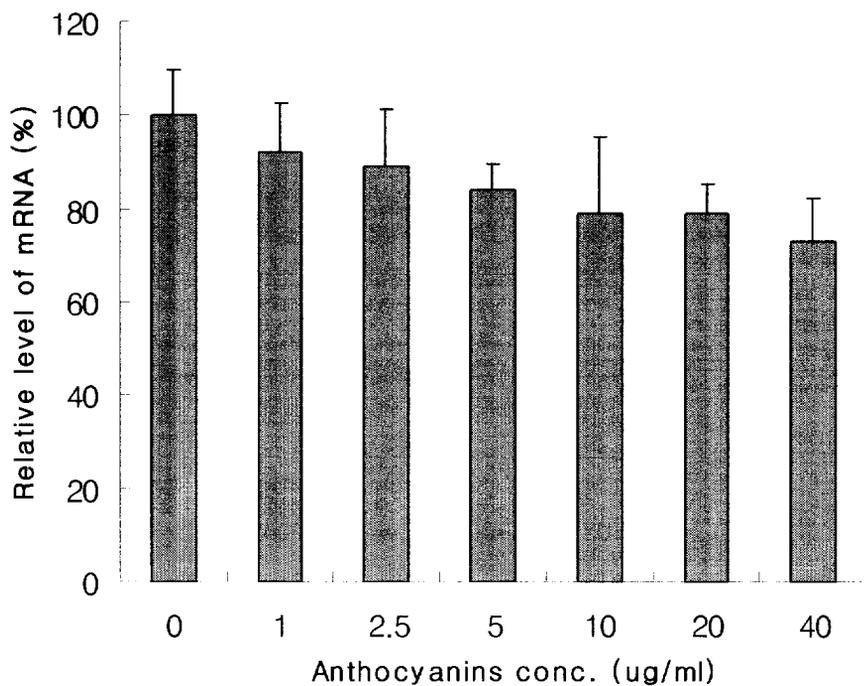


Fig. 12. Effect of anthocyanins on the expression of aP2 mRNA

Total RNA was extracted with TRIZOL reagent and 50 ng of total RNA was used for real-time RT-PCR.

수준에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다.

이상의 결과를 종합하면 anthocyanins은 aP2의 mRNA 발현에는 영향을 미치지 않았지만 PEPCK, PPAR γ , C/EBP- α , SREBP-1c의 mRNA전사를 억제시켜 MDI를 처리해 분화를 유도한 3T3-L1 지방세포의 분화를 억제하고 지방 축적을 저해한다는 것을 확인할 수 있었다.

5. SREBP-1 단백질 발현에 있어서의 anthocyanin의 효과

Anthocyanins의 처리에 따라 3T3-L1의 SREBP-1의 단백질 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 대조군 (DMSO), 1, 2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 anthocyanins을 분화유도 배지인 MDI + DMEM (+10% FBS)와 함께 3T3-L1 아지방 세포에 처리하고 분화시킨지 9일 째 되는 날 단백질을 추출하여 Western blot을 행하였다. Anthocyanins의 처리 농도가 증가함에 따라 SREBP-1의 단백질 수준이 감소하였음을 확인할 수 있었다 (Fig. 13).

Sewter et al. (2002)와 Nadeau et al. (2004)는 사람의 지방세포에 insulin을 처리함에 따라 insulin을 처리하지 않은 대조군에 비해 SREBP-1의 단백질 수준이 증가함을 보였고 Inoue et al. (2001)는 아지방 세포에서 지방세포로 분화되는 adipogenesis 과정 동안에 3T3-L1의 SREBP-1의 발현 양이 현저히 증가한다고 하였다. Ide et al.(2001)는 쥐에게 식이에 0.4%의 sesamin을 첨가하여 급이하였을 때 125 kDa의 SREBP-1의 전구체의 단백질 발현 수준은 37% 가량 감소하였으며 68 kDa의 성숙형의 단백질 발현 수준은 80% 가량 감소하였음을 보고하였다. 또한 Bursill et al. (2001)은 녹차의 ethyl acetate의 추출

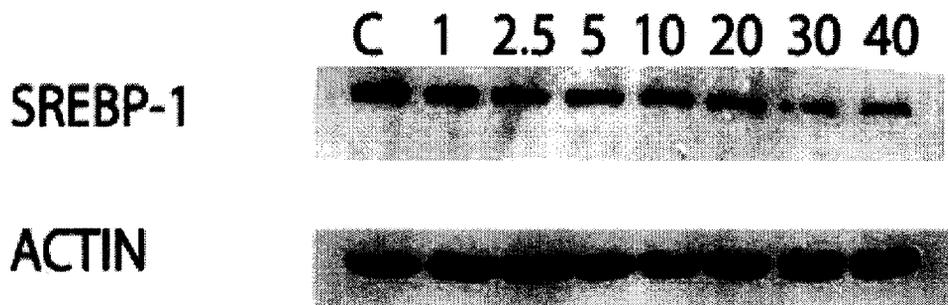


Fig. 13. Effect of anthocyanins on the expression of SREBP-1c protein

Two-day postconfluent 3T3-L1 cells were induced to differentiate in the presence of 0,1, 2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ of anthocyanins for 8 days.

물을 200 μ l의 농도로 HepG2에 처리하였을 때 125 kDa SREBP-1 전구체의 단백질 수준은 대조군과 비교하였을 때 현저히 감소하였으며 핵단백질에 존재하는 성숙형의 SREBP-1의 단백질 발현양은 60% 가량 증가하였고 이는 LDL receptor를 전사활성화시킴으로써 세포 내 콜레스테롤 농도를 낮춘다고 보고하였다.

이로써 3T3-L1 아지방 세포가 지방세포로 분화되면서 배양기간 중의 insulin 처리에 의해 SREBP-1의 단백질 발현양은 증가했지만 anthocyanins의 처리에 의해 소포체 막에 붙어있는 상태로 합성이 되는 125 kDa의 전구체의 발현양이 감소하였음을 확인할 수 있었고 SREBP-1의 단백질 수준의 감소로 TG의 생성과 관련된 FAS, ACC 등의 발현이 감소하여 3T3-L1의 세포 내 TG의 축적이 감소하는 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합하면 anthocyanins은 3T3-L1 지방세포의 TG의 축적을 저해하고 SREBP-1c, PPAR γ , C/EBP- α , PEPCK와 같은 지방세포 특이 유전자의 mRNA 발현 수준을 감소시키고 또한 SREBP-1c의 단백질 발현 수준을 감소시킴으로써 지방축적을 억제하는 천연 기능성 성분인 항비만인자로서의 다양

한 활용을 기대할 수 있을 것이다.

IV. 참고문헌

Bernlohr, D. A., Bolanowski, M. A., Kelly, T. J., M. D. Lane. Evidence for an increase in transcription of specific mRNAs during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem.*, 260(9):5563-5567, 1985

Brown, M. S. and Goldstein, J. L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, 89(3):331-340, 1997

Brown, M. S., Goldstein, J. L. Sterol regulatory element binding proteins (SREBPs): controllers of lipid synthesis and cellular uptake. *Nutr. Rev.*, 56(2):54-75, 1998

Brown, M. S., Nohturfft, R. A. DeBose-Boyd, S. Scheek, J. L. Sterols

regulate cycling of SREBP cleavage-activating protein (SCAP) between endoplasmic reticulum and Golgi. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96(20): 11235–11240, 1999

Bursill, C., Roach, P. D., Bottema, C. D., Pal, S. Green tea upregulates the low-density lipoprotein receptor through the sterol-regulated element binding Protein in HepG2 liver cells. *J. Agric. Food Chem.*, 49(11):5639-5645, 2001

Cao, Z., Umek, R. M. and McKnight, S. L. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev.*, 5(9):1538–1552, 1991

Cornelius, P., MacDougald, O. A. and Lane, M. D. Regulation of adipocyte development. *Annu. Rev. Nutr.*, 14(7):99–129, 1994

Damianaki, A., Bakogeorgou, E., Kampa, M., Notas, G., Hatzoglou, A., Panagiotou, S., Gemetzi, C., Kouroumalis, E., Martin, P. M., Castanas, E. Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. *J. Cel. Biochem.*, 78(3):429-441, 2000

Dani, C., Doglio, A., Grimaldi, P., Ailhaud, G. Expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene and its insulin regulation during differentiation of preadipose cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 138(1):468-475, 1986

Darlington, G. J., Ross, S. E., MacDougald, O. A. MacDougald, O. A. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.*, 273(46):30057-30060, 1998

Desvergne, B., Wahli, W. Peroxisome proliferator-activated receptors:

nuclear control of metabolism. *Endocr.*, 20(5):649-688, 1999

Furuyashiki, T., Nagayasu, H., Aoki, Y., Bessho, H., Hashimoto, T., Kanazawa, K., Ashida, H. Tea catechin suppresses adipocyte differentiation accompanied by down-regulation of PPARgamma2 and C/EBPalpha in 3T3-L1 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68(11):2353-2359, 2004

Goldstein, J. L., Rawson, R. B. and Brown, M. S. Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 397(2):139-148, 2002

Gomez, F. E., Bauman, D. E., Ntambi, J. M., Fox, B. G. Effects of sterculic acid on stearoyl-CoA desaturase in differentiating 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 300(2):316-326, 2003

Granner, D. K., Andreone, T. L. Insulin modulation of gene expression.

Diabetes Metab. Rev., 1(1-2):139-170, 1985

Green, H. and Kehinde, O. Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate

lipid. Cell, 1(5):113-116, 1974

Heim, M., Frank, O., Kampmann, G., Sochocky, N., Pennimpede, T.,

Fuchs, P., Hunziker, W., Weber, P., Martin, I., Bendik, I. The

phytoestrogen genistein enhances osteogenesis and represses adipogenic

differentiation of human primary bone marrow stromal cells. Endocr.,

145(2):848-859, 2004

Harmon, A. W., Harp, J. B. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1

adipogenesis and lipolysis. Am. J. Physiol. Cell Physiol., 280(4): 807-813,

2001

Harmon, A. W., Patel, Y. M., Harp, J. B. Genistein inhibits CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBP beta) activity and 3T3-L1 adipogenesis by increasing C/EBP homologous protein expression. *Biochem. J.*, 367(1): 203-208, 2002

Horton, J. D., Shimomura, I., Brown, M. S., Hammer, R. E., Goldstein, J. L. & Shimano, H. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Clin. Invest.*, 101(11):2331-2339, 1998

Horton, J. D., Goldstein, J. L., Brown, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.*, 109(9):1125-1131, 2002

Ide, T., Ashakumary, L., Takahashi, Y., Kushiro, M., Fukuda, N., Sugano, M. Sesamin, a sesame lignan, decreases fatty acid synthesis in rat liver accompanying the down-regulation of sterol regulatory element binding protein-1. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1534(1):1-13, 2001

Inoue, J., Kumagai, H., Terada, T., Maeda, M., Shimizu, M., Sato, R. Proteolytic activation of SREBPs during adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 283(5):1157-1161, 2001

Jayaprakasam, B., Vareed, S. K., Olson, L. K., Nair, M. G. Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 53(1):28-31, 2005

Kaestner, K. H., Ntambi, J. M., Kelly, T. J., Lane, M. D. Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. A second differentially

expressed gene encoding stearyl-CoA desaturase. *J. Biol. Chem.*,
264(25):14755-14761, 1989

Kaestner, K. H., Christy, R. J. and Lane, M. D. Mouse insulin-responsive
glucose transporter gene: characterization of the gene and trans-activation
by the CCAAT/enhancer binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87(1):
251-255, 1990

Kano, M., Takayanagi, T., Harada, K., Makino, K., Ishikawa, F.
Antioxidative activity of anthocyanins from purple sweet potato, *Ipomoea*
batatas cultivar Ayamurasaki. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69(5):979-988,
2005

Kim, J. B., Sarraf, P. M., Wright, K. M., Yao, E., Mueller, G., Solanes, B.,
Lowell, B. and Spiegelman, B. M. Nutritional and insulin regulation of fatty

acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1, J. Clin. Invest., 101(1):1-9, 1998

Kim, Y. C., Gomez, F. E., Fox, B. G., Ntambi, J. M. Differential regulation of the stearoyl-CoA desaturase genes by thiazolidinediones in 3T3-L1 adipocytes. J. Lipid. Res., 41(8):1310-1316, 2000

Kletzien, R. F., Foellmi, L. A., Harris, P. K., Wyse, B. M., Clarke, S. D. Adipocyte fatty acid-binding protein: regulation of gene expression in vivo and in vitro by an insulin-sensitizing agent. Mol. Pharmacol., 42(4):558-562, 1992

Lewis, G. F., Carpentier, A., Adeli, K., Giacca, A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. Endocr., 23(2):201-229, 2002

Lim, H., Gupta, R. A., Ma, W. G., Paria, B. C., Moller, D. E., Morrow, J. D., DuBois, R. N., Trzaskos, J. M., Dey, S. K. Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPAR delta. *Genes Dev.*, 13(12):1561-1574, 1999

Lin, J., Della-Fera, M. A., Baile, C. A. Green tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits adipogenesis and induces apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. *Obes. Res.*, 13(6):982-990, 2005

Mckeon, C. and T. Pham. Transactivation of the human insulin receptor gene by the CAAT/enhancer binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 174(2): 721-728, 1991

Margareto J, Gomez-Ambrosi J, Marti A, Martinez JA. Time-dependent effects of a high-energy-yielding diet on the regulation of specific white

adipose tissue genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 283(1):6–11.

2001

Nadeau, K. J., Leitner, J. W., Gurerich, I., Draznin, B. Insulin regulation of sterol regulatory element-binding protein-1 expression in L-6 muscle cells and 3T3 L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 279(33):34380-34387, 2004

Noh, S. K., Functional action of flavonoids for treatment of obesity. *Food Industry and Nutrition*. 7(2):27-29, 2002

Pal, S., Ho, N., Santos, C., Dubois, P., Mamo, J., Croft, K., Allister, E. Red wine polyphenolics increase LDL receptor expression and activity and suppress the secretion of ApoB100 from human HepG2 cells. *J. Nutr.*, 133(3):700-706, 2003

Rangwala, S. M., Lazar, M. A. Transcriptional control of adipogenesis.

Annu. Rev. Nutr., 20(1):535-559, 2000

Reshef, L., Ballard, F. J., Hanson, R. W. The role of the adrenals in the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase of rat adipose tissue. J

Biol. Chem., 244(20):5577-5581, 1969

Ross, S. R., Graves, R. A., Greenstein, A., Platt, K. A., Shyu, H. L.,

Mellovitz, B. and Spiegeman, B. M. A fat-specific enhancer is the primary determinant of gene expression for adipocyte P2 in vivo. Proc. Natl. Acad.

Sci., 87(24):9590-9594, 1990

Reshef, L., Hanson, R. W., Ballard, F. J. A possible physiological role for glyceroneogenesis in rat adipose tissue. J. Biol. Chem., 245(22):5979-

5984, 1970

Rubin, C. S., Hirsch, A., Fung, C. and Rosen, O. M. Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem*, 253(20):7570–7578, 1978

Safari, M. R., Sheikh, N. Effects of flavonoids on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 69(1):73-77, 2003

Sewter, C., Berger, D., Considine, R. V., Medina, G., Rochford, J., Ciaraldi, T., Henry, R., Dohm, L., Flier, J. S., O'Rahilly, S., Vidal-Puig, A. J. Human obesity and type 2 diabetes are associated with alterations in SREBP1 isoform expression that are reproduced ex vivo by tumor necrosis factor-alpha. *Diabetes*, 51(4):1035-1041, 2002

Solomon, C. G., Manson, J. E. Obesity and mortality: a review of the epidemiologic data. *Am. J. Clin. Nutr.*, 66(4):1044–1050, 1997.

Spiegelman, B. B., Kim, J. B., Sarraf, P., Wright, M., Yao, K. M. Mueller, E., Solanes, G., Lowell, B. M. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1, *J. Clin. Invest.*, 101(1):1–9. 1998

Szkudelska, K., Nogowski, L., Szkudelski, T. Genistein affects lipogenesis and lipolysis in isolated rat adipocytes. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 75(4-5):265-271, 2000

Tang, Q. Q., Jiang, M. S. and Lane. M. D. Repressive effect of Sp1 on the C/EBP α gene promoter: Role in adipocyte differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, 19(7):4855-4865, 1999

Tsuda, T., Horio, F., Uchida, K., Aoki, H., Osawa, T. J. Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *J. Nutr.*, 133(7):2125-2130, 2003

Tsuda, T., Ueno, Y., Aoki, H., Koda, T., Horio, F., Takahashi, N., Kawada, T., Osawa, T. Anthocyanin enhances adipocytokine secretion and adipocyte-specific gene expression in isolated rat adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 316(1):149-157, 2004

Tontonoz, P., Hu, E. and Spiegelman, B. M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor, *Cell*, 79(7):1147-1156, 1994

Tontonoz, P., Hu, E., Devine, J., Beale, E. G., Spiegelman, B. M. PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate

carboxykinase gene. *Mol. Cell. Biol.*, 15(1):351–357, 1995

Yagi, K., Kondo, D., Okazaki, Y., Kano, K. A novel preadipocyte cell line established from mouse adult mature adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 321(4):967-974, 2004

Yamada, K., Ogata-Kawata, H., Matsuura, K., Miyamoto, K. SHARP-2/Stra13/DEC1 as a potential repressor of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *Federation of European Biochemical Societies*, 579(6):1509-1014, 2005

Yeh, W. C., Cao, Z., Classon, M. and McKnight, S. L. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev.*, 9(2):168–181, 1995

Yi, W., Fischer, J., Akoh, C. C. Study of anticancer activities of muscadine grape phenolics in vitro. *J. Agric. Food. Chem.*, 53(22):8804-8812, 2005

Yugarani, T., Tan, B. K., Das, N. P. Effects of polyphenolic natural products on the lipid profiles of rats fed high fat diets. *Lipids*, 27(3):181-186, 1992

Yuki, K., Wakako, T., Shingo, N., Kyoichi O. Comparison of regulative function between dietary soy isoflavones aglycone and glucoside on lipid metabolism in rats fed cholesterol. *J. Nutr. Biochem.*, 16(4):205-212, 2005

Vijayan, M., Robert B., Christopher, J. and George, K. Handling stress does not affect the expression of hepatic heat shock protein 70 and conjugation enzymes in rainbow trout treated with β -naphthoflavone. *Life*

Sci., 61(2):117-127, 1997

보건복지부, 국민건강영양조사, 2004