

## 생강 성분인 (6)-Gingerol이 3T3-L1에서 지방세포 증식과 분화 과정에 미치는 영향\*

서은영<sup>†</sup>

장안대학교 외식산업과

## Effects of (6)-gingerol, ginger component on adipocyte development and differentiation in 3T3-L1\*

Seo, Eun Young<sup>†</sup>

Department of Food Service Industry, Jangan University, Gyeonggi 445-756, Korea

### ABSTRACT

**Purpose:** The objective of this study was to investigate the effects of (6)-gingerol, ginger components proliferation and adipocyte differentiation from early to lately steps. **Methods:** 3T3-L1 preadipocytes were cultured. Differentiation of confluent cells was induced with dexamethasone, isobutylxanthin and insulin for 2 day and cells were cultured by medium with insulin in presence of various concentrations 0, 25, 50, 100 ( $\mu\text{mol/L}$ ) of (6)-gingerol for 4 day. Cell viability was measured using the EZ Cytos assay kit. In addition, we examined the expression of mRNA levels associated with each adipocyte differentiation step by real time reverse transcription polymerase chain reaction. **Results:** (6)-Gingerol inhibited adipocyte proliferation in a dose and time dependent manner. Expression of C/EBP $\beta$ , associated with early differentiation step remained unchanged. However, intermediate, late differentiation step and adipocytokines were effectively changed in dose-dependently manner in cell groups treated with (6)-gingerol. **Conclusion:** This study has shown that treatment with (6)-gingerol inhibited adipocyte proliferation as well as each adipocyte differentiation step. In particular, the (6)-gingerol more effectively inhibited adipocyte differentiation from intermediate differentiation step.

**KEY WORDS:** (6)-gingerol, adipocyte differentiation, 3T3-L1, adipocytokine, proliferation

### 서 론

비만은 체내에 지방조직이 과다하게 축적되어 있는 상태를 말하며, 지방 조직의 증가는 지방세포 수 증가와 지방세포 크기 증대를 의미한다.<sup>1</sup> 전구지방세포인 mouse fibroblast 3T3-L1 preadipocyte에 insulin, dexamethasone (DEX), isobutylmethylxanthin (IBMX)를 처리하면 지방세포로의 분화가 이루어진다.<sup>2</sup> 분화된 지방세포는 계속적으로 증식하여 세포 내 지방구가 축적되어 성숙한 지방세포로 성장하는 동시에 세포의 형태, 유전자 발현 변화, 중성지방량 증가 등 복합적인 변화를 동반하게 된다.<sup>3,4</sup> 지방세포 분화 유도 물질 중 insulin은 지방세포 막에 결합하여 전사와 관련된 효소들을 활성화시켜 분화를 촉진하고,

Dex는 세포 내 cAMP 생성을 촉진한다. 또한, IBMX는 핵 수준의 전사인자인 CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) $\beta$ 와 C/EBP $\delta$ 를 활성화하여 이들로 하여금 C/EBP $\alpha$ 와 peroxisomal proliferator activated receptor (PPAR) $\gamma$ 를 활성화시켜 분화를 유도한다.<sup>4,5</sup> 이러한 분화유도 물질에 의해 지방세포로 분화되면 지방세포 특이적 유전자들의 활성화, 지방구가 형성되며,<sup>5</sup> 세포 내 지방성분이 축적되어 비만을 초래하게 된다. 비만의 주요 원인으로는 에너지 과다 섭취, 에너지 소비 부족, 사회적 스트레스 등 여러 요인이 복합적으로 작용한다.<sup>6</sup> 이러한 요인들로 인해 비만 유병률이 높아지면서 비만 예방 및 억제에 대한 관심이 고조되고 있으며, 비만 예방 효과를 갖는 천연 물질 및 식품 소재, 식품 성분의 항비만 기능성에 대한 연구가 진행되고 있어, 식

Received: July 14, 2015 / Revised: July 30, 2015 / Accepted: August 13, 2015

\*This work was supported by grant from Jangan University in 2015.

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-31-299-3664, e-mail: e.young719@jangan.ac.kr

© 2015 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

사를 통한 비만 예방 및 치료 연구가 중요시 되고 있다.<sup>7,8</sup>

전통적으로 많이 소비되어 온 식품과 질병의 관련성에 대해서도 많은 연구가 진행되고 있는데, 특히 한국 음식의 양념류, 향신료로 많이 사용해 온 생강, 고추, 마늘, 양파에 함유되어 있는 천연 성분들의 생리 활성에 대해 국내·외적으로 역학조사 및 실험들이 진행되고 있다.<sup>9</sup> 그 중에서 생강은 우리나라에서 김치, 젓갈, 한과류, 음료, 다 (茶)류 등에 널리 이용되고 있으며, 한의학에서는 건위제, 구토, 복통, 설사 등의 치료제 및 살균제로 이용되어 오고 있다.<sup>10</sup> 생강의 약리 효능에 대한 연구는 생강의 비휘발성 매운맛 성분인 gingerol류, shogaol류, zingerone류 등에 대한 연구가 보고되고 있다. 생강의 약리 효능에 관한 연구는 생강 추출물인 gingerol이 DNA 손상 억제작용, 종양억제 및 소염작용, 생각의 essential oil을 이용하여 감기, 두통, 관절염 및 정신적 피로 등의 효과 연구와 (6)-gingerol의 체내 지질저하 효과, 항산화제로서의 작용 및 항균작용 등이 보고되고 있다.<sup>11-13</sup> 그러나, (6)-gingerol의 지방세포 증식과 분화과정 단계별 효과 연구는 찾기 어려웠다. 그러므로, 본 연구에서는 생강의 여러 성분 중에서 DNA 손상억제, 종양억제, 항산화 효과를 나타내는 매운맛 성분인 (6)-gingerol이 전구지방세포에서 3T3-L1 지방세포로 분화되는 과정의 세포 증식에 미치는 영향을 관찰해보고자 하였으며, 지방세포로의 초기, 중기, 후기 분화과정에 관여하는 유전자들과 지방세포에서만 분비되는 adipocytokine의 mRNA 발현을 통해 관찰해보았다. 지방세포 분화 관련 유전자는 분화초기과정의 대표적인 유전자인 C/EBP $\beta$ , 중기 유전자인 PPAR $\gamma$ , CEBP $\alpha$ , 후기 유전자인 FABP4, AP2 유전자 발현을 통해 각 분화 단계별 효과를 관찰하고자 하였고, adipocytokine 중에서 leptin과 adiponectin의 발현을 통해 생강의 대표적인 성분인 (6)-gingerol의 지방세포 분화 효과를 평가해보고자 하였다.

## 연구방법

### 세포 배양

실험에 사용된 mouse fibroblast 3T3-L1 preadipocyte는 한국세포주은행 (KCLB; Korean Cell Line Bank, 서울대학교 의과대학 암연구소, Seoul, Korea)에서 구입하였다. 세포는 습윤한 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (WelGENE, Daegu, Korea), 10% bovine serum albumin (BSA) (WelGENE), 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (P/S) (WelGENE)이 포함된 배양액에서 배양하였다. 세포가 90% 이상 confluence 되면 phosphate buffered saline

solution (PBS)로 2번 씻어내고 trypsin-EDTA (WelGENE)를 처리하여 세포를 모은 후 계대 배양하고 media는 2일마다 교환하였다.

지방세포로의 분화를 유도하기 위해서는 DMEM (WelGENE), 10% fetal bovine serum (FBS) (WelGENE), P/S, 10 µg/ml insulin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 1 µM dexamethasone (Dex) (Sigma), 0.5 mM isobutylmethylxanthine (IBMX) (Sigma)으로 지방세포로 분화를 유도하였다. 분화 후에는 DMEM, 10% FBS, P/S, insulin을 넣은 medium으로 분화를 유지시켰다.<sup>14,15</sup> (6)-gingerol은 Biomol (Plymouth Meeting, PA, USA)에서 구입하였으며, ethanol (Fisher scientific, Waltham, MA, USA)에 100 mM로 stock을 만들어 냉동 보관하여 사용하였다. 대조군을 포함한 모든 실험군에도 ethanol의 농도를 일정하게 처리하여 (6)-Gingerol만의 효과로 실험을 진행하였다. 분화 유도 후, 3T3-L1 세포에 (6)-gingerol을 0, 25, 50, 100 µmol/L로 처리하여 지방 세포의 증식과 분화과정 초기, 중기, 후기에 관여하는 유전자, adipocytokine의 mRNA 수준의 발현을 real time PCR을 통해 관찰해보았다.

### 세포 증식

(6)-Gingerol의 첨가 농도에 따른 세포 증식 효과를 알아보기 위해 96 well plate에 0.5×10<sup>4</sup> cells/ml의 농도로 plating 하고, 2일 후에 confluence 되면 insulin, Dex, IBMX를 처리하여 지방세포로 분화를 유도하였다. 유도 후에는 insulin만 처리된 post differentiation medium (PDM)으로 교체하여 분화를 유지시킨 후, (6)-gingerol을 0, 25, 50, 100 µmol/L로 처리하여 실험을 진행하였고, 배양액은 2일에 한 번씩 교체하였다. 세포 증식 실험은 분화 유도 후 PDM에 (6)-gingerol을 각 농도별로 처리한 후 EZ-Cytox cell viability assay kit (Daeil Lab, Seoul, Korea)을 이용하여 측정하였다. 측정은 PDM에 (6)-gingerol을 0, 25, 50, 100 µmol/L로 처리한 후 각각 0, 24, 48, 72시간마다 살아있는 세포의 흡광도를 측정하여 세포증식에 (6)-gingerol의 효과를 측정하였다. 흡광도 측정은 490 nm에서 spectrophotometer (Tecan Austria GmbH, USA)를 이용하여 측정하였다.<sup>16</sup>

### 지방분화 단계별 관련 유전자의 mRNA 발현

지방분화 단계별 관련 유전자의 mRNA를 확인하기 위해 Real time quantitative PCR을 실시하였다. 세포는 dish에 5×10<sup>4</sup> cells/ml의 농도로 plating하고, 2일 후에 분화유도물질을 처리하여 2일 동안 분화를 유도하였다. 2일 후 (6)-gingerol을 농도별로 처리하여 배양하고 4일 후, 세포의

배양액을 제거한 후 TRI reagent (Sigma)를 1 ml/dish 넣어 RNA를 추출하였다. 0.2 mL의 chloroform을 넣어 4°C, 10,500 rpm에서 15분간 원심분리 하여 얻어진 상층액과 동량의 isopropanol을 넣은 후 상온에서 방치한 후 4°C, 10,500 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 pellet은 70% ethanol로 세척한 후 충분히 건조시켰다. 건조시킨 pellet은 RNase-free dH<sub>2</sub>O/0.1 mM EDTA에 용해한 후 260 nm, 280 nm에서 흡광도를 측정하여 OD260/OD280 ratio RNA의 purity를 알아보고 OD260 값으로 RNA를 정량하였다. 정량된 RNA, oligo DT, Depc water를 첨가하여 총량을 같게 한 후 70°C에서 10분간 incubation 하고 reaction buffer를 첨가하여 42°C에서 5분간 incubation 한다. Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, CA, USA)을 첨가하여 42°C에서 1시간 45분, 70°C에서 15분간 incubation하여 cDNA를 합성하였다. Detector는 SYBR green Master Mix (Applied biosystems, CA, USA) 10 µL, sense/antisense primer (Table 1) 각각 1 µL, Dept Water 6 µL을 넣어 Applied Biosystems StepOne (Applied biosystems, CA, USA) software v2.1을 사용하여 real time PCR을 수행하였다. Data 는 Applied Biosystems StepOne (Applied biosystems) software v2.1에 내장되어 있는 프로그램을 이용하여  $\Delta\Delta$ CT 방법으로 분석하였으며, 3회 반복 실험하였다.<sup>17</sup>

## 통계 처리

본 연구의 실험으로 얻어진 결과는 SAS 프로그램을 이

**Table 1.** Sequence and RT-PCR program of transcription factor

Protein	Primer	Sequence
β-actin	Sense	5'-GTTTGAGACCTCAACACCCC-3'
	Antisense	5'-GTGGCCATCTCCTGCTCGAAGTC-3'
C/EBPβ	Sense	5'-ACTACGGTTACGTGAGCCTC-3'
	Antisense	5'-CAGCTGCTTGAACAAGTTC-3'
PPARγ	Sense	5'-ATGGAAGACCACTCGCATT-3'
	Antisense	5'-CATGGACACCATACTTGAG-3'
C/EBPα	Sense	5'-AGABATCAGCGCCTACATCG-3'
	Antisense	5'-TGTAGGTGCATGGTGGTCTG-3'
AP2	Sense	5'-AACACCGAGATTTCCTCAA-3'
	Antisense	5'-TCACGCCCTTCATAACACAT-3'
FABP4	Sense	5'-AGTGGGCTTGCCACAA-3'
	Antisense	5'-GGTGATTTCATCGAATCCA-3'
Leptin	Sense	5'-TGGAGACCCCTGTGTCGGT-3'
	Antisense	5'-AGCATTGAGGGCTAACATCCAAC-3'
Adiponectin	Sense	5'-CAGGATGCTACTGTGCAAGC-3'
	Antisense	5'-TGCAGTCAGTTGGTATCATGG-3'

T: thymine, A: adenin, C: cytosine, G: guanin

용하여 각 실험군의 평균과 표준 편차로 계산되었고, 각 군 간의 차이는 ANOVA 분석 후  $\alpha = 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하여 유의성을 검증하였다.<sup>18</sup>

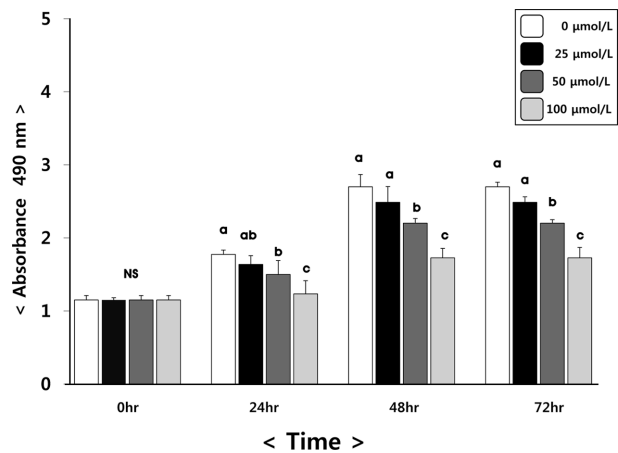
## 결 과

### 세포 증식

본 실험에서는 fibroblast 3T3-L1 세포에 insulin, IBMX, Dex를 처리하여 분화를 유도한 후, (6)-Gingerol을 0, 25, 50, 100 µmol/L로 처리하여 24시간마다 살아있는 세포를 염색하여 흡광도를 측정하였다. 실험 결과, (6)-gingerol을 처리한 24시간 후부터 세포 증식이 유의적으로 억제되는 것이 관찰되었다. (6)-gingerol을 처리한 후 24시간 후, (6)-gingerol을 50 µmol/L로 처리한 군에서는 대조군에 비해 15.5%만큼 세포의 수가 줄어들었으며, 100 µmol/L에서는 유의적으로 30.5% 세포의 수가 감소된 것이 관찰되었다. 48시간 후에도 처리 농도가 증가할수록 7.9%, 18.4%, 34.8%로 세포 증식이 억제되었으며, 72시간 후에는 처리 농도 50, 100 µmol/L 농도에서 대조군에 비해 18.5%, 36.1%로 세포 증식이 유의적으로 억제되는 것이 관찰되었다 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1).

### 지방분화 단계별 관련 유전자의 mRNA 발현

지방분화 관련 mRNA 실험의 housekeeping 유전자는



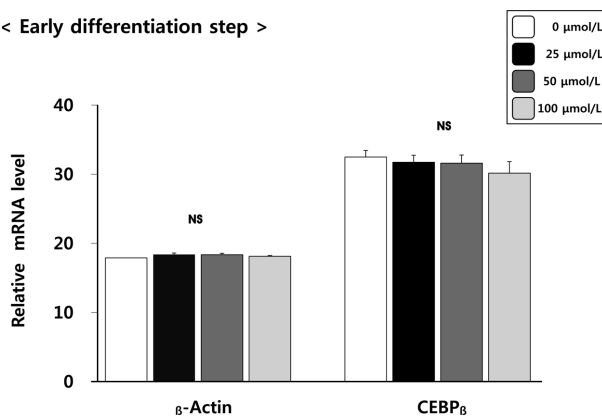
**Fig. 1.** Effect of (6)-gingerol on cell proliferation in 3T3-L1 preadipocyte. 3T3-L1 cells were plated at a density of  $0.5 \times 10^4$  cell/mL in a 96 well plate with DMEM supplemented with 10% BCS for 2 day, the monolayers were differentiation induction with DMEM supplemented with 10% FBS, 10 µg/ml insulin, 1 µM/ml Dex, 0.5 mM/ml IBMX for 2 day. After differentiation induction, the monolayer were incubated in postdifferentiation medium with 0, 25, 50, 100 µM (6)-gingerol. Viable cell numbers were estimated by the EZ-Cytox cell viability assay. Each bar represents the mean  $\pm$  SE. Comparison among different concentration of  $\alpha$ -lipoic acid that yielded significant differences ( $p < 0.05$ ) are indicated by different letters above each bar.

$\beta$ -actin으로 사용하였고, 실험군과 대조군의 RNA 양이 동일한 상태에서 실험이 진행된 것을 확인한 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2) 후, 각각의 유전자 발현을 관찰하였다. (6)-Gingerol을 0, 25, 50, 100  $\mu\text{mol/L}$ 로 처리한 후, 분화 초기 단계를 대표하는 C/EBP $\beta$ 의 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해 (6)-gingerol을 처리한 실험군에서 C/EBP $\beta$  발현에는 아무런 변화가 관찰되지는 않아 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2) 유의적인 차이가 관찰되지는 않았다.

분화 중기 단계를 관여하는 유전자인 PPAR $\gamma$ 의 경우 (6)-gingerol의 처리 농도가 50  $\mu\text{mol/L}$ 에서부터 유의적으로 발현이 감소되었고 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3), 이 결과는 (6)-gingerol을 처리하지 않은 대조군에 비해 50  $\mu\text{mol/L}$ 은 10.4%, 100  $\mu\text{mol/L}$ 에서는 42.8% 발현이 유의적으로 감소되는 것이 관찰되었다. 분화 중기 단계를 관여하는 또 다른 유전자인 C/EBP $\alpha$ 의 경우는 (6)-gingerol을 처리한 실험군 100  $\mu\text{mol/L}$ 에서만 유의적인 차이가 나타났으며 이는 대조군에 비해 13.9% 발현이 감소되었다 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3).

분화 후기 유전자인 Fatty acid binding protein 4 (FABP4)의 경우 (6)-gingerol의 처리 농도별로 유의적으로 발현이 감소되었다. (6)-gingerol을 25  $\mu\text{mol/L}$ 로 처리한 실험군은 대조군에 비해 8.9% 발현이 감소되었고, 50, 100  $\mu\text{mol/L}$  (6)-gingerol 실험군은 대조군에 비해 유의적으로 35.7%, 43.2%로 발현이 억제되는 것이 관찰되었다 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 4). Activating protein 2 (AP2) 유전자의 경우

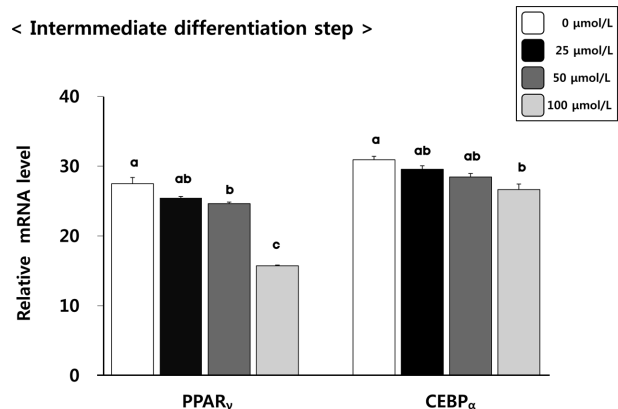
#### < Early differentiation step >



**Fig. 2.** Effects of (6)-gingerol on mRNA expression of  $\beta$ -actin and C/EBP $\beta$  expression in 3T3-L1 adipocyte. Total RNA was isolated using TRI-reagent and cDNA was synthesized using 3  $\mu\text{g}$  of total RNA with SuperScript II reverse transcriptase. Realtime PCR was performed using SYBR green and standard procedures to assess the mRNA expression of primer in liver samples obtained from each group. An Applied Biosystem StepOne software v2.1 was used. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of three independent experiments. Different letters above each bar indicate significant differences among groups at  $\alpha=0.05$  as determined by Duncan's multiple range test.

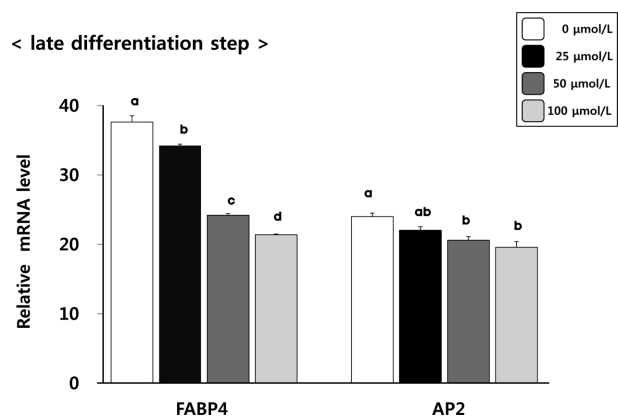
에는 (6)-gingerol 처리 농도가 50  $\mu\text{mol/L}$  농도에서부터 대조군에 비해 발현이 유의적으로 감소되었으며, 대조군에 대한 감소율은 50  $\mu\text{mol/L}$  실험군은 85.7%, 100  $\mu\text{mol/L}$ 에서는 81.6%로 발현이 유의적으로 감소되었다 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 4).

#### < Intermediate differentiation step >



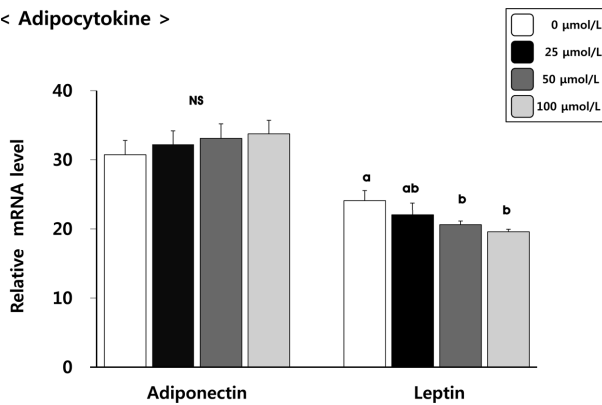
**Fig. 3.** Effects of (6)-gingerol on mRNA expression of PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  expression in 3T3-L1 adipocyte. Total RNA was isolated using TRI-reagent and cDNA was synthesized using 3  $\mu\text{g}$  of total RNA with SuperScript II reverse transcriptase. Realtime PCR was performed using SYBR green and standard procedures to assess the mRNA expression of primer in liver samples obtained from each group. An Applied Biosystem StepOne software v2.1 was used. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of three independent experiments. Different letters above each bar indicate significant differences among groups at  $\alpha=0.05$  as determined by Duncan's multiple range test.

#### < late differentiation step >



**Fig. 4.** Effects of (6)-gingerol on mRNA expression of FABP4 and AP2 expression in 3T3-L1 adipocyte. Total RNA was isolated using TRI-reagent and cDNA was synthesized using 3  $\mu\text{g}$  of total RNA with SuperScript II reverse transcriptase. Realtime PCR was performed using SYBR green and standard procedures to assess the mRNA expression of primer in liver samples obtained from each group. An Applied Biosystem StepOne software v2.1 was used. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of three independent experiments. Different letters above each bar indicate significant differences among groups at  $\alpha=0.05$  as determined by Duncan's multiple range test.

## &lt; Adipocytokine &gt;



**Fig. 5.** Effects of (6)-gingerol on mRNA expression of leptin and adiponectin expression in 3T3-L1 adipocyte. Total RNA was isolated using TRI-reagent and cDNA was synthesized using 3 μg of total RNA with SuperScript II reverse transcriptase. Realtime PCR was performed using SYBR green and standard procedures to assess the mRNA expression of primer in liver samples obtained from each group. An Applied Biosystem StepOne software v2.1 was used. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of three independent experiments. Different letters above each bar indicate significant differences among groups at  $\alpha=0.05$  as determined by Duncan's multiple range test.

분화 후 지방세포에서만 특이적으로 분비되는 adipocytokine 중 가장 대표적인 adiponectin, leptin에도 (6)-gingerol이 영향을 미치는 알아보았다. (6)-gingerol 처리에 따른 3T3-L1에서의 adiponectin mRNA 발현을 분석한 결과 대조군에 비해 (6)-gingerol을 처리한 실험군 모두에서 유의적인 차이가 관찰되지는 않았다 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 5). 그러나 leptin의 경우 (6)-gingerol 처리 농도가 50 μmol/L 농도에서부터 대조군에 비해 발현이 유의적으로 감소되었으며, 대조군에 대한 감소율은 50 μmol/L 실험군은 86.7%, 100 μM에서는 78.9%로 발현이 유의적으로 감소되었다.

여러 논문을 통해 밝혀진 leptin과 adiponectin 발현 및 분비량은 축적된 지방량에 따라 두 adipocytokine은 상반되는 결과를 나타낸다고 하였다.<sup>5</sup> 본 연구에서도 (6)-gingerol의 처리 농도에 따라 adiponectin의 발현은 유의적인 차이가 관찰되지는 않았으나, 대조군에 비해 leptin은 실험군의 발현이 유의적으로 감소되는 것으로 볼 때, (6)-gingerol의 처리는 지방세포에서만 특이적으로 발현되는 adipocytokine의 발현에도 상당한 효과가 있는 것으로 관찰되어진다.

## 고 찰

본 연구에서는 생강 성분 중 DNA 손상억제, 종양억제, 항산화 효과 등이 보고되고 있는 (6)-gingerol이 전구지방

세포에서 3T3-L1 지방세포로 분화되는 과정의 세포 증식 억제 효과와 지방세포로의 분화과정 초기, 중기, 후기의 각 단계별 관련 유전자 발현과 지방세포에서만 특이적으로 발현되는 adipocytokine의 발현을 통해 (6)-gingerol의 처리 효과를 관찰해 보고자하였다.

전구지방세포 (preadipocyte)에서 지방세포 (adipocyte)로의 분화는 뚜렷한 형태학적, 생화학적인 변화를 나타내게 되는데, 이 분화과정에는 약 100가지 이상의 단백질 발현이 변화하게 되고, triglyceride의 양이 뚜렷이 증가되며, 지방세포 특이적 단백질들의 발현을 통해 이루어진다.<sup>3,4,19</sup> 본 연구 결과 Fig. 1에서 나타난 것처럼 지방분화 유도 물질을 처리한 후 24시간 마다 세포의 수를 측정하여 세포증식을 관찰해본 결과, (6)-gingerol을 처리하지 않은 대조군에서는 0 hr에 비해 24, 48, 72 hr에 세포 증식이 55%, 135%, 180%로 증가되었다. 이에 비해 (6)-gingerol을 처리한 실험군에서는 세포 증식이 유의적으로 억제되는 것이 관찰되었다. Sivakumar와 Sivakumar<sup>20</sup>의 연구에 따르면 후추과 과일인 Piper longum, Piper nigrum, 생강 (Zingiber officinale)을 섞어 분말 형태로 만들어 식이로 유도된 고콜레스테롤혈증 수컷 rattus에게 공급했을 때 체중이 감소되었다고 하였으며, Goyal와 Kadnur<sup>21</sup>도 methanol과 ethyl acetate에 의해 얻은 생강 추출물 250 mg/kg을 8주간 mouse에게 공급했을 때 체중 증가가 유의적으로 억제되었다고 하였다. 본 연구 결과에서도 관찰된 것처럼 (6)-gingerol의 처리는 지방세포 증식을 억제하는 효과가 있는 것으로 보여진다.

전구지방세포에서 지방세포로의 분화과정은 크게 세 단계로 이루어지는데, 각 단계별로 관여하는 전사인자들의 조절에 의해 분화 과정이 유도된다. C/EBPβ, δ는 각각 분화 유도 물질인 IBMX와 Dex에 의해 분화 초기 과정에 관여하는데, 특히 C/EBPβ는 지방세포 전 단계 (preadipocyte)에서는 발현되지 않고 지방세포로 분화되는 과정에서 발현되기 시작하는 것이 특징적이다<sup>22</sup>. 또한 C/EBPβ는 지방세포와 관련된 많은 유전자들의 활성화를 조절하여 분화 초기 과정을 이끄는 중요한 전사인자로 알려져 있다.<sup>23,24</sup> 그러나 본 실험에서는 (6)-gingerol을 처리한 후 지방 분화 초기를 관여하는 C/EBPβ 발현을 관찰해본 결과, 대조군에 비해 유의적인 차이가 관찰되지는 않았으며, 이 결과는 지방 분화 초기를 관여하는 여러 유전자들 중 대표적인 유전자인 C/EBPβ 발현만으로 (6)-gingerol의 지방분화 초기 단계 효과를 평가하는 것에는 한계적이라 할 수 있다.

분화 중기 단계는 C/EBPα와 PPARγ 유전자가 발현되면서 여러 지방 세포 특이적 전사인자들의 활성화로 분화가 본격화되는데, 이 중 C/EBPα는 지방형성 후에 관여하는

유전인자로 대부분 성숙된 지방세포에서 많이 발현되며, 인슐린에 따라 포도당 유입을 조절하는 중요한 작용을 한다.<sup>25</sup> 또한, C/EBP $\alpha$ 는 세포 성장과 분화 사이의 균형을 조절하는 인자로 여러 대사작용에 관여하는 전사인자들을 직접 활성화시켜 에너지대사작용에 조절자 역할을 하며,<sup>26-29</sup> 종양 억제자로도 작용하여 몇몇 종양 세포에서는 C/EBP $\alpha$ 의 발현이 감소되는 것으로 보고되고 있다.<sup>30,31</sup>

퍼옥시좀 성장제를 리간드 (연결물질, ligand)로 하는 핵안의 수용체를 총칭하는 PPARs는  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ 의 세 종류가 있으며, 그 중 PPAR $\gamma$ 는 PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2인 두 개의 이성체가 존재하는데, PPAR $\gamma$ 2는 30개의 아미노산으로 되어 있으며, PPAR $\gamma$ 1 보다 지방 세포에서 더 중요한 이성체로 작용한다.<sup>32,33</sup> 본 연구 결과 Fig. 3과 같이 분화 유도 후 (6)-gingerol을 100  $\mu$ mol/L 이상으로 처리하였을 때 PPAR $\gamma$ 의 발현은 대조군에 비해 42.8% 감소되었으며, C/EBP $\alpha$ 의 발현은 13.9% 낮아졌다. Ohnishi 등<sup>34</sup>은 생강의 씨앗과 뿌리에서 얻은 성분을 지방세포인 3T3-L1에 처리하였을 때 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ 의 발현이 감소되었으며 이 경로를 통해 지방세포 내 지방 축적이 억제되었다고 하였다. 그러나 Isa 등<sup>35</sup>은 생강성분 중 (6)-shogaol과 (6)-gingerol을 각각 3T3-L1에 처리하였을 때 (6)-shogaol 처리군에서만 PPAR $\gamma$  전사인자 기능이 억제되었으며, (6)-gingerol을 처리한 실험군에서는 유의적인 차이가 관찰되지 않았으나, c-Jun-NH-terminal kinase signal 활성화에 관여하여 비만관련 유전자들을 효과적으로 조절하였다고 하였다. Vidal-Puig 등<sup>36</sup>은 설치류를 이용한 실험에서 공복상태와 인슐린 부족 상태에서 PPAR $\gamma$ 의 발현은 감소되며, 고지방식이에서는 그 발현이 증가되었다고 하였다. 또한, 비만인을 대상으로 한 연구에서 PPAR $\gamma$ 는 주로 지방조직에서 발현되며 발현 정도는 체질량지수와 지방량과의 양의 상관관계를 갖는다고 하였다.<sup>37</sup> Tzeng 등<sup>38</sup>은 rosiglitazone으로 지방분화가 유도된 3T3-L1세포에 (6)-gingerol을 50  $\mu$ mol/L 처리하였을 때 PPAR $\gamma$ , CEBP $\alpha$ 의 단백질과 mRNA 발현이 감소되었다고 하였다. 이러한 연구결과들과 본 연구결과에서 관찰된 것처럼 (6)-gingerol의 처리는 지방분화 중기 단계를 조절하는 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 mRNA 발현을 억제하는 효과가 있는 것으로 관찰되었다.

분화 후기 단계는 FABP4와 AP2 유전자가 발현되면서 지방세포로의 분화가 완성되는데, 이 두 유전자는 성숙된 지방세포에서만 과다하게 발현되는 유전자이다. 그 중 FABP4 유전자는 대사증후군과 관련된 여러 질환의 의학적 biomarker로 이용되며 adipocyte FABP (A-FABP)로 알려져 있을 만큼 지방조직과 성숙한 지방세포에서만 감지되는 유전자이며, 세포 내 FABP4 유전자의 발현 양은 지

방산의 대사비율에 비례한다고 보고되고 있다.<sup>39,40</sup>

Hotamisligil 등<sup>41</sup>과 Uysal 등<sup>42</sup>의 연구에 따르면 고지방 식이로 비만을 유도한 mouse와 유전적으로 비만한 mouse에서 FABP4 유전자를 결핍시켰을 때 체중은 증가되었으나 인슐린 저항성은 유의적으로 감소되었다고 하였다. FABP4와 같이 지방세포 분화 후기 과정을 조절하는 AP2 유전자는 체계적 대사작용을 조절하는 adipokine과 같은 역할을 하는데, Tzeng 등<sup>43</sup>은 분화 배양액과 5-15  $\mu$ g/ml 6-gingerol을 3T3-L1에 처리했을 때 aP2 유전자 단백질 발현이 감소되었다고 하였다. 본 연구에서도 (6)-gingerol을 50  $\mu$ mol/L 이상으로 처리하였을 때 FABP4, AP2 mRNA 발현이 유의적으로 감소되었다. 그러므로, (6)-gingerol의 처리는 3T3-L1의 지방세포 분화 후기 과정을 억제하는 효과적으로 억제한다고 할 수 있다.

마지막으로 지방세포에서만 분비되는 adipocytokine의 발현에 (6)-gingerol의 처리 효과도 관찰해보았다. Adipocytokine은 지방세포에서만 분비되는 cytokine으로 leptin, adiponectin이 가장 대표적이다. 이 중 leptin은 식품 섭취를 억제하고 thermogenesis (열발생)를 자극하는 역할을 하며,<sup>44</sup> adiponectin의 경우 항동맥경화성, 항염증성, 항당뇨성 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>45</sup> Saravanan 등<sup>46</sup>의 연구에서 보면, 고지방식으로 비만을 유도한 후 25, 50, 75 mg/kg(-1) gingerol을 30일간 경구 투여하였을 때 정상식이군에 비해 leptin의 수준이 감소되었으며 이 결과는 25, 50 mg/kg(-1)를 투여한 그룹에 비해 75 mg/kg(-1)을 투여한 군에서 더 효과적으로 감소되었다고 하였다. Okamoto 등<sup>47</sup>의 연구에서도 생강의 주요 화학 성분인 (6)-gingerol 유사체 (6G)와 소화 후 위 내에서 안정적인 (6)-gingerol 유사체인 aza-(6)-gingerol (A6G)를 식이로 비만이 유도된 설치류에 고지방식이와 함께 제공하였을 때 체중 증가율과 지방 축적, insulin과 leptin이 효과적으로 감소되었으며, 그 효과는 6G보다 A6G 처리군에서 더 효과적이었다고 하였다. Isa 등<sup>35</sup>의 연구에서도 생강 성분의 대표적인 유도체인 (6)-gingerol (6G)과 (6)-shogaol (6S)의 처리가 adiponectin의 발현이 낮은 성숙한 지방세포인 3T3-L1에 각각 처리하였을 때 TNF- $\alpha$ 를 유의적으로 억제하였으며 이러한 효과는 (6)-shogaol에서 더 뚜렷이 나타났다고 하였다. 본 연구 결과에서도 (6)-gingerol의 처리가 leptin의 발현을 유의적으로 감소하였으나, adiponectin은 유의적인 차이가 나타나지는 않았다. 그러나, leptin/adiponectin ratio로 다시 계산해보면 (6)-gingerol을 25  $\mu$ mol/L로 처리한 실험군은 대조군에 비해, 87.3% 감소되었고, 50, 100  $\mu$ mol/L을 처리한 실험군에서는 각각 79.5, 74.1%로 낮아진 것으로 볼 때, (6)-gingerol의 처리는 adipocytokine의 발현에도



효과적이라고 할 수 있다. 이상의 결과들을 종합해 볼 때, preadipocyte에 분화유도 물질인 MDI와 (6)-gingerol을 처리하면 지방세포로의 분화과정 중 분화 초기과정에는 효과가 나타나지 않았지만, 지방세포로의 변화가 가속화되는 중기 이후에는 (6)-gingerol의 처리가 분화 과정을 유의적으로 억제하였으며, 지방세포에서만 특이적으로 발현되는 adipocytokine의 발현에도 효과적인 변화가 나타났다. 이러써 전통적인 한국 음식의 향신료, 양념류, 다 (茶)류로 이용되어 온 생강의 대표적인 성분인 (6)-gingerol은 비만을 억제하는 예방적인 효과보다는 비만이 유도된 후 치료제로의 개발가능성이 관찰되었으며, 이를 위해서 동물과 인체를 대상으로 한 폭넓은 연구와 안정성 연구가 수반되어질 것이 요구된다.

## 요 약

본 연구에서는 한국 음식의 양념류, 향신료로 많이 사용되는 생강의 여러 성분 중 (6)-gingerol을 3T3-L1 preadipocyte에 처리하였을 때 지방세포의 증식과 분화되는 과정에 미치는 영향에 대해 관찰해보고자 하였다. 실험 결과 (6)-gingerol의 첨가량이 증가할수록 세포의 증식이 유의적으로 억제되었다. 지방 분화과정 중에서의 (6)-gingerol은 분화초기에는 효과가 나타나지 않았지만, 지방세포로의 변화가 가속화되는 중기 과정에 관여하는 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ 는 (6)-gingerol의 처리로 두 유전자의 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었고, 후기 관련 유전자인 FABP4, AP2의 발현도 (6)-gingerol의 처리군에서 발현이 유의적으로 감소되었다. 또한, 지방세포에서만 분비되는 adipocytokine 중 leptin 발현에는 (6)-gingerol의 처리가 유의적으로 억제되었으나, adiponectin의 경우에는 유의적인 효과는 나타나지 않았다.

## References

- Hirsch J, Batchelor B. Adipose tissue cellularity in human obesity. Clin Endocrinol Metab 1976; 5(2): 299-311.
- Harmon AW, Harp JB. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. Am J Physiol Cell Physiol 2001; 280(4): C807-C813.
- Ross SR, Graves RA, Greenstein A, Platt KA, Shyu HL, Mellovitz B, Spiegelman BM. A fat-specific enhancer is the primary determinant of gene expression for adipocyte P2 in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 1990; 87(24): 9590-9594.
- Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. Genes Dev 1994; 8(10): 1224-1234.
- Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. J Biol Chem 1998; 273(46): 30057-30060.
- Yoshitoshi Y, Naito C, Oda T. The cause and treatment of obesity. Naika 1964; 13: 287-298.
- Noh SK. Functional action of flavonoids for treatment of obesity. Food Ind Nutr 2002; 7(2): 27-29.
- Lee SY. Recent advance in drug therapy of obesity. Proceedings of the Korean Society of Applied Pharmacology Spring Symposium 2001; 2001 Apr 13; Kyung Hee University. Seoul: Korean Society of Applied Pharmacology; 2001. p. 3-30.
- Beaulieu JF, Quaroni A. Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. Biochem J 1991; 280(Pt 3): 599-608.
- Mathew AG, Krishnamurthy N, Nambudiri ES, Lewis YS. Oil of ginger. Flavour Ind 1973; 4(5): 226-232.
- Kang JH, Ahn BW, Lee DH, Byun HS, Kim SB, Park YH. Inhibitory effects of ginger and garlic extracts on the DNA damage. Korean J Food Sci Technol 1988; 20(3): 287-292.
- Katiyar SK, Agarwal R, Mukhtar H. Inhibition of tumor promotion in SENCAR mouse skin by ethanol extract of *Zingiber officinale* rhizome. Cancer Res 1996; 56: 1023-1030.
- Shin JH, Lee SJ, Sung NJ. Effects of *Zingiber mioga*, *Zingiber mioga* root and *Zingiber officinale* on the lipid concentration in hyperlipidemic rats. J Korean Soc Food Sci Nutr 2002; 31(4): 679-684.
- Kang NE, Ha AW, Kim JY, Kim WK. Resveratrol inhibits the protein expression of transcription factors related adipocyte differentiation and the activity of matrix metalloproteinase in mouse fibroblast 3T3-L1 preadipocytes. Nutr Res Pract 2012; 6(6): 499-504.
- Kwon SY, Kang KJ. The effect of conjugated linoleic acid isomers on the cell proliferation, apoptosis and expressions of uncoupling protein (UCP) genes during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. Korean J Nutr 2004; 37(7): 533-539.
- Kim MJ, Yoo YC, Kim HJ, Shin SK, Sohn EJ, Min AY, Sung NY, Kim MR. Aged black garlic exerts anti-inflammatory effects by decreasing pro and proinflammatory cytokine production with less cytotoxicity in LPS-stimulated raw 264.7 macrophages and LPS-induced septicemia mice. J Med Food 2014; 17(10): 1057-1063.
- Kim WK, Kim JH, Jeong da H, Chun YH, Kim SH, Cho KJ, Chang MJ. Radish (*Raphanus sativus* L. leaf) ethanol extract inhibits protein and mRNA expression of ErbB(2) and ErbB(3) in MDA-MB-231 human breast cancer cells. Nutr Res Pract 2011; 5(4): 288-293.
- Chu SK, Seo EY, Kim WK, Kang NE. Effect of cyanidin on cell motility and invasion in MDA-MB-231 human breast cancer cells. Korean J Nutr 2008; 41(8): 711-717.
- Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. Genes Dev 2000; 14(11): 1293-1307.
- Sivakumar V, Sivakumar S. Effect of an indigenous herbal compound preparation 'Trikatu' on the lipid profiles of atherogenic diet and standard diet fed Rattus norvegicus. Phytother Res 2004; 18(12): 976-981.
- Goyal RK, Kadnur SV. Beneficial effects of *Zingiber officinale* on goldthioglucose induced obesity. Fitoterapia 2006; 77(3): 160-163.
- Lekstrom-Himes J, Xanthopoulos KG. Biological role of the

- CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem* 1998; 273(44): 28545-28548.
23. Hendricks-Taylor LR, Bachinski LL, Siciliano MJ, Fertitta A, Trask B, de Jong PJ, Ledbetter DH, Darlington GJ. The CCAAT/enhancer binding protein(C/EBP  $\alpha$ ) gene (CEBPA) maps to human chromosome 19q13.1 and the related nuclear factor NF-IL6 (C/EBP  $\beta$ )gene (CEBPB) maps to human chromosome 20q13.1. *Genomics* 1992; 14(1): 12-17.
  24. Zhang DE, Zhang P, Wang ND, Hetherington CJ, Darlington GJ, Tenen DG. Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein  $\alpha$ -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(2): 569-574.
  25. Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM. Cross-regulation of C/EBP  $\alpha$  and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell* 1999; 3(2): 151-158.
  26. Johansen LM, Iwama A, Lodie TA, Sasaki K, Felsher DW, Golub TR, Tenen DG. c-Myc is a critical target for c/EBP $\alpha$  in granulopoiesis. *Mol Cell Biol* 2001; 21(11): 3789-3806.
  27. McKnight SL. McBindall—a better name for CCAAT/enhancer binding proteins? *Cell* 2001; 107(3): 259-261.
  28. Sugahara K, Iyama KI, Kimura T, Sano K, Darlington GJ, Akiba T, Takiguchi M. Mice lacking CCAAT/enhancer-binding protein- $\alpha$  show hyperproliferation of alveolar type II cells and increased surfactant protein mRNAs. *Cell Tissue Res* 2001; 306(1): 57-63.
  29. Takai N, Kawamata N, Walsh CS, Gery S, Desmond JC, Whittaker S, Said JW, Popoviciu LM, Jones PA, Miyakawa I, Koeffler HP. Discovery of epigenetically masked tumor suppressor genes in endometrial cancer. *Mol Cancer Res* 2005; 3(5): 261-269.
  30. Tada Y, Brena RM, Hackanson B, Morrison C, Otterson GA, Plass C. Epigenetic modulation of tumor suppressor CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  activity in lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(6): 396-406.
  31. Nerlov C. C/EBP $\alpha$  mutations in acute myeloid leukaemias. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(5): 394-400.
  32. Zhu Y, Qi C, Korenberg JR, Chen XN, Noya D, Rao MS, Reddy JK. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR $\gamma$ ) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR $\gamma$  isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(17): 7921-7925.
  33. Vidal-Puig A, Jimenez-Liñan M, Lowell BB, Hamann A, Hu E, Spiegelman B, Flier JS, Moller DE. Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest* 1996; 97(11): 2553-2561.
  34. Ohnishi R, Matsui-Yuasa I, Deguchi Y, Yaku K, Tabuchi M, Munakata H, Akahoshi Y, Kojima-Yuasa A. 1'-acetoxychavicol acetate inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and in high fat-fed rats. *Am J Chin Med* 2012; 40(6): 1189-1204.
  35. Isa Y, Miyakawa Y, Yanagisawa M, Goto T, Kang MS, Kawada T, Morimitsu Y, Kubota K, Tsuda T. 6-Shogaol and 6-gingerol, the pungent of ginger, inhibit TNF- $\alpha$  mediated downregulation of adiponectin expression via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 373(3): 429-434.
  36. Vidal-Puig A, Jimenez-Liñan M, Lowell BB, Hamann A, Hu E, Spiegelman B, Flier JS, Moller DE. Regulation of PPAR $\gamma$  gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest* 1996; 97(11): 2553-2561.
  37. Vidal-Puig A, Considine RV, Jimenez-Liñan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF, Flier JS. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest* 1997; 99(10): 2416-2422.
  38. Tzeng TF, Chang CJ, Liu IM. 6-gingerol inhibits rosiglitazone-induced adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Phytother Res* 2014; 28(2): 187-192.
  39. Spiegelman BM, Frank M, Green H. Molecular cloning of mRNA from 3T3 adipocytes. Regulation of mRNA content for glycerophosphate dehydrogenase and other differentiation-dependent proteins during adipocyte development. *J Biol Chem* 1983; 258(16): 10083-10089.
  40. Hunt CR, Ro JH, Dobson DE, Min HY, Spiegelman BM. Adipocyte P2 gene: developmental expression and homology of 5'-flanking sequences among fat cell-specific genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83(11): 3786-3790.
  41. Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ, Ellis R, Papaioannou VE, Spiegelman BM. Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science* 1996; 274(5291): 1377-1379.
  42. Uysal KT, Scheja L, Wiesbrock SM, Bonner-Weir S, Hotamisligil GS. Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. *Endocrinology* 2000; 141(9): 3388-3396.
  43. Tzeng TF, Liu IM. 6-gingerol prevents adipogenesis and the accumulation of cytoplasmic lipid droplets in 3T3-L1 cells. *Phytomedicine* 2013; 20(6): 481-487.
  44. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995; 269(5223): 543-546.
  45. Tyagi N, Givvimani S, Qipshidze N, Kundu S, Kapoor S, Vacek JC, Tyagi SC. Hydrogen sulfide mitigates matrix metalloproteinase-9 activity and neurovascular permeability in hyperhomocysteinemic mice. *Neurochem Int* 2010; 56(2): 301-307.
  46. Saravanan G, Ponmurugan P, Deepa MA, Senthilkumar B. Anti-obesity action of gingerol: effect on lipid profile, insulin, leptin, amylase and lipase in male obese rats induced by a high-fat diet. *J Sci Food Agric* 2014; 94(14): 2972-2977.
  47. Okamoto M, Irii H, Tahara Y, Ishii H, Hirao A, Udagawa H, Hiramoto M, Yasuda K, Takanishi A, Shibata S, Shimizu I. Synthesis of a new [6]-gingerol analogue and its protective effect with respect to the development of metabolic syndrome in mice fed a high-fat diet. *J Med Chem* 2011; 54(18): 6295-6304.