



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

석사학위논문

HepG2세포에서 제주조릿대
(*Sasa queipaertensis* Nakai)의
지질대사 개선 작용

제주대학교 대학원

생물학과

김정환

2013년 2월

HepG2세포에서 제주조릿대
(*Sasa queipaertensis* Nakai)의
지질 대사 개선 작용

지도교수 김 세 재

김 정 환

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2013년 2월

김정환의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ ①

위 원 _____ ①

위 원 _____ ①

제주대학교 대학원

2013년 2월

Lipid metabolism modulating properties of Jeju
dwarf bamboo (*Sasa quepaertensis* Nakai)
in HepG2 Cells

Jeong-Hawn Kim
(Supervised by Professor Se-Jae Kim)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of
Master of Science

2013. 2

This thesis has been examined and approved

Chairperson of the Committee

Date

Department of Biology
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

ABSTRACT

Jeju dwarf bamboo (*Sasa quepaertensis* Nakai) is a native Korean plant that grows only on Mt. Halla on JeJu island. Its leaf has been used as traditional medicine due to several beneficial properties. This study was performed to investigate the effects of Jeju dwarf bamboo extract (JBE) and its constituent, *p*-coumaric acid (CA) on lipid metabolism in HepG2 cells. The lipid accumulation in HepG2 cells was induced by oleic acid treatment (600 μ M). In lipid accumulated HepG2 cells, JBE and CA increased the phosphorylation of AMP-activated protein kinase (AMPK) and its substrate acetyl-CoA carboxylase (ACC). Real-time PCR analysis showed that JBE and CA increased the expression of carnitine palmitoyl transferase 1A (CPT1A) mRNA, suggesting that they promote the fatty acid β -oxidation. Also, JBE and CA decreased the lipid accumulation through decreasing the expression of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) and fatty acid synthase (FAS). Furthermore, these effects of JBE and CA were reduced by pretreatment of AMPK activation inhibitor, Compound C. Taken together, these results suggest that JBE and CA modulate the lipid metabolism in HepG2 cells via AMPK activation pathway.

Key word : *Sasa quepaertensis* Nakai, *p*-coumaric acid, HepG2 cell, AMP-activated protein kinase (AMPK), fatty acid oxidation, fatty acid synthesis

목 차

A B S T R A C T	-----	i
목 차	-----	ii
LIST OF TABLES	-----	iv
LIST OF FIGURES	-----	v
I. 서 론	-----	1
II. 재 료 및 방 법	-----	4
1. 재 료 및 추 출	-----	4
2. 세 포 배 양	-----	4
3. MTT 분 석	-----	4
4. LDH 분 석	-----	5
5. 지 방 축 적 유 도	-----	6
6. Oil Red O 염 색	-----	6
7. Western blot	-----	6
8. RNA 분 리 및 Real-time PCR	-----	7
9. TG 함 량 분 석	-----	8
10. 통 계 처 리	-----	9

III. 결	과	-----	11
1.	HepG2 세포에서 지방축적 유도	-----	11
2.	제주조릿대 추출물(JBE)과 <i>p</i> -coumaric acid (CA)의 AMPK 활성화 작용	-----	14
1)	지방산 산화 경로 촉진 작용	-----	17
2)	지방산 합성 저해 작용	-----	24
3)	AMPK 활성화 억제제 실험	-----	29
IV. 고	찰	-----	32
V. 참	고 문 헌	-----	34
VI. 요	약	-----	40

LIST OF TABLES

Table 1. The primer sequences of the genes used in Real-time PCR

----- 10

LIST OF FIGURES

Figure 1. Cytotoxicity of the oleic acid (OA) on HepG2 Cells	12
Figure 2. Effects of OA on lipid accumulation in HepG2 Cells	13
Figure 3. Cytotoxicity of the Jeju dwarf bamboo extract (JBE) on HepG2 Cells	15
Figure 4. Cytotoxicity of the <i>P</i> -coumaric acid (CA) on HepG2 Cells	16
Figure 5. Effects of JBE on AMPK and ACC phosphorylation in HepG2 Cells	18
Figure 6. Effects of JBE on AMPK and ACC phosphorylation in HepG2 Cells	19
Figure 7. Effects of JBE on CPT1A gene expression in HepG2 Cells	20
Figure 8. Effects of CA on AMPK and ACC phosphorylation in HepG2 Cells	21
Figure 9. Effects of CA on AMPK and ACC phosphorylation in HepG2 Cells	22

Figure 10. Effects of CA on CPT1A gene expression in HepG2 Cells	-----	23
Figure 11. Effects of JBE on the expression of SREBP-1c, FAS and SCD1 in HepG2 Cells	-----	25
Figure 12. Effects of CA on the expression of SREBP-1c and FAS in HepG2 Cells	-----	26
Figure 13. Effects of JBE on TG accumulation in HepG2 Cells	-----	27
Figure 14. Effects of CA on TG accumulation in HepG2 Cells	-----	28
Figure 15. Effect of Compound C on the phosphorylation of AMPK, ACC, and expression of SREBP-1c and FAS in HepG2 Cells	-----	30
Figure 16. Effect of Compound C on the phosphorylation of AMPK and ACC in HepG2 Cells	-----	31

I. 서 론

전 세계적으로 비만 인구가 증가하면서 비알코올성 간질환 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD, 이하 지방간질환)도 증가하고 있는 추세이다 (Ahmed *et al.*, 2007). 정상인에서 비알코올성 간질환의 유병률은 17~33% 정도이지만, 비만 인구에서는 30~100%까지 이르고 있다 (Bedogni *et al.*, 2005; Gambarin *et al.*, 2007; Damaso *et al.*, 2008). 비알코올성 간질환은 비만, 인슐린저항성, 2형 당뇨병, 고혈압, 고지혈증 등과 같은 대사 증후군 (metabolic syndrome)과 동반되어 나타나며, 여기에는 단순 지방간, 비알코올성 지방간염, 간경변증 등을 모두 포함한다 (Ludwig *et al.*, 1980; Cortez *et al.*, 1999; Dixon *et al.*, 2001).

음주와 관계없이 간 내에 중성지방이 축적되어 간 무게가 5%를 초과하게 되면 비알코올성 간질환이라고 정의 한다 (Kleiner *et al.*, 2005). 간에서 에너지 대사의 항상성 조절이 이루어지지 않으면, 지방산이 중성지방으로 저장되기 때문에 지질이 축적된다 (Marchesini *et al.*, 2001). 간 내의 유리 지방산은 섭취한 음식의 분해, 지방산 생합성, 그리고 지방조직의 중성지방의 분해 등을 통해 유입된다 (Postic *et al.*, 2008). 비알코올성 간질환환자인 경우 간 조직의 중성지방을 구성하는 유리 지방산은 지방분해에 의해서 유입되는 것이 대략 60%, 지방산 생합성은 26% 나머지는 섭취한 음식으로부터 유입되지만, 정상인에서는 지방산 생합성은 5% 미만이라고 알려져 있다 (Donnelly *et al.*, 2005). 인슐린은 지방조직에서 hormone-sensitive lipase (HSL)를 조절함으로써 중성지방 분해를 조절하는데, 인슐린의 제 역할을 못하게 되면 중성지방의 분해가 촉진 된다 (Gonzalez *et al.*, 2006). 비알코올성 간질환환자에서 인슐린 저항성 증세가 나타나면 지방조직에서 중성지방의 분해와 혈중으로 방출되는 유리 지방산이 증가되어 간 내로 유입되는 유리 지방산이 증가하게 된다. 간 내로 과도한 지방산이 유입되면 지방산 산화 (β -oxidation) 장애가 일어나고, 지방산 생합성이 증가되어 간 내의 중성지방이 축적된다 (Lewis *et al.*, 2002; Postic *et al.*, 2008).

세포 내의 에너지 항상성을 조절하는 AMP-activated protein kinase (AMPK)는 당대사와 지질대사에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 세포 내의 에너지

센서인 AMPK는 운동이나 대사성 스트레스에 의해 ATP가 부족한 경우, 다시 말하자면 AMP/ATP비율이 증가하는 경우에 활성화 된다 (Viollet *et al.*, 2009). 활성화된 AMPK는 acetyl-CoA carboxylase (ACC)를 인산화시킴으로 ACC의 효소활성을 억제 한다. 이에 따라 acetyl-CoA를 malonyl-CoA로 합성하는 효소 활성이 억제되어 malonyl-CoA 농도를 감소시킨다. malonyl-CoA는 지방산을 미토콘드리아로 유입시키는데 중요한 역할을 하는 carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1)을 억제하는 물질로써, malonyl-CoA의 농도가 감소하게 되면 미토콘드리아로 유입되는 지방산의 증가하게 되면서 지방산 산화가 증가 된다 (Saha and Ruderman, 2003; Viollet *et al.*, 2009).

sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c)는 간 조직에서 당 대사와 지질대사와 관련 유전자 발현을 조절하는 전사인자로 알려졌다며, 비알코올성 간질환환자에서 일어나는 인슐린 저항성에 의해 SREBP-1c가 발현이 증가하게 된다 (Roden *et al.*, 2006; Lavoie *et al.*, 2006). SREBP-1c는 불활성화 상태로 소포체에 존재하다가 인슐린 또는 스테롤 등 자극에 의해 골지체로 이동하여 두 번의 절단된 후 핵 안으로 이동하여 지질생합성 유전자인 ACC, fatty acid synthase (FAS), stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1)의 발현을 유도함으로써 지방산 생합성을 촉진 한다 (Wang *et al.*, 1994; Sakai *et al.*, 1996).

제주조릿대는 (*Sasa quelpaertensis* Nakai)는 우리나라에서는 한라산에만 분포하는 조릿대속의 다년생 식물이다. 제주조릿대는 한라산 산림지역에 주요 식생지로 자리 잡고 있으며, 다른 식물종의 발달을 억제하여 종 다양성을 저하시키고 있다 (김 2002; 김 등 2003). 그리하여 최근 확산되는 제주조릿대를 음료수, 화장품, 약용 등 경제적으로 활용 하는 다양한 연구가 진행되고 있다 (김 2009). 동의보감, 본초강목, 신농본초경에 따르면 조릿대는 암, 고열, 고혈압, 당뇨병, 해열, 황달 등의 증세를 완화시키는 효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있으며, 민간 약재로 사용되고 있다 (Lee *et al.*, 2003; 윤 등 2000). 조릿대 속 식물에 관한 연구는 조릿대 (*Sasa borealis* Makino)의 약리학적 연구 (임 1984)와 조릿대 (*Sasa borealis*)의 Flavone 성분분리 (윤 등 2000) 등이 보고된 바 있다. 제주조릿대의 생리 활성에 관한 연구는 항염활성 (Joon-Ho *et al.*, 2007), 세포사멸 (Mi-Gyeong *et al.*, 2008), 항비만 (Seong-II *et al.*, 2012) 등에 대한 연구가 보고

된 바 있다. 식용 식물에 다량 함유 되어 있는 *p*-coumaric acid (Castelluccio *et al.*, 1995)는 효능으로는 항암활성 (Hudson *et al.*, 2000), 항산화 활성 (Ferguson *et al.*, 2005) 등이 있다고 알려져 있다.

HepG2 세포는 사람 간암세포에서 유래한 세포주로 간세포로서의 대사기능을 가지고 있으며, LDL 수용체, lipoprotein 분비, apoprotein 합성, hepatic triglyceride lipase 합성 및 분비 등의 지질대사, 약물과 영양성분에 대하여 사람에 간세포에서 이루어지고 있는 것과 유사한 양상을 나타내는 보고가 있고 증식률이 빠르며, 사람의 간에서 지질대사를 연구하는데 많이 쓰이고 있다 (Dang *et al.*, 2008; Yamamoto *et al.*, 1995; Yotsumoto *et al.*, 1997; Yanagita *et al.*, 1999; Cha *et al.*, 1999). 본 연구에서는 제주도 특산자원인 제주조릿대가 지질대사 개선소재로서의 활용 가능성을 탐색하기 위하여 HepG2 세포에서 제주조릿대 추출물과 그 구성 성분인 *p*-coumaric acid의 지질대사 개선 특성을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료 및 추출

본 연구에 사용된 제주조릿대는 2011년 4월 제주특별자치도 사려니 숲길 지역에서 채집하였다. 채집한 제주조릿대는 수돗물로 수세하여 일광건조 후 분쇄기로 미세하게 분쇄하여 실험에 사용할 때까지 4℃에 보관하였다. 분쇄한 제주조릿대 시료 400 g에 1차 증류수 4 L를 넣고 100℃에서 4시간 동안 추출하여 여과하였다. 여과액은 회전 농축기 (Büchi Switzerland)로 40℃에서 농축시켰다. 농축한 추출물을 Phosphate buffered saline (PBS)에 녹여 syringe filter (pore size 0.25 μm , Advantec, Japan)로 여과하여 실험에 사용하였다. 또한 단일컴파운드 *p*-coumaric acid는 Sigma에서 구입하여 dimethyl sulfoxide (DMSO: Amresco, USA)에 녹이고 syringe filter (pore size 0.25 μm , Advantec, Japan)로 여과하여 실험에 사용하였다.

2. 세포 배양

HepG2 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하였다. 세포배양은 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, USA)에 1% penicillin/streptomycin (P/S; Gibco, USA)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, USA) 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 조건하의 배양기 (Sanyo, Japan)에서 수행하였다. 세포는 T-75 cell culture flask에 분주 후 2~3일 뒤 배지를 갈아주고 바닥에 70~80% 정도 찼을 때 계대 배양하여 유지하였다.

3. MTT 분석

세포의 성장에 시료가 미치는 영향을 측정하기 위하여 MTT 분석을 (Mosmann 1983)의 방법을 수정하여 미토콘드리아의 환원력을 측정하였다. HepG2 세포를 12 well cell culture plate에 접종 (5.0×10^5 cells/well)하고

12well cell culture plate 바닥에 70~80% 정도 찬 상태가 될 때까지 배양하였다. 세포가 80% 정도 찬 상태에서 0.5% bovine serum albumin (BSA)가 함유된 DMEM 배지로 교환한 뒤 절식 배양하였다. 자유유리지방산인 Oleic acid (OA) 농도별과 OA 600 μ M이 포함된 각 시료를 농도별 (제주조릿대 추출물 : 125, 250, 500, 1000 μ g/mL, *p*-coumaric acid : 10, 20, 40, 80 μ M)로 첨가한 배지로 교환한 뒤 24시간 동안 배양하였다. 세포를 24시간 배양한 후 배지에 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Amresco, USA)를 최종 농도가 400 μ g/mL이 되도록 첨가하여 4시간 동안 반응시키고 배지를 제거하였다. MTT 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 400 μ l의 DMSO를 가하여 용해시킨 후 microplate reader (Bio-tek, USA)로 540 nm에서 흡광도를 3회 반복하여 측정하였다. 세포 증식률은 시료를 처리하지 않은 대조군의 흡광도의 값과 비교하여 다음의 식으로 산출하였다.

$$\text{세포증식률 (\%)} = 100 - [(\text{Control OD}_{540} - \text{Sample OD}_{540}) / \text{Control OD}_{540} \times 100]$$

4. LDH 분석

세포독성측정을 하기 위한 LDH 분석은 LDH Cytotoxicity Detection Kit (Takara, Japan)를 사용하여 수행하였다. HepG2 세포를 12well cell culture plate에 접종(5.0×10^5 cells/well)하고 12well cell culture plate 바닥에 70~80% 정도 찬 상태가 될 때까지 배양하였다. 세포가 80% 정도 찬 상태에서 0.5% BSA가 함유된 DMEM 배지로 교환한 뒤 절식 배양하였다. OA농도별 과 OA 600 μ M이 포함된 각 시료를 농도별 (제주조릿대 추출물 : 125, 250, 500, 1000 μ g/mL, *p*-coumaric acid : 10, 20, 40, 80 μ M)로 첨가한 배지로 교환한 뒤 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 배양액 50 μ l와 LDH 측정 혼합액 50 μ l를 넣고 반응시킨 후, HCl (최종 0.2N)를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 micro reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군은 세포에 Triton X-100 (Sigma, USA) 용액을 최종 1%가 되도록 처리한 세포 배양액을 사용하였다. 각 시료의 독성 분석은 3회 반복 실험하였으며 다음 식에 의해 산출된 평균값으로 나타내었다.

$$\text{세포독성률 (\%)} = 100 \times (A_{\text{sample}} - A_{\text{lower control}}) / (A_{\text{upper control}} - A_{\text{lower control}})$$

A_{sample} = 시료를 첨가한 배지의 흡광도

$A_{\text{lower control}}$ = 시료를 첨가하지 않은 배지의 흡광도

$A_{\text{upper control}}$ = Triton X-100을 첨가한 배지의 흡광도

5. 지방 축적 유도

HepG2 세포의 지방 축적 유도는 Gomez-Lechon *et al.* (2007)의 방법을 수정하여 수행하였다. HepG2 세포를 10% FBS와 1% P/S가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 6well cell culture plate에 접종(1.0×10^6 cells/well)하고 6well cell culture plate 바닥에 70~80% 정도 찬 상태가 될 때까지 배양하였다. 세포가 80% 정도 찬 상태에서 0.5% BSA가 함유된 DMEM 배지로 교환한 뒤 절식 배양 하였다. OA 600 μM 이 첨가한 배지로 교환한 뒤 24시간 동안 배양하여 HepG2 세포에 지방 축적을 유도하였다.

6. Oil Red O

Oil Red O 염색은 way *et al.* (2009)의 방법을 변형하여 수행하였다. 지방 축적을 유도한 세포를 PBS로 2회 세척하고 10% formalin [37% formaldehyde solution (Sigma, USA) 1/10으로 희석]으로 1시간 동안 고정한 후, 1차 증류수로 2회 세척하였다. Oil Red O 염색액은 isopropanol (Merck, Germany)로 희석한 0.6% Oil Red O (Sigma, USA)와 증류수를 6:4로 희석한 후 syringe filter (poresize 0.45 μm , Advantec, Japan)로 여과하여 제조하였다. 세척된 세포는 Oil Red O 염색액으로 1시간 동안 염색한 후 증류수로 2회 세척하여 관찰하였다.

7. Western Blot

Western Blot 분석을 위하여 HepG2 세포를 6well cell culture plate에 접종(1.0×10^6 cells/well)하고 0.5% BSA가 함유된 DMEM 배지로 교환하여 절식 배양한 후 OA 600 μM 과 각 시료를 농도별 (제주조릿대 추출물 : 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$, *p*-coumaric acid : 10, 20, 40, 80 μM)로 24시간동안 배양하였다. 이후 세포를 차가운 PBS를 이용해 1회 세척 후 10% RIPA lysis buffer (Upstate

Biotechnology, USA) 및 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pepstatin, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin 을 함유하고 있는 단백질 분리 시약을 이용해 1시간 동안 분해시킨 후 원심분리 (15,000 rpm, 4, 20분)하여 상층액을 획득하였다. 단백질은 Bio-rad protein assay kit (Bio-rad, USA)를 사용하여 micro reader로 595 nm에서 흡광도를 측정하고 정량하였다. 단백질은 8% SDS-polyacryamide gel에서 전기영동으로 분리 (100 V, 90분)한 후 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Milipore, USA)에 전이 (200 mA, 120분)시켰다. 단백질이 전이된 PVDF membrane은 상온에서 1시간 동안 5% skim milk (BD, USA)로 blocking 시킨 후, 1차 항체와 반응시켰다. 1차 항체 반응은 AMP-activated protein kinase α (AMPK α) antibody (1:1,000; Cell Signaling, USA), phospho-AMPK α (Thr 172) antibody (1:1,000; Cell Signaling, USA), acetyl-CoA carboxylase (ACC) antibody (1:1,000; Cell Signaling, USA), phospho-acetyl-CoA carboxylase (Ser 79) antibody (1:1,000; Cell Signaling, USA), sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) antibody (1:1,000; BD, USA), stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) antibody (1:1,000; cell signaling, USA), Fatty acid synthase (FAS) antibody (1:1,000; snata cruz, USA)는 4°C에서 하루 밤 동안, β -actin clone AC-74 antibody (1:10,000; Sigma, USA)는 상온에서 1시간 동안 수행하였다. 1차 항체 반응이 끝난 PVDF membrane은 0.1% tween 20이 포함된 tris buffer saline (TTBS) 용액으로 6회 세척하였다. 2차 항체로는 horse radish peroxidase (HRP) 가 결합된 anti-mouse 또는 anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, USA)를 1:5,000, 1:2,000 혹은 1:10,000으로 희석하여 1시간동안 반응한 후 TTBS로 6회 세척하였다. 각 단백질의 발현량은 WEST-ZOL western blot detection system (iNtRON Biotechnology, Korea)로 반응시켜서 X-ray 필름 (Agfa Gevaert N.V., Belgium)으로 검출하였다. 밴드의 수치화는 Image J 1.42q software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 확인하였다.

8. RNA 분리 및 Real-time PCR

Real-time PCR 분석을 위해 HepG2 세포를 6 well cell culture plate에 접종(1.0

$\times 10^6$ cells/well)하고 0.5% BSA로 절식 배양한 후 OA 600 μ M과 각 시료를 농도별 (제주조릿대 추출물 : 125, 250, 500, 1000 μ g/mL, *p*-coumaric acid : 10, 20, 40, 80 μ M)로 24시간동안 배양한 후 RNAiso puls (TAKARA BIO INC, JAPAN)를 이용하여 분리 하였다. RNAiso puls를 첨가하여 세포를 균질화 시킨 후, chloroform을 첨가하여 원심분리 (12,000 xg. 4, 15분)하였다. 상층액을 회수하여 동량의 isopropanol을 첨가하여 원심분리 (12,000 xg. 4, 5분)하여 RNA를 침전시켰다. 침전된 RNA는 75% 에탄올로 세척한 후, 건조시켜 nuclease-free distilled water (NFDW; Amresco, USA) 50 μ l에 용해시킨 후 nanodrop ND 2000 spectrophotometer (Nanodrop, USA)를 이용하여 260 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하고 DNase (Wako, Japan)를 처리하였다. A260/A280 nm의 비율이 1.9~2.0 범위 내의 값을 갖는 RNA 시료를 실험에 사용하였다. cDNA는 Maxime RT PreMix Kit (Oligo dT primer, iNtRON Biotechnology, Korea)를 이용하여 합성하였다. 1 μ g의 total RNA와 NF DW를 총 20 μ l로 kit에 넣고 45분, 95에서 5분간 반응하여 cDNA를 합성한 후 여기에 30 μ L 의NF DW를 첨가하였다. Real-time polymerase chain reaction (PCR)은 2 μ l의 cDNA, 각 primer는 1 μ l (10 Pm/ μ l)씩 넣고, 3.5 μ l의 NF DW와 7.5 μ l의 SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio Inc, Japan)를 혼합한 후 chromo4 Real-time PCR (Bio-Rad, USA)기기를 이용하여 수행하였다. PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C/ 20초, 63.5 $^{\circ}$ C/ 20초, 72 $^{\circ}$ C/ 30초로 하여 50회 증폭하였고 그 결과는 1회 증폭할 때 마다 흡광도로 측정하였다. 결과 분석은 gene expression analysis for chromo4 Real-time PCR detection system v1.10 (Bio-Rad, USA)을 이용하여 β -actin 대비 상대적 값으로 정량하였다. Real-time PCR에서 사용된 primer의 염기서열과 예상되는 생성물의 크기는 Table 1에 나타내었다.

9. TG 함량 분석

세포내 triglyceride (TG)량을 측정하기 위해 BioAssay systems 사 (USA)에서 제공한 TG 정량키트를 사용하여 정량하였다. HepG2 세포를 12 well cell culture plate에 접종 (5.0×10^5 cells/well)하고 12well cell culture plate 바닥에 70~80% 정도 찬 상태가 될 때까지 배양하였다. 세포가 80% 정도 찬 상태에서 0.5%

BSA가 함유된 DMEM 배지로 교환한 뒤 절식 배양한 후 OA 600 μ M과 각 시료가 (제주조릿대 추출물 : 1000 μ g/mL, *p*-coumaric acid : 40 μ M) 첨가된 배지로 교환하여 24시간 처리한 뒤 TG정량키트 사용하여 TG함량을 측정하였다. 시료의 TG함량은, 실험의 각 well 에서 얻어진 값을 회사에서 제공된 표준 TG에 의한 표준정량선과 비교하여 정하였다.

10. 통계처리

In vitro 실험결과는 평균 \pm 표준편차로 나타냈으며 student's t-test로 유의성을 검정하였다.

Table 1. The primer sequences of the genes used in Real-time PCR analysis.

Gene	Primer sequence		Fragment size
CPT1A	Forward	5'- CAC TAC AAG GAC ATG GGC AAG -3'	165 bp
	Reverse	5'- CAA CTT CAG CCT CTG TTC CAC -3'	
β -actin	Forward	5'- CAC TCT TCC AGC CTT CCT TC -3'	175 bp
	Reverse	5'- GTG ATC TCC TTC TGC ATC CTG -3'	

CPT1A : carnitine palmitoyltransferase 1A

Ⅲ. 결 과

1. HepG2 세포에서 지방축적 유도

HepG2 세포에서 지방축적을 유도하기 위해 Oleic acid (OA) 농도별 (200, 400, 600, 800, 1000 μM)로 처리하여 세포독성을 조사하였다. OA는 모든 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다 (Figure 1). 그림 2에서 보여주는 바와 같이, HepG2 세포에서 지질축적은 OA 200 μM 농도부터 유의성 있게 증가하였다 (Figure 2). 본 실험결과를 바탕으로 OA 600 μM 를 지방축적 유도 실험에 사용하였다.

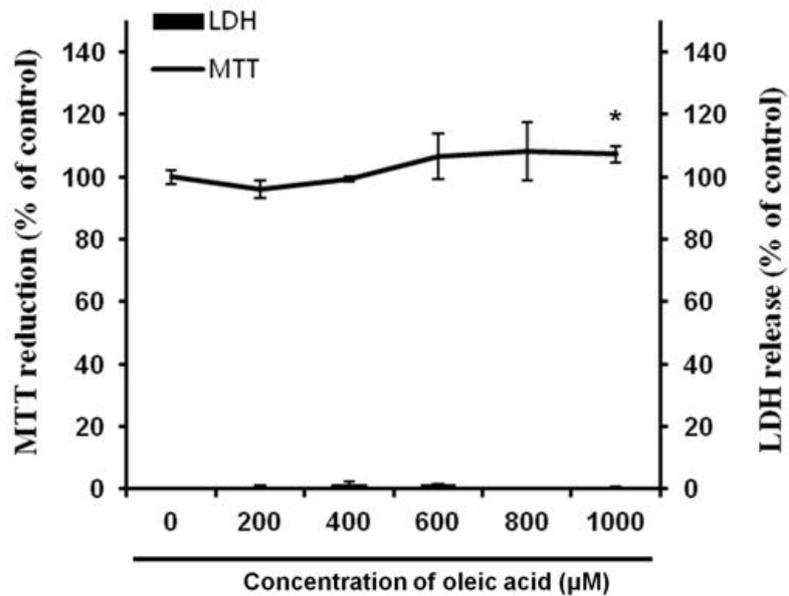
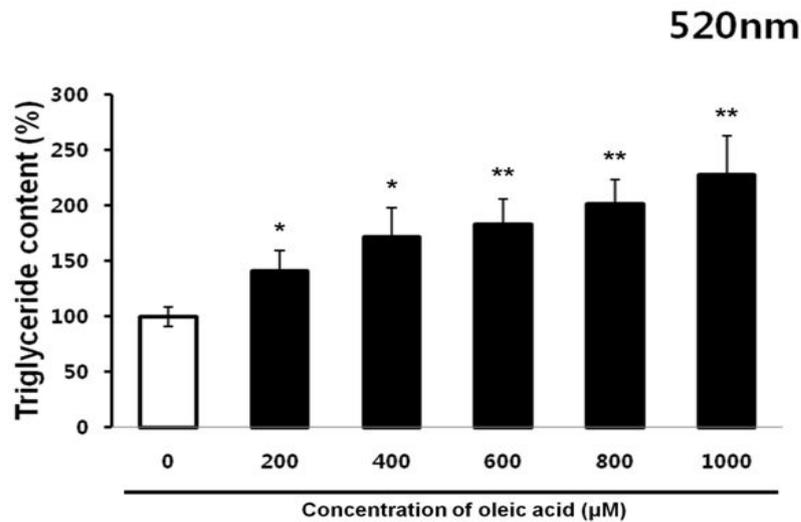


Figure 1. Cytotoxicity of the oleic acid (OA) on HepG2 cells. Cells were starved for 16h, and the cells were incubated with the indicated concentrations of OA for 24h. The control cells were treated with 0.5% bovine serum albumin (BSA) for 24 h. Cytotoxicity was determined by MTT and LDH assay. The results are expressed as the mean \pm S.D. (n = 3). 0 μ M, control (EtOH). * p < 0.05 compared to control.

A.



B.

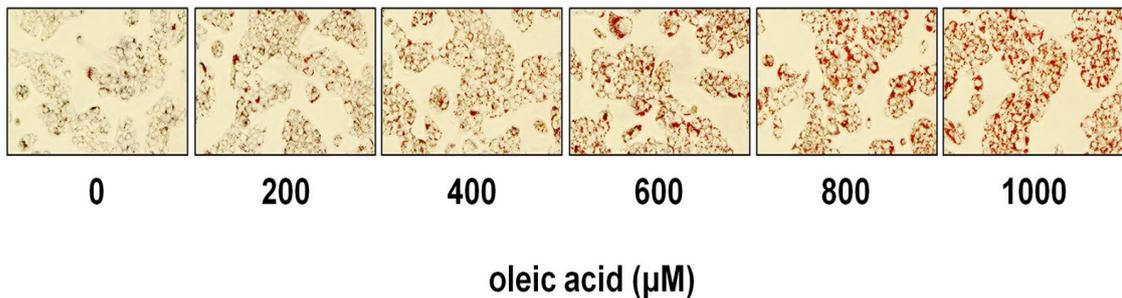


Figure 2. Effects of OA on lipid accumulation in HepG2 cells. Cells were starved for 16h, and incubated with the indicated concentrations of OA for 24h. The control cells were treated with 0.5% BSA for 24 h. (A) Quantitative analysis of lipid deposition in cells by Oil Red O staining. The results are expressed as the mean \pm S.D. (n = 3). (B) Images of cells were captured by microscope at 200 \times original magnification showing fat accumulation in cells stained by Oil Red O. The data shown are representative of three experiments. 0 μM , control (EtOH). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to control.

2. 제주조릿대 추출물 (JBE)과 *p*-coumaric acid (CA)의 AMPK 활성화 작용

OA를 처리하여 지방축적을 유도한 HepG2 세포에서 제주조릿대 추출물 (JBE)과 *p*-coumaric acid (CA)의 지질대사에 미치는 영향을 조사하였다. 우선 세포실험에 적용할 JBE 및 CA의 적절 처리 농도를 결정하기 위해 MTT 분석 및 LDH 분석 방법으로 세포독성을 측정하였다. HepG2 세포에 OA 600 μ M과 JBE를 처리한 모든 농도 (125, 250, 500, 1000 μ g/mL)에서 세포독성을 나타내지 않았다 (Figure 3). 그리고 CA를 여러 농도(10, 20, 40, 80 μ M)로 세포에 처리하였을 때 모든 농도에서 세포독성이 관찰되지 않았다 (Figure 4). 따라서 이후 진행된 세포실험은 JBE는 1000 μ g/mL를 최고 농도로 CA는 40 μ M를 최고 농도로 설정하여 진행하였다.

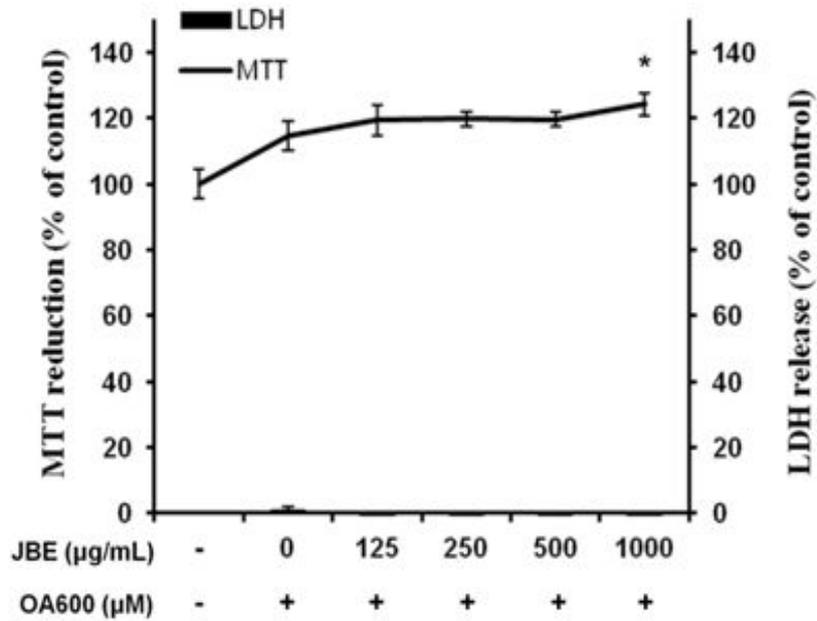


Figure 3. Cytotoxicity of the Jeju dwarf bamboo extract (JBE) on HepG2 cells. Cells were incubated with the indicated concentrations of JBE and OA (600 μ M) for 24h. Cytotoxicity was determined by MTT and LDH assay. The results are expressed as the mean \pm S.D. (n = 3). 0 μ M, control (PBS). * p < 0.05 compared to control.

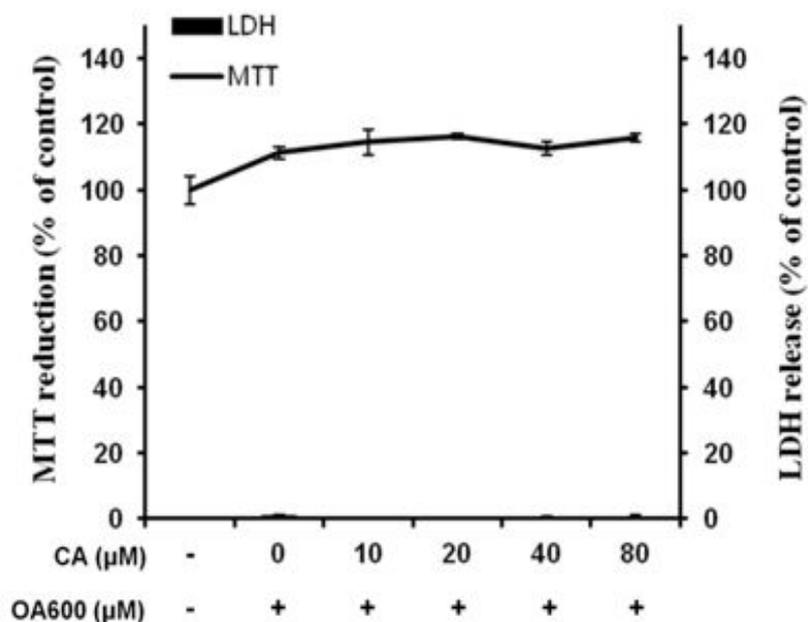


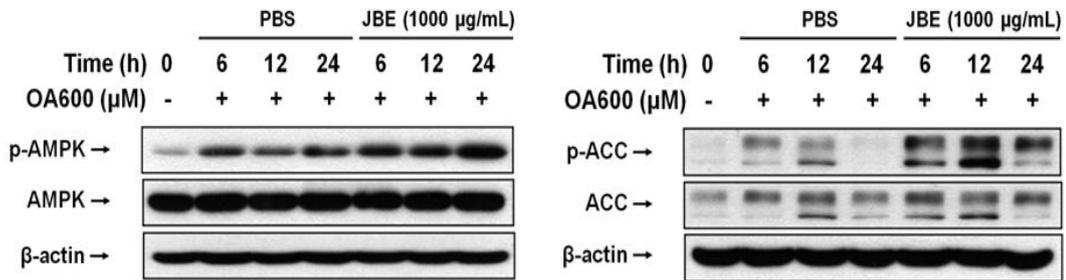
Figure 4. Cytotoxicity of the *P*-coumaric acid (CA) on HepG2 cells. Cells were incubated with the indicated concentrations of CA and OA (600 μM) for 24h. Cytotoxicity was determined by MTT and LDH assay. The results are expressed as the mean ± S.D. (n = 3). 0 μM, control (DMSO). **p* < 0.05 compared to control.

1) 지방산 산화 경로 촉진 작용

AMPK 활성화는 지방산 산화를 촉진한다고 알려져 있기 때문에 HepG2 세포에서 지방산 산화에 관여하는 AMPK 활성화 경로의 유전자들의 발현에 대한 JBE와 CA의 영향을 조사하였다. HepG2 세포에 OA 600 μ M과 JBE를 동시에 처리하여 Western blot으로 AMPK 및 그 기질인 ACC의 인산화를 확인하였다. 시간별로 확인한 결과 6h, 12h, 24h 모두 JBE를 처리하지 않은 대조군보다 JBE (1000 μ g/mL)를 처리한 군에서 AMPK와 ACC의 인산화가 유의성 있게 증가하였다 (Figure 5). 특히 24h 동안 처리한 군에서 AMPK와 ACC의 인산화가 JBE를 처리하지 않은 대조군과 비교하였을 때 증가 양상이 가장 높게 나타났다. 그래서 24h 동안 처리하여 농도별 (125, 250, 500, 1000 μ g/mL)로 처리한 결과, AMPK와 ACC의 인산화가 모두 농도 의존적으로 증가하였다 (Figure 6). 그리고 ACC의 하위 경로인 CPT1A의 mRNA 발현량을 Real-time PCR을 통해 확인한 결과, CPT1A mRNA의 발현량이 JBE를 처리하지 않은 대조군보다 유의적으로 증가하였다 (Figure 7).

다음은 지방산 산화 경로에 CA가 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해서 HepG2 세포에 OA 600 μ M과 CA를 동시에 처리하여 시간별로 AMPK와 ACC의 인산화 정도를 확인하였다. CA 처리 (40 μ M) 후 6h, 12h, 24h 모두에서 CA를 처리하지 않은 대조군보다 AMPK와 ACC 인산화가 유의성 있게 증가하였다 (Figure 8). JBE와 마찬가지로 AMPK의 인산화는 CA를 24h동안 처리한 군에서 가장 높은 활성화 효과를 나타내었다. 이런 결과를 바탕으로 CA를 농도별 (10, 20, 40 μ M)로 24h 동안 처리한 세포에서 CA는 농도 의존적으로 AMPK와 ACC의 인산화를 증가시켰다 (Figure 9). ACC의 하위 경로인 CPT1A의 mRNA 발현량 또한 농도 의존적인 증가 양상을 보여주었다 (Figure 10).

A



B

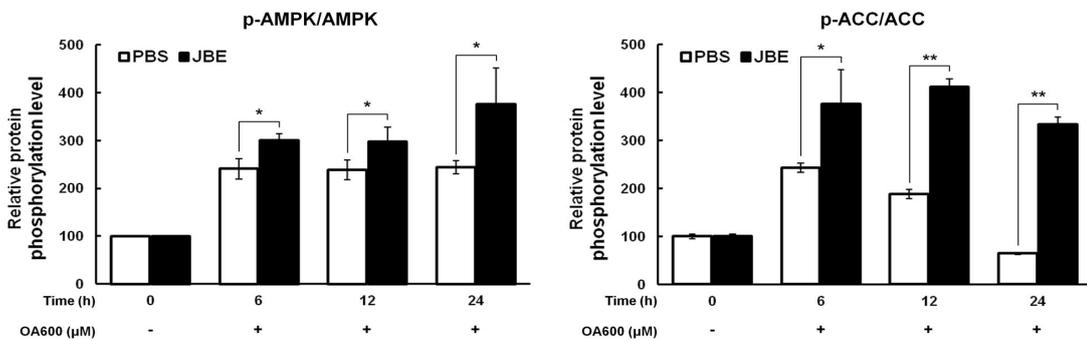
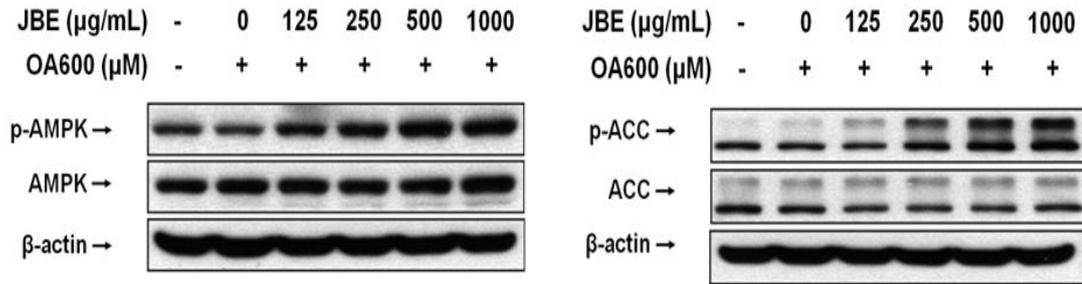


Figure 5. Effects of JBE on AMPK and ACC phosphorylation in HepG2 Cells. Cells were starved for 16 h, and treated JBE (1000μg/mL) and OA (600 μM) for the indicated times. (A) The protein level were determined by Western blot analysis. The data shown are representative of three experiments. (B) Relative band intensity was determined by densitometry. The results are expressed as the mean ± S.D. (n = 3). O μM, control (PBS). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to control.

A



B

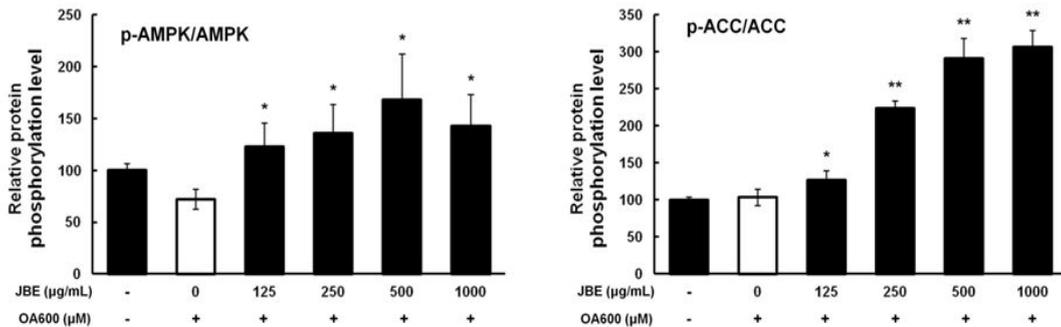


Figure 6. Effects of JBE on AMPK and ACC phosphorylation in HepG2 Cells. Cells were starved for 16h, and incubated with the indicated concentrations of JBE and OA (600 μM) for 24h. (A) The protein level were determined by Western blot analysis. The data shown are representative of three experiments. (B) Relative band intensity was determined by densitometry. The results are expressed as the mean ± S.D. (n = 3). 0 μM, control (PBS). **p* < 0.05, ***p* < 0.01 compared to control.

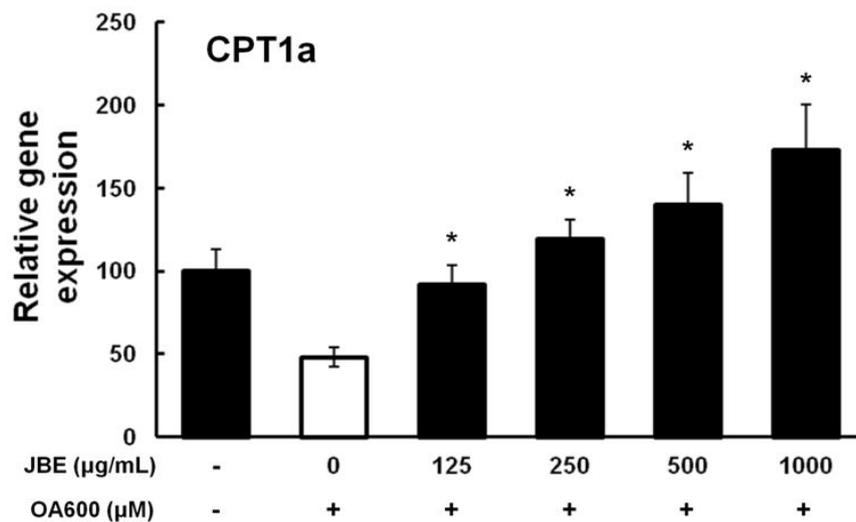
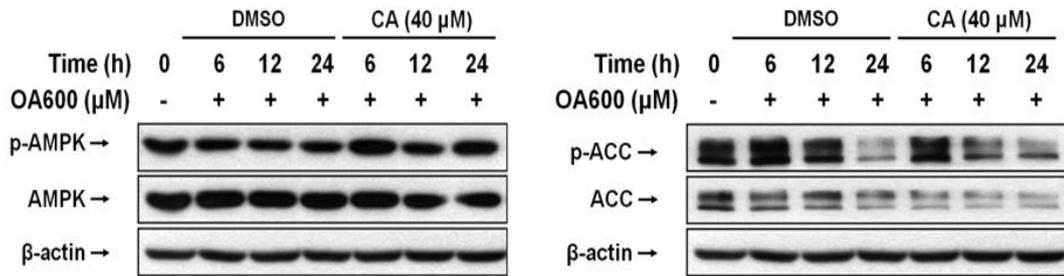


Figure 7. Effects of JBE on CPT1A gene expression in HepG2 Cells. Cells were starved for 16h, and the cells were incubated with the indicated concentrations of JBE and OA (600 µM) for 24h. Relative ratio of gene expression in vehicle versus sample concentrations are indicated. The results are expressed as the mean ± S.D. (n = 3). 0 µM, control (PBS). **p* < 0.01, compared to control.

A



B

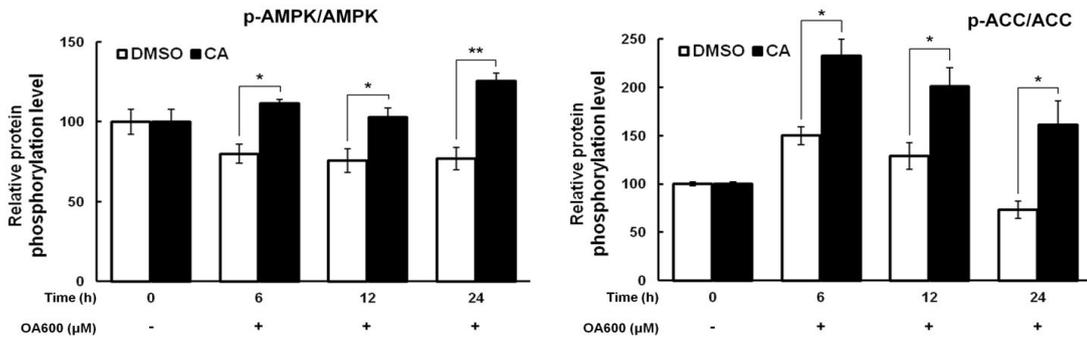
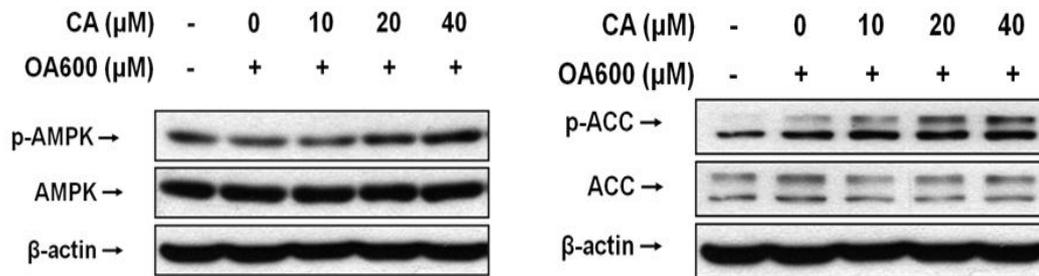


Figure 8. Effects of CA on AMPK and ACC phosphorylation in HepG2 Cells. Cells were starved for 16h, and treated CA (40 μM) and OA (600 μM) for the indicated times. (A) The protein level were determined by Western blot analysis. The data shown are representative of three experiments. (B) Relative band intensity was determined by densitometry. The results are expressed as the mean ± S.D. (n = 3). 0 μM, control (DMSO). **p* < 0.05, ***p* < 0.01 compared to control.

A



B

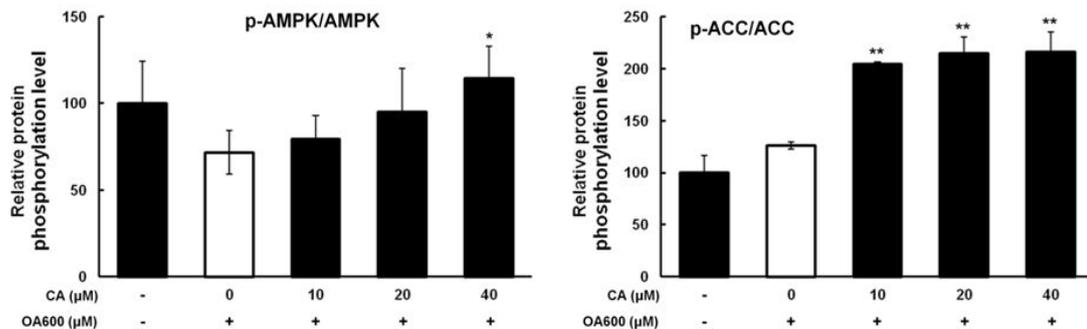


Figure 9. Effects of CA on AMPK and ACC phosphorylation in HepG2 Cells. Cells were starved for 16h, and incubated with the indicated concentrations of CA and OA (600 μM) for 24h. (A) The protein level were determined by Western blot analysis. The data shown are representative of three experiments. (B) Relative band intensity was determined by densitometry. The results are expressed as the mean ± S.D. (n = 3). O μM, control (DMSO). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to control.

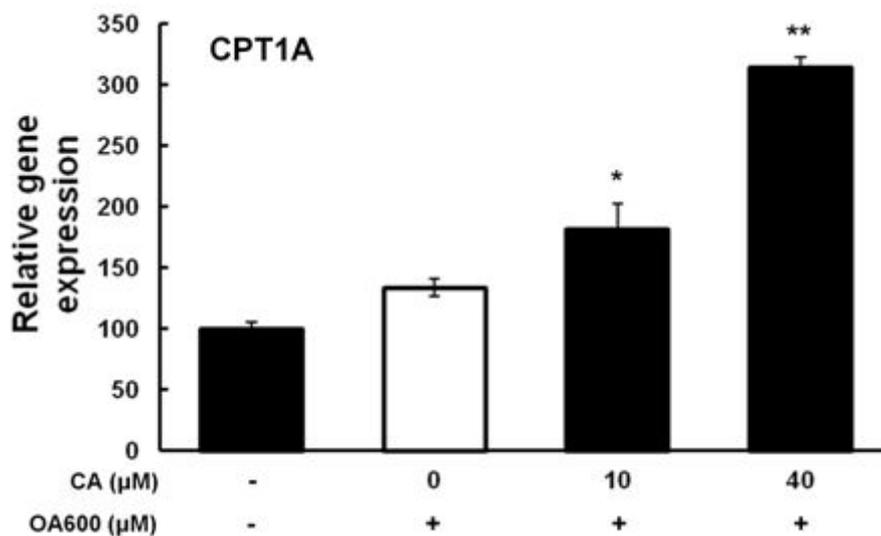


Figure 10. Effects of CA on CPT1A gene expression in HepG2 Cells. Cells were starved for 16h, and incubated with the indicated concentrations of CA and OA (600 μM) for 24h. Relative ratio of gene expression in vehicle versus sample concentrations are indicated. The results are expressed as the mean ± S.D. (n = 3). 0 μM, control (DMSO). **p* < 0.05, ***p* < 0.01 compared to control.

2) 지방산 합성 저해 작용

JBE와 CA가 AMPK 활성화 작용에 의한 지방산 합성에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 지방산 합성에 관여하는 전사인자인 SREBP-1c와 그 표적 유전자인 FAS, SCD1의 단백질 발현을 Western blot으로 확인하였다. HepG2 세포에 OA 600 μ M과 JBE를 동시 처리하였을 때 농도 의존적으로 SREBP-1c, FAS, SCD1의 발현양이 감소하는 경향을 보여 주었다 (Figure 11). 또한 CA를 처리한 세포에서도 SREBP-1c와 FAS의 발현이 농도 의존적으로 감소하였다 (Figure 12). 또한 JBE와 CA가 세포내 지방 축적을 억제 하는지 확인하기 위하여 HepG2 세포에 OA 600 μ M를 JBE, CA와 동시 처리하여 세포내 TG 함량을 측정하였다. JBE (1000 μ g/mL)를 처리한 세포군에서 OA에 의해 유도되는 지방축적이 유의성 있게 감소됨을 확인할 수 있었다 (Figure 13). 또한 CA (40 μ M)를 처리했을 때 세포내 TG 함량이 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다 (Figure 14).

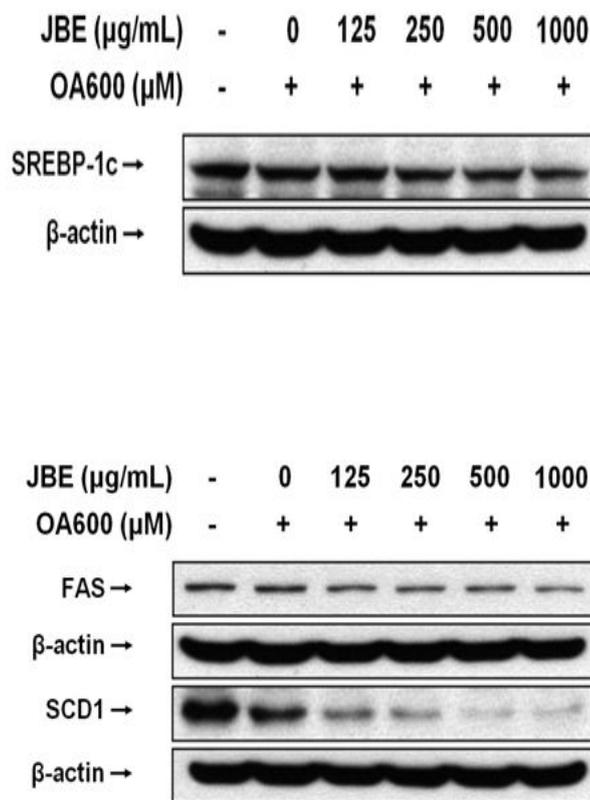


Figure 11. Effects of JBE on the expression of SREBP-1c, FAS and SCD1 in HepG2 Cells. Cells were starved for 16h, and incubated with the indicated concentrations of JBE and OA (600 μM) for 24h. The protein level were determined by Western blot analysis. The data shown are representative of three experiments.

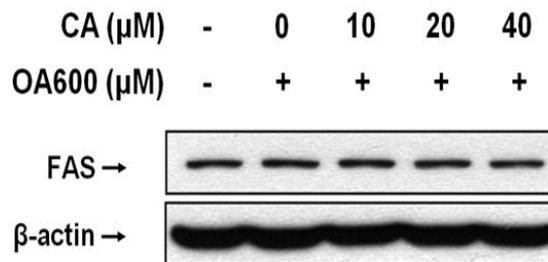
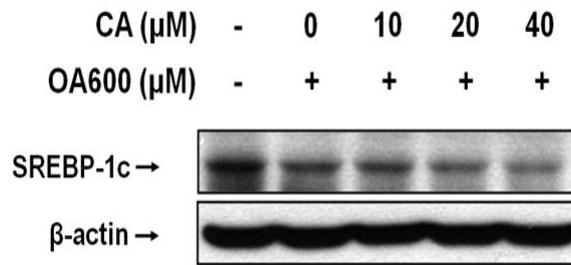


Figure 12. Effects of CA on the expression of SREBP-1c and FAS in HepG2 Cells. Cells were starved for 16h, and incubated with the indicated concentrations of CA and OA (600 μM) for 24h. The protein level were determined by Western blot analysis. The data shown are representative of three experiments.

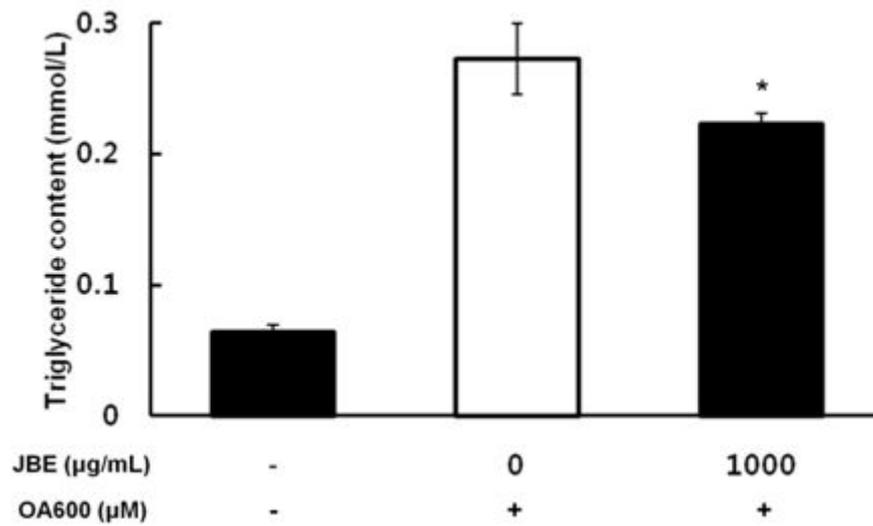


Figure 13. Effects of JBE on TG accumulation in HepG2 Cells. Cells were starved for 16h, and incubated with the indicated concentrations (JBE : 1000 μg/mL) and OA (600 μM) for 12h. The results are expressed as the mean ± S.D. (n = 3). 0 μM, control (DMSO). **p* < 0.05, compared to control.

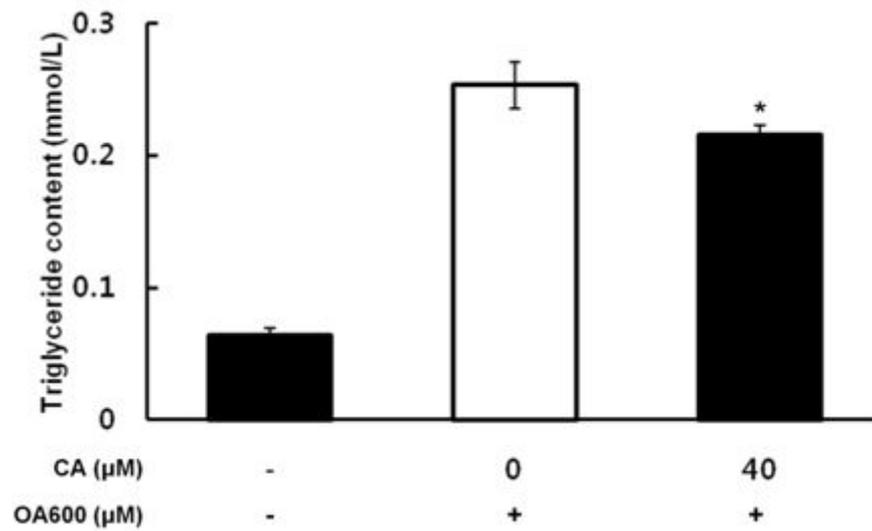


Figure 14. Effects of CA on TG accumulation in HepG2 Cells. Cells were starved for 16h, and incubated with the indicated concentrations (CA : 40 μM) and OA (600 μM) for 12h. The results are expressed as the mean ± S.D. (n = 3). 0 μM, control (DMSO). * $p < 0.05$, compared to control.

3) AMPK 활성화 억제제 실험

JBE와 CA에 의한 지방산 산화 촉진과 지방산 합성 저해효과가 AMPK 활성화 작용에 의한 것인지를 확인하기 위하여 AMPK 활성화 억제제를 사용하여 확인하였다. AMPK 활성화 억제제인 Compound C (10 μ M)를 처리하여 AMPK의 인산화를 확인한 결과, JBE를 처리한 군에서는 AMPK와 ACC의 인산화가 증가하는 양상을 보였지만, AMPK 활성화 억제제를 처리한 군에서는 AMPK와 ACC의 인산화가 감소하였다 (Figure 15). 또한 JBE를 처리한 군에서는 SREBP-1c와 FAS의 발현이 감소하였지만, Compound C를 처리한 군에서는 그 발현양이 JBE를 처리한 군에 비해 높게 나타내었다 (Figure 15). 마찬가지로 CA만 처리한 군에서는 AMPK와 ACC의 인산화는 증가하였지만, Compound C를 처리하면 AMPK와 ACC의 인산화가 감소하는 경향을 나타내었다 (Figure 16).

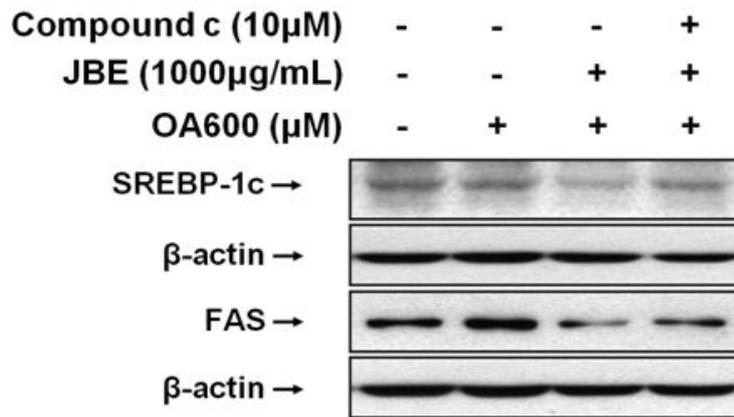
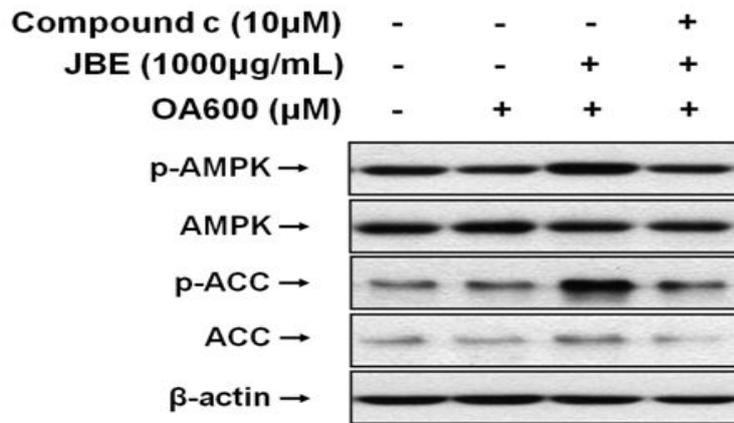


Figure 15. Effect of Compound C on the phosphorylation of AMPK, ACC, and expression of SREBP-1c and FAS in HepG2 Cells. Cells were starved for 16h, and pretreated with Compound C for 30min and then treated JBE (1000 μ g/mL) and OA (600 μ M) for 24h. The protein level were determined by Western blot analysis. The data shown are representative of three experiments.

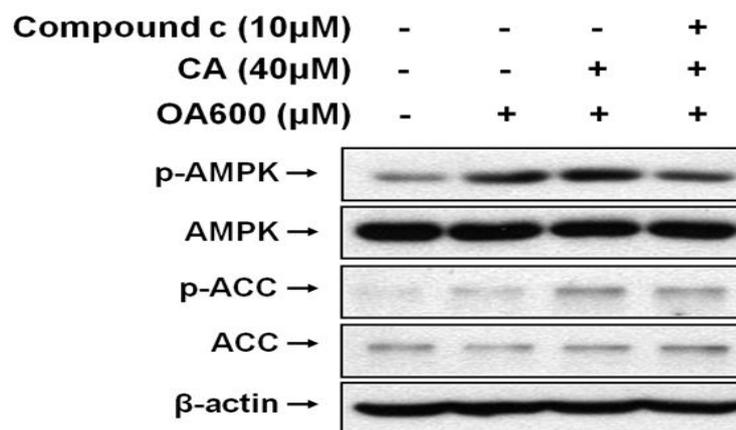


Figure 16. Effect of Compound C on the phosphorylation of AMPK and ACC in HepG2 Cells. Cells were starved for 16h, and pretreated with Compound C for 30 min and then treated CA (40 μ M) and OA (600 μ M) for 24h. The protein level were determined by Western blot analysis. The data shown are representative of three experiments.

IV. 고찰

본 연구에서는 제주도에 자생하는 제주조릿대의 지질대사 개선 특성을 조사하기 위해서 제주조릿대 추출물 (JBE)과 구성성분인 *p*-coumaric acid (CA)가 간세포주인 HepG2 세포를 이용하여 지방산 산화 및 합성에 미치는 영향을 분석하였다. HepG2 세포에 자유 지방산을 처리하면 지방축적이 유도된다고 알려져 있다 (Gómez-Lechón et al., 2007). 본 연구에서는 Oleic acid (OA)을 이용하여 지방축적을 유도한 HepG2 세포를 사용하여 지방산 산화 및 합성에 관여하는 AMP-activated protein kinase (AMPK)경로 사용하였다.

AMPK는 생체 내의 에너지 인식 및 항상성 조절에 중요한 역할을 한다. 활성화된 AMPK는 ATP를 소비하는 과정인 지방산 합성 및 콜레스테롤 합성을 억제하고, ATP를 생산하는 과정인 지방산 산화 및 해당과정을 촉진시킨다 (Hardie, 2007). acetyl-CoA carboxylase (ACC)를 통해 acetyl-CoA를 malony-CoA로 합성되어진다. malony-CoA는 유리지방산이 에스테르화를 통해 지질합성 경로 또는 지방산 산화 경로로 향할지 중요한 역할을 한다. malony-CoA가 많은 경우엔 에스테르화를 거쳐서 중성지방으로 합성되어진다. 반면엔 소량인 경우 지방산을 미토콘드리아로 유입시키는 carnitine palmitoyltransferase1 (CPT1)을 통해 미토콘드리아로 수송하여 지방산 산화를 촉진시킨다 (Nosadini et al., 1979). JBE와 CA는 OA로 지방축적을 유도한 HepG2 세포에서 시간별로 확인한 결과 AMPK와 ACC의 인산화를 모든 시간대에서 증가시켰다. 그중에서도 JBE와 CA를 24시간 동안 처리한 군에서 대조군과 비교 하였을 때 가장 효과 있게 나타내었다. 그리하여 JBE와 CA를 24시간동안 처리하여 농도별로 확인한 결과 JBE와 CA를 처리하지 않은 군과 비교 하였을 때 유의성 있게 AMPK와 ACC의 인산화를 증가시켰다. 또한 지방산을 미토콘드리아로 운송하는 CPT1A의 발현이 농도 의존적으로 JBE와 CA를 처리한 군에서 증가하였다. 이러한 결과는 미루어 볼 때 JBE와 CA는 지방산 산화 촉진 효과를 가지고 있음을 암시한다.

간에서의 지방 및 콜레스테롤의 합성은 sterol regulatory element-binding protein (SREBP)가 관여 한다고 알려졌으며, SREBP-2은 콜레스테롤, SREBP-1c은 지방산 및 중성지방 합성에 관여한다 (Roden et al., 2006; Lavoie et al., 2006). 인슐린 저항성에 의해 고혈당 및 고인슐린에 의해 SREBP-1c가 발현이 증가하게 되고, 또한 lipogenic gene인 ACC, fatty acid synthase (FAS), stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1)의 발현을 증가시킨다 (Wang et al., 1994; Sakai et al., 1996). 이러한 결과에 의해 지방산 생합성에 관여하는 유전자의 발현증가와 지방산 생합성이 증가에 의해 지방산 산화 장애가 나타나게 되고, 그로 인해 간세포 내에 중성지방이 축적하게 된다 (Lewis et al., 2002; Postic et al., 2008). AMPK의 인산화는 SREBP-1c의 발현 및 활성화를 억제시켜 지방산 생합성에 관여하는 유전자의 발현을 감소시킴으로써 지방산 생합성을 저해한다고 알려져 있다 (Viollet et al., 2009). OA로 지방축적을 유도한 HepG2 세포에서 JBE는 활성화된 SREBP-1c와 그 표적 유전자인 FAS, SCD1의 발현을 감소시켰으며, 또한 CA는 활성화된 SREBP-1c와 FAS의 발현을 감소시켜 지방산 합성을 억제하였으며, OA에 의해 지방 유도된 세포내 중성지방을 JBE와 CA를 처리한 군에서 대조군에 비해 세포내 중성지방을 유의성 있게 감소시키는 특성을 보여주었다.

JBE와 CA에 의한 지방산 산화 촉진과 지방산 합성 저해작용이 AMPK 활성화 작용에 의한 다는 것을 AMPK 활성화 억제제인 Compound C를 사용하여 확인한 결과, JBE는 지방산 산화 촉진과 지방산 합성 저해작용을 AMPK 활성화 작용에 의해 나타낸 다는 것을 확인 하였으며, CA 또한 지방산 산화 촉진 작용을 AMPK 활성화 작용으로 나타내고 있음을 확인하였다.

결론적으로 OA로 지방축적을 유도한 HepG2 세포에서 JBE, CA는 AMPK 경로를 통해서 지방산 산화 촉진 작용을 나타내고 있으며, 지방산 합성 저해 작용도 나타내고 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 추후에 이들의 작용기전에 대한 추가적인 연구와 *in vivo* 연구를 통한 생체 내에서의 활성에 대한 연구가 필요하다고 사료된다.

V. 참 고 문 헌

- 김현철. 2002. 한라산 해발 고도별 제주조릿대의 생장 특성. 한라산연구소 조사보고서. 1: 63-71.
- 김현철, 고정근. 2003. 한라산 식생유형별 제주조릿대의 생육특성에 따른 종 다양성의 변화. 한라산연구소 조사연구보고서. 2: 97-109.
- 김현철. 2009. 제주조릿대의 생태학적 . 특성 및 관리방안 학술심포지엄자료. p 1-39
- 윤기동, 김철영, 허훈. 2000. 조릿대 잎의 flavone 배당체 성분. 한국 생약학회. 31(2): 224-227
- 임미송. 1984. 조릿대의 약리학적 연구. 숙명여자대학교. 1-2
- Ahmed, M.H., and Byrne, C.D. 2007. Modulation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) as potential treatments for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Drug Discov. Today*. 12:740 - 747
- Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. 2005. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 42:44-52.
- Castelluccio C, Paganga G, Melikian N, Bolwell GP, Pridham J, Sampson J, Rice-Evans C. 1995. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS Lett*. Pages 188 - 192

- Cha JY and Cho YS. Effects of linoleic acid and serum albumin concentrations on lipid metabolism in HepG2 cells. 1999. *J Korean Agric Chem Biotechnol.* 42 (3) : 229-234
- Cortez-Pinto H, Camilo ME, Baptista A, De Oliveira AG, De Moura MC. 1999. Nonalcoholic fatty liver: another feature of the metabolic syndrome?. *Cin Nutr.* 18:353-358.
- Damaso AR, do Prado WL, de Piano A, Tock L, caranti DA, Lofrano MC, carnier J, Cristofalo DJ, Lederman H, Tufik S, de Mello MT. 2008. Relationship between nonalcoholic fatty liver disease prevalence and visceral fat in obese adolescents. *Dig Liver Dis.* 40:132-9.
- Dang HT, Lee HJ, Yoo ES, Shinde PB, Lee YM, Hong J, Kim DK and Jung JH. 2008. Anti-inflammatory constituents of the red alga *Gracilaria verrucosa* and their synthetic analogues. *J Nat Prod.* 71(2):232-240
- Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. 2001. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology.* 121:91-100.
- Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. 2005. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* 115:1343-51.
- Ferguson, L. R., Zhu, S. T. and Harris, P. J. 2005. Antioxidant and antigenotoxic effect of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cell. *Mol. Nutr. Food Res.* 49,585-593.

- Gambarin-Gelwan M, Kinkhabwala SV, Schiano TD, Bodian C, Yeh HC, Futterweit W. 2007. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 5:496-501.
- Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, Jiménez N, Castell JV and O'Connor JE. 2007. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact.* 165 (2) : 106-16.
- Gonzalez-Yanes, C., and Sanchez-Margalet. 2006. Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cellular Signalling.* 18:401 - 408.
- Hardie DG. 2007. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 8 (10) : 774-785.
- Hudson,E.A., Dinh,P.A., Kokubun,T., Simmonds,M.S. and Gescher,A. 2000. Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. 9, 1163-1170.
- Joon-Ho Hwang, Soo-Youn Choi, Hee-Chul Ko, Mi-Gyeong Jang, Young-Jun Jin¹, Seong-Il Kang¹, Ji-Gweon Park, Wan-Seok Chung, and Se-Jae Kim. 2007. Anti-inflammatory Effect of the Hot Water Extract from *Sasa quepaertensis* Leaves. *Food Sci. Biotechnol.* Vol. 16, No. 5, pp. 728 ~733
- Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal. 2005. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 41 (6) :1313-1321.

- Lavoie JM, Gauthier MS. 2006. Regulation of fat metabolism in the liver: link to nonalcoholic hepatic steatosis and impact of physical exercise. *Cell Mol Life Sci.* Jun;63(12):1393-409.
- Lee MJ, Moon GS. 2003. Antioxidative Effects of Korean Bamboo Trees. *Korean J Food Sci.* 35(6): 1226-1232
- Lewis, G.F., PCRPentier, A., Adeli, K., and Giacca, A. 2002. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev.* Rev. 23:201 - 229.
- Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. 1980. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc.* 55:434-438.
- Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. 2001. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes.* 50 (8), 1884 - 1850.
- Mi-Gyeong Jang, Soo-Young Park¹, Sun-Ryung Lee², Soo-Youn Choi, Joon-Ho Hwang, Hee-Chul Ko, Ji-Gweon Park, Wan-Seok Chung, and Se-Jae Kim. 2008. *Sasa quelpaertensis* Leaf Extracts Induce Apoptosis in Human Leukemia HL-60 Cells. *Food Sci. Biotechnol.* Vol. 17, No. 1, pp. 188 ~ 190
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods.* 65 (1-2) : 55-63.

- Nosadini R, Ursini F, Tessari P, Giengo A, Gregolin C. 1979. Perfused liver carnitine palmitoyl-transferase activity and ketogenesis in streptozotocin treated and genetic hyperinsulinemic rats. Effect of glucagon. *Horm Metab Res.* 11:661-4.
- Postic C, Girard J. 2008. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest.* March 3; 118(3): 829 - 838.
- Roden M. 2006. Mechanisms of Disease: hepatic steatosis in type 2 diabetes-pathogenesis and clinical relevance. *Nat Clin Prac Endocrinol Metab.* 6:335-348.
- Sakai J, Duncan EA, Rawson RB, Hua X, Brown MS, Goldstein JL. 1996. Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Cell.* Jun 28;85(7):1037-46.
- Saha AK and Ruderman NB. 2003. Malonyl-CoA and AMPactivated protein kinase: An expanding partnership. *Mol Cell Biochem.*, 253 (1-2) : 65-70.
- Seong-Il KANG, Hye-Sun SHIN, Hyo-Min KIM, Youn-Suk HONG, Seon-A YOON, Seung-Woo KANG, Jeong-Hwan KIM, Hee-Chul KO, and Se-Jae KIM. 2012. Anti-Obesity properties of a Sasa quelpaertensis Extract in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76 (4) 755-761.
- Viollet B, Guigas B, Leclerc J, Hébrard S, Lantier L, Mounier R, Andreelli F,

- Foretz M. 2009. AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. *Acta Physiol (Oxf)*. 196:81 - 98.
- Wang X, Sato R, Brown MS, Hua X, Goldstein JL. 1994. SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell*. Apr 8;77(1):53-62.
- Way TD, Lin HY, Kuo DH, Tsai SJ, Shieh JC, Wu JC, Lee MR and Lin JK. 2009. Pu-erh tea attenuates hyperlipogenesis and induces hepatoma cells growth arrest through activating AMP-activated protein kinase (AMPK) in human HepG2 cells. *J Agric Food Chem.*, 57 (12) : 5257-5264.
- Yamamoto K, Ogawa Y, Yanagita T, Morito F, Fukushima N, Ozaki I, Mizuta T, Setoguchi Y and Sakai T. 1995. Pharmacological effects of dai-saiko-to on lipid biosynthesis in cultured human hepatocyte HepG2 cell. *J Ethnopharmacol*. 46 (1) : 49-54
- Yanagita T, Hara E, Yotsumoto H, Rahman SM, Han SY, Cha JY and Yamamoto K. 1999. NK-104, a potent new 3-hydroxy-3methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor, enhances posttranslational catabolism of apolipoprotein B-100 and inhibits secretion of apolipoprotein B-100 and triacylglycerols from HepG2 cells. *Current Therapeutic Res*. 60 (8) : 423-434.
- Yotsumoto H, Yanagita T, Yamamoto K, Ogawa Y, Cha JY, and Mori Y. 1997. Inhibitory effects of oren-gedoku-to and its components on cholesteryl ester synthesis in cultured human hepatocyte HepG2 cell: evidence from the cultured HepG2 cells and in vitro assay of ACAT. *Planta Med*. 63 (2) : 141-145.

VI. 요 약

제주조릿대는 제주 한라산에서만 자생하는 식물로 예로부터 그 잎은 건강에 유익한 약리작용을 가지고 있어 민간 약제로 이용되어 왔다. 본 연구는 oleic acid로 지방축적을 유도한 HepG2 세포에서 제주조릿대 추출물 (JBE)과 그 구성성분인 *p*-coumaric acid (CA)가 지질대사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 수행하였다. 지방축적을 유도한 HepG2 세포에서 JBE와 CA를 처리하면 AMP-activated protein kinase (AMPK)와 acetyl-CoA carboxylase (ACC)의 인산화가 증가되었다. 또한, Real-time PCR을 통해 carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A) mRNA의 발현양이 증가함을 확인할 수 있었다. 이는 JBE와 CA가 AMPK 활성화 경로를 통해 지방산 산화를 촉진하는 작용을 할 것이라 사료되는 결과로 해석된다. 그리고 JBE와 CA는 지방축적을 유도한 HepG2 세포에서 지방산 합성에 관여하는 전사인자인 sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c)와 그 하위 표적 유전자인 fatty acid synthase (FAS) 발현을 유의적으로 감소시켰다. 또한, 세포내 중성지방을 측정된 결과, JBE와 CA 처리로 세포내 중성지방의 축적을 유의적으로 감소하였다. JBE와 CA에 의한 지방산 산화 촉진 및 지방산 합성 억제 효과는 AMPK 활성화 억제제인 Compound C 처리에 의해 감소하였다. 본 연구결과는 종합해보면, JBE와 CA는 AMPK 활성화 경로를 통해 HepG2 세포에서 지질대사에 개선 작용을 가지고 있음을 제시해 준다.

감 사 의 글

처음 시작 했을 때 2년이라는 시간이 멀고도 길다고 생각하였지만 막상 논문을 준비하다보니 2년이라는 시간이 너무도 짧았습니다. 논문을 완성하고 2년을 돌아보니 너무 아쉽고, 후회가 됩니다. 조금이라도 더 했으면 ‘더 좋은 논문을 만들 수 있지 않았을까?’ 라는 생각이 듭니다. 2년 동안 논문을 완성하기 위해 많은 응원과 도움을 주신 모든 분들께 감사의 마음을 전합니다. 정말 감사합니다.

제일 먼저 보잘 것 없는 저를 받아주시고, 열정하나만 가지고 있는 저에게 그 열정을 더 키워 주시고 많은 가르침과 보살핌을 주신 지도교수님이신 김세재 교수님께 감사의 마음과 존경함을 전합니다. 교수님의 키워주신 열정과 가르침을 사회에 나가서도 잊지 않고 열심히 살아가겠습니다. 그리고 논문이 완성하기까지 세심하게 검토해주시고 걱정해주신 이선령 교수님, 김원택 교수님께도 감사의 마음을 전합니다.

그 다음으로 학부생활 늦게 실험실에 들어와 지금까지 많이 가르쳐 주시고, 응원과 도움을 주신 분자생물학 실험실 선·후배님들께 감사의 마음을 전하고자 합니다. 항상 많은 관심과 애정을 주시는 전형복 박사님, 고희철 박사님, 오대주 박사, 허성표 박사님께 감사의 마음을 전합니다. 많은 걸 깨우치게 해주시고 길을 가르쳐 주시고 많이 챙겨 주신 성일이형, 처음 실험을 배우게 해주시고 실험에 열정을 갖게 해주신 혜선누나에게 감사하고, 또 감사하다고 전하고 싶습니다. 앞으로도 선배님의 가르침을 잊지 않고, 열심히 살아가겠습니다. 언제든지 실험을 가르쳐주시는 준호형, 가끔 오셔서 좋은 말씀 해주시는 무한이형, 따끔한 충고와 따뜻한 마음을 주신 효민이형, 끝까지 응원과 격려 해주신 윤석이형, 웃음이 많은 윤실이, 먼저 졸업한 제시카 민진이, 후배한테 천사인 재영이형, 대학원 동기이지만 한참 선배이고 많은 걸 가르쳐 주고 도움을 많이 준 선아, 힘들때 편안하게 도와주고 나에게 웃음을 주는 승우, 두발 뺀고 잘 수 있게 나라를 지키는 상언이, 각자의 길에서 열심히 하고 있는 여진, 선희, 유경, 현태, 종현이, 실험할 때 많이 도와준 지연, 하나, 민호에게 많은 도움과 응원을 해주셔서 감사합니다.

그리고 대학원 졸업과 대학원을 다니고 계시는 지영이누나, 후돈이형, 한수, 정찬이형, 미연이, 은규형, 형우형, 영호 모든분들께도 감사의 마음을 전합니다. 또

한 항상 동생처럼 챙겨주시는 현수형 너무나 감사합니다. 그리고 생물학과 학부생들 다 말할 수 없지만 항상 뒤에서 응원해주셔서 감사하다고 전하고 싶습니다.

대학원 생활을 하면서 많이 만나지 못해서 섭섭하다고 한 친구들 10년 넘게 우정을 변함없이 지내고 있는 우리 버섯패밀리 리더 버섯 앞으로도 리더의 역할을 잘해주길 바라고, 요즘 한창 잘 나가는 요뱅이, 특이하지만 착하고 열심히 하는 고쟁이, 요즘 고민이 많지만 잘 될 뻥끼, 술만 적당히 먹으면 정말 좋을 놈 뚜비, 멀리 있지만 순수하고 착한 남봉이, 회를 썰고 있는 웃기고 정 넘치는 백수, 아들이랑 재미나게 살고 있는 곰팅이, 항상 웃으며 나라를 지키고 있는 벽진이 항상 믿고 지켜봐줘서 잘 졸업할 수 있었다. 고맙다. 10년 넘게 친한 친구들 만큼 우정이 넘치는 고등학교 친구들 나이가 먹으면서 달라지고 있는 조금 멋쟁이 아다리, 마음이 열리고 착하고 항상 친구를 생각해주는 균덩이, 멀리서 지내고 있지만 가끔 만나도 편한 친구 앞잡이 자주 보지는 못해도 항상 응원 해줘서 너무나 고맙다. 그리고 졸업동기들, 전과를 하면서 아웃사이더에서 벗어나게 해준 마약, 엉뚱하지만 재미있는 심바, 키만 겁나게 큰 전봇대, 살이찌서 점프가 잘 안되는 쫓우, 애교가 너무 넘치는 꼬꼬, 여자가 되어가는 나래형, 항상 응원해줘서 고맙고, 앞으로도 이 우정 오래가자. 그리고 보통사람들 창림이형, 소영이누나, 지훈이, 지원이 등 여러 모든 선·후배님들과 친구들 한명 한명 다 말할 수 없지만 감사하다고 전하고 싶습니다.

마지막으로 여기까지 올 수 있게 버팀목이 되어 주신 부모님께 감사하다고 전하고 싶습니다. 어릴 때부터 지금까지 항상 건강하게 아프지 않게 키워 주시고 많은 사랑 주셔서 감사합니다. 앞으로 제가 부모님이 주신 사랑보다 더 보답하겠습니다. 그리고 내 인생에 있어서 멘토가 되어준 누나, 지금까지 실험부터 논문 쓰는 것 까지 하나하나 물어보면 가르쳐 줘서 고맙고, 누나도 박사 후 과정 잘해서 더 좋은 결과를 얻기 바라고, 앞으로도 많은 가르침 부탁할게. 항상 응원해줘서 고마워. 내가 정말 힘이 없고, 포기하고 싶고, 방황 할 때 옆에서 항상 옆에서 힘이 되어준 소라에게 고맙다고 전하고 싶습니다.

항상 저를 응원해주시고, 격려해주시고 믿어주셔서 감사합니다. 앞으로도 더욱 열심히 해서 좋은 제자 또는 선·후배로, 친구로, 가족으로 살겠습니다. 항상 건강하시고 행복한 일만 가득하시길 바라겠습니다. 감사합니다.