



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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](#)

碩士學位論文

Ginsenoside Rg3의 지방형성 억제
효과 및 관련기전 연구

濟州大學校 大學院

食品營養學科

高 賢 娥

2019年 8月

Ginsenoside Rg3의 지방형성 억제 효과 및 관련기전 연구

指導教授 姜 仁 慧

高 賢 娥

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2019年 6月

高 賢 娥의 教育學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ (印)

委 員 _____ (印)

委 員 _____ (印)

濟州大學校 大學院

2019年 6月

Mechanisms by Which Ginsenoside Rg3
Attenuates Triglyceride Accumulation
in 3T3-L1 Adipocytes

Hyun-A Ko

(Supervised by professor Inhae Kang)

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

2019. 8

This thesis has been examined and approved.

Department of Food science & Nutrition

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

Abstract	iii
List of Abbreviations	v
List of Tables	vii
List of Figures	viii
I. 서론	01
II. 이론적 배경	04
1. 비만 (Obesity)	04
2. 지방세포 (Adipocyte)	05
3. 지방세포와 관련된 전사인자	05
3-1. PPAR α , C/EBP α	06
3-2. aP2, FABP4	06
3-3. nrf2	07
3-4. SIRT1	07
3-5. PGC-1 α	07
3-6. UCP1	08
3-7. TFAM	08
4. 백색지방조직과 갈색지방조직	09
5. 홍삼	10
6. Ginsenoside Rg3	11
III. 실험 재료 및 방법	12
1. 재료	12
2. 시료의 준비	12
2-1. 시료의 추출	12

3. 실험방법	14
3-1. 이화학적 특성	14
1) TPC (Total polyphenol content)	14
2) TFC (Total flavonoid content)	14
3) 진세노사이드 성분 분석	14
3-2. 세포 배양 및 지방세포 분화	16
3-3. 세포 생존율 측정 (XTT assay)	16
3-4. Oil Red O 염색에 의한 지방 측정량 측정	17
3-5. 유전자(mRNA) 발현 수준 확인	17
3-6. 단백질 발현 수준 확인 (Western blot)	19
3-7. Fatty Oxidation Rate Using [3H]-OA	19
3-8. Oxygen Consumption Rate (OCR) by Seahorse	20
3-9. Immunostaining	21
3-10. 통계분석	21
IV. 연구 결과	22
1. 홍삼(RG) 추출물의 3T3-L1 세포 분화 억제 효과	22
1-1. 3T3-L1 세포에 대한 세포 생존 능력	22
1-2. 홍삼(RG)의 3T3-L1 지방 세포에서 지방 생성 억제 효과	24
2. 이화학적 특성	28
2-1. TPC (Total polyphenol content) & TFC (Total flavonoid content) 측정	28
2-2. 진세노사이드 성분 분석	30
3. Rg3의 3T3-L1 세포 분화 억제 효과	32
3-1. 3T3-L1 세포에 대한 세포 생존 능력	32
3-2. Rg3의 3T3-L1 지방 세포에서 지방 생성 억제 효과	34
4. Rg3의 지방산 산화 및 미토콘드리아 산소 소비의 상향 조절로 인한 지방세포의 지방 생성 억제 효과	41
5. Rg3의 LPS로 유도된 갈색지방화와 mt DNA 억제 회복 효과	46

V. 고찰	53
VI. 요약 및 결론	57
VII. 참고문헌	59
< 국문초록 >	76

<Abstract>

Mechanisms by Which Ginsenoside Rg3 Attenuates Triglyceride Accumulation in 3T3-L1 Adipocytes

Hyun-A Ko

Department of Food science & Nutrition Graduate School

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

Supervised by professor Inhae Kang

Ginsenosides Rg3 has been reported to have extensive pharmacological activity such as anti-cancer, anti-inflammatory, anti-diabetic and anti-obesity.

However, the underlying mechanisms by which ginsenoside Rg3 attenuates lipid accumulation in adipocytes is largely unknown.

To address this question, Rg3 were added to 3T3-L1 cells during adipocyte differentiation. Rg3(60 μ M) significantly attenuated adipogenesis by inhibiting lipid accumulation in addition to reducing the level of adipogenic protein and gene expression such as PPAR γ , aP2, and C/EBP α .

Strikingly, mitochondrial biogenesis and energy metabolism-related gene expression (PGC1 α , Nrf2, and SIRT1) were also significantly increased by Rg3 treatment.

We next investigated whether Rg3 attenuated lipid accumulation in mature adipocytes. The presence of Rg3 caused a significant reduction in triglyceride (TG) accumulation, as measured by Oil-red-O (ORO) staining. Fatty acid (FA) oxidation was investigated via a radiolabeled-FA oxidation rate by measuring the conversion of [3H]-oleic acid (OA) to [3H]-H₂O was

upregulated of by Rg3 in mature 3T3-L1 adipocytes. Furthermore, Rg3 enhanced the mitochondrial oxygen consumption rate (OCR), especially maximal respiration, which measured by Seahore Flux analyzer in adipocytes. Although Rg3 did not significantly increase the expression of browning associated gene expression in Bt2-cAMP-mediated beige adipocyte, Rg3 prevented LPS-induced down-regulation of WAT browning in 3T3-L1 adipocytes which evidenced by increased UCP1 and PGC1 α gene, mitochondrial OCR, mitochondrial DNA transcription factor A (TFAM) protein, mtDNA expression.

In summary, Rg3 was effective in reducing lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes through by the augmetation of mitochondrial activation and fatty acid oxidation.

List of Abbreviations

- AMPK : AMP-activated protein kinase
aP2, FABP4 : fatty acid binding protein 4
BSA : Bovine Serum Albumin
cAMP : Cyclic adenosine monophosphate
C/EBP α : CCAT-enhancer-binding protein α
DMEM : Dulbecco's Modified EaDCRT Media
DMSO : Dimethyl sulfoxide
DEXA : dexamethasone
RG : red ginseng
FBS : Fetal bovine serum
FCS : Fetal calf serum
HPRT : hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase
IL-6 : Interleukin-6
IBMX : 3-isobutyl-1-methylxanthine
LPS : Lipopolysaccharide
MDI : methylisobutylxanthine, dexamethasone, and insulin
Nrf2 : Nuclear respiratory factor 2
OA : oleic acid
OCR : oxygen consumption rate
ORO : oil red O
PGC-1 α
: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
RG : red ginseng
SIRT1 : sirtuin 1
TNF- α : Tumor necrosis factor- α

TFAM : mitochondrial transcription factor A

TFC : total flavonoid contents

TPC : Total polyphenol content

UCP-1 : Uncoupling protein - 1

36B4, RPLPO : Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0

List of Tables

Table 1. Condition of LC/Mass for analysis of ginsenosides	15
Table 2. Primersequences ofthe investigated genes in a RT-PCR analysis	18
Table 3. Total polyphenol, flavonoid contents of Red ginseng extract	29
Table 4. Ginsenosides Contents of Red ginseng Extracts	31

List of Figures

Figure 1. Structures of ginsenosides Rg3	13
Figure 2. Effects of RG on cell viability in 3T3-L1 pre-adipocytes	23
Figure 3. TG accumulation in 96-well culture plates was visualized	25
Figure 4. extracted ORO staining was quantified (OD 500 nm)	26
Figure 5. adipogenic gene expression of PPAR γ , aP2, C/EBP by qPCR	27
Figure 6. Effects of RG on cell viability in 3T3-L1 pre-adipocytes	33
Figure 7. Rg3 inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes (Experimental scheme)	35
Figure 8. Effect of Rg3 inhibits adipogenesis extracted on ORO staining in 3T3-L1 adipocytes.	36
Figure 9. Effect of Rg3 inhibits adipogenic gene expression of PPAR, aP2, C/EBP by qPCR	37
Figure 10. Effect of Rg3 inhibits adipogenic protein expressions of Fas, PP AR γ , aP2, β -actin by Western blot analysis	38
Figure 11. Effect of Rg3 inhibits adipogenic gene expression of PGC1 α , Nr f2, SIRT1 by qPCR	40
Figure 12. Rg3 inhibits lipogenesis in 3T3-L1 adipocytes	42
Figure 13. Effect of Rg3 inhibits lipogenesis extracted on ORO staining in 3T3-L1 adipocytes	43
Figure 14. Rg3 attenuates lipid accumulation in cultures of adipocytes by upregulating fatty acid oxidation	44
Figure 15. Rg3 attenuates lipid accumulation in cultures of adipocytes by upregulating mitochondrial oxygen consumption	45
Figure 16. Rg3 recovers LPS-induced inhibition of browning	47
Figure 17. Effect of Rg3 of browning gene expression of UCP1, Nrf2, by qPCR	48

Figure 18. Effect of Rg3 recovers LPS-induced inhibition of browning gene expression of UCP1, PGC1 α by qPCR 49

Figure 19. Rg3 recovers LPS-induced inhibition of browning by upregulating mitochondrial oxygen consumption 50

Figure 20. Effect of Rg3 inhibits adipogenic protein expressions of pAMPK α , tAMPK, UCP1, TFAM, β -actin by Western blot analysis 51

Figure 21. Rg3 recovers LPS-induced inhibition of Immunostaining by seahorse 52

I. 서 론

1996년 세계보건기구가 ‘비만은 장기치료가 필요한 질병’으로 규정한 이래로 현재 21세기 인류가 극복해야 할 중요한 질병 중 하나로 생각되고 있다 [1]. 비만이란 단순히 체중이 많이 나가는 것을 의미하기보다 ‘체내에 과다하게 많은 양의 체지방이 쌓여있는 상태’를 말한다 [2]. 비만은 비만으로 그치는 것이 아니라 각종 질병의 원인이 될 수 있으며, 정신적인 질병까지 유발할 수 있다. 제2형 당뇨병, 이상지질혈증, 고혈압, 심혈관 질환 등 사망으로 이어질 수 있는 각종 질병의 이환율을 높이기 때문이다 [3, 4]. 즉, 비만은 대사적 이상이 없더라도 비만 그 자체로 인해 합병증이 나타날 수 있다. 따라서 비만은 이환율, 장애 발생률, 사망률을 유의하게 높일 뿐이 아니라 삶의 질까지도 저하시킨다 [5]. 하지만, 여러 가지 보고들에 의하면 5~10% 정도의 체중감량만으로도 비만과 관련된 질환, 증상 및 이로 인한 합병증을 임상적으로 크게 감소시킬 수 있는 것으로 알려져 있으므로, 적극적으로 적절한 체중을 장기간 유지하는 것이 매우 바람직하다 [6].

지방세포는 에너지 항상성 및 대사에서 중요한 역할을 한다 [7]. 지방세포의 변화 양상에 따른 비만은 증식형, 비대형, 혼합형으로 나눌 수 있다.

증식형은 분열로 인해 세포 수는 증가하지만 세포의 크기는 일정한 경우이다. 아이들은 성장과 발달을 하기 때문에 세포의 증식이 잘 이루어진다 [8].

지방은 인체에 필요하기 때문에 적절한 시기에 분열을 할 필요가 있다. 하지만, 과도한 칼로리의 섭취는 저장과 성장을 동시에 만족시키기 위해 크기가 커지는 거보다는 증식을 선택하게 된다 [9, 10].

비대형은 세포 수는 거의 변화가 없는데, 세포 자체의 크기만 증가하는 경우이다. 지방세포는 일단 만들어지면 죽을 때까지 없어지지 않고 크기만 변화한다 [11]. 성인 비만의 경우 대체로 비대형을 띄지만 체내 지방세포가 꼭 차서 더 이상 지방을 축적할 수 없을 경우에는 지방세포는 분열한다 [12].

혼합형은 세포수가 분열에 의해 늘어나고 세포의 크기도 늘어나는 경우이다. 성장기 비만이 성인비만으로 이어지는 경우가 대부분이지만, 소아의 경우 비대형보다는 증식형이 우세하고, 성인의 경우 증식형 보다 비대형으로 우세하게 진행된다 [13].

지방조직의 성장은 크게 두 가지로, 첫째 지방크기가 증가되는 것과, 둘째 새로운 지방세포가 전구지방세포로부터 분화되는 것이다 [14]. 임상적으로 지방을 줄이려는 노력이 쉽지 않은 까닭은 지방세포의 크기는 식사조절로 가능하다고 알려져 왔지만 [15, 16], 새로운 전구지방세포가 지방세포로 분화되는 과정은 식사조절로 가능하지 않다.

전구지방세포가 형태학적으로나 생화학적으로 완벽히 성숙된 지방세포로 분화될 때는 지방세포 유전자의 조절부위에 중요한 전사활성인자가 활성화 되어야 한다. 이들 중 가장 잘 알려진 두 가지는 C/EBP과 PPAR이고 이들은 지방세포 유전자조절부위와 상호작용으로 지방세포분화를 촉진시킨다. 이들 전사활성인자의 역할은 지방축적과 관련된 효소의 유전자 발현을 활성화하고 음식섭취와 같이 지방세포와 전구지방세포를 조절하는 분비단백질의 유전자 발현을 활성화 (example: leptin)하는 것이다 [17, 18].

홍삼은 인삼의 재배 적지에서 생산된 좋은 품질의 수삼을 엄선하여 껍질을 벗기지 않은 상태로 장시간 증기로 찌서 건조시킨 담황갈색 또는 담적 갈색을 띠는 인삼이다[19].

진세노사이드는 인삼의 함유된 사포닌을 말하며, 인삼과 글리코시드의 합성어로 인삼에서 추출한 글리코시드(배당체)라는 의미가 있다 [20-24]. 진세노사이드는 탄소기본골격에 당분자가 결합된 배당체인 견고한 다당 구조이다 [25]. 탄소기본골격은 소수성이 높는데 그런 골격에 친수성이 높은 당분자가 결합되면 이것은 세포막지질에서의 용해도가 감소하여 체내 흡수율이 낮아지게 된다. 예를 들어 진세노사이드의 성분 중에서 당분자가 4개가 결합된 Rb1의 체내 흡수율은 1% 정도로 매우 낮다 [26-28]. 전체 홍삼에서 사포닌이 차지하는

비중은 평균 1~3% 정도의 미량이며, 그 중에서 Rb1과 Rg1의 비중이 50%를 차지하고 있다. 그러나 인삼, 홍삼, 산삼에 함유된 RB1, RG1, RB2와 같은 성분은 사람의 체내에 흡수율이 매우 낮으므로 Rg3, RH1, Compound-K와 같은 특이사포닌으로 변환이 되어야 흡수가 가능해 진다 [29-32].

그 중 암세포의 생성 및 전이를 억제하는 것은 물론 미토콘드리아 활성 증가, 항 노화 등으로 가장 주목받는 생리활성 물질인 RG3는 인삼에서는 발견이 어렵고 인삼을 가공한 홍삼이나 산삼에 함유량이 많은 것으로 알려져 있다. 아직 RG3의 지방분화기전에 대한 연구는 부족한 실정이다 [33-42].

지방세포는 해부학적 위치, 형태학적 구조, 기능 및 조절에 따라 백색지방과 갈색지방으로 구별된다. 갈색지방은 붉은색의 철분이 존재하는 미토콘드리아가 많은 지방이다. 미토콘드리아는 에너지와 열을 만드는 곳인데, 특이한 것은 일반 근육과 달리 갈색지방의 미토콘드리아에는 UCP1(Uncoupling protein1)이라는 물질이 많은데 에너지 생산 대신 열을 생산하게 하는 일을 한다 [43]. 2009년 미국 당뇨센터에서 성인에게도 기능적인 갈색 지방이 있다는 사실을 발견하였다. 그 이후 과학자들은 비만 및 2형 당뇨병 치료를 위해 갈색지방을 만들어 내는 방법을 찾는 연구에 주력하였다 [44-46].

운동 실시에 따라 이리신이라는 물질 등이 피하지방조직의 갈색화와 UCP1의 발현을 촉갈색화가 촉진되는 것으로 알려져 있다 [47]. 백색지방의 갈색지방화에 관여하는 물질 및 메카니즘은 계속 연구되고 있지만 아직 Rg3의 미토콘드리아 활성 증가에 따른 갈색지방화 기전에 대한 연구는 부족한 실정이다. Ginsenoside Rg3가 세포실험을 통해 지방전구세포에서 지방형성을 억제하고 그와 연관된 관련기전에 대한 연구를 함으로써 체중, 체지방 감소등 비만의 어떠한 영향을 주는지 비만의 영양관리 방안 모색을 위한 항비만 식품 개발의 데이터 베이스를 구축하고, Rg3 생리기능성에 대해서 구명 할 수 있을 것이다. 비만을 치료 할 수 있는 천연화합물의 연구가 비만치료제로 사용될 수 있을 지에 대한 근거 자료를 제시하고자 하였다.

II. 이론적 배경

1. 비만

1997년 WHO(세계보건기구)는 비만을 치료해야 할 ‘질병’으로 정의했다. 또한, 최근에 와서는 비만을 21세기의 새로운 전염병으로 제시하였다 [1]. 비만은 단순한 체중의 증가뿐만 아니라 체내 에너지 대사 이상 즉, ‘에너지의 과잉 축적 또는 에너지 소비의 감소’ 정의할 수 있다 [48, 49]. 이러한 에너지 대사 이상은 당뇨병, 고지혈증, 동맥경화, 심혈관 질환 및 암 등의 다양한 만성 질환의 위험을 증가시키는 것으로 보고되었다 [48].

대사증후군은 복부비만, 고혈압, 고혈당, 이상지질혈증등과 같은 대사성 질환이 한 사람에게 복합적으로 나타나는 대사 장애이다. 즉, 제2형 당뇨병, 이상지질혈증, 고혈압, 심혈관 질환 등이 비만으로 매개된 대사성 질환이다 [50].

국민건강영양조사 2017(Korea Centers for Disease Control and Prevention 2019) 결과에 따르면 우리나라의 비만 유병율은 남자42.4%, 여자 27.7%이다. 또한 당뇨병 유병률은 남자 12.4%, 여자 8.4%이며, 이상지질혈증 유병률은 남자 20.0%, 여자 22.6%이다. 따라서 비만 인구의 증가는 전세계적인 문제로 대두되고 있다. 그러므로, 비만을 예방하고 치료하기 위한 연구는 여전히 중요하기 때문에 천연 물질 및 식품 소재, 식품 기능성에 대한 많은 연구가 진행되고 있다 [51, 52].

2. 지방세포(adipocyte)

비만은 에너지의 섭취와 소비가 불균형을 이룰 때 지방세포가 분화를 하면서 세포수가 증가하는 Hyperplasia 또는 지방세포의 지방축적으로 세포의 크기가 증가하는 Hypertrophy 이 두가지의 메커니즘으로 인하여 유발된다 [53]. 또한, 비만은 세포 생물학적 수준에서 비만은 세포의 생물학적 수준에서 지방조직의 섬유아세포 형태로 존재하는 지방전구세포가 지방세포로 분화 증식하게 되고, 세포 내 지방구가 축적되어 성숙한 지방세포로 성장하는 특징을 갖게 된다 [54].

adipogenesis는 미분화된 지방 전구세포(Preadipocytes)가 완전히 분화된 성숙한 지방세포(adipocytes)로 전환되는 과정을 말한다 [55]. 또한, 지방세포는 지질 대사 및 에너지 균형 조절에 중요한 역할을 하는 고도로 특화된 세포이다. 지방전구세포가 형태학적으로나 생화학적으로 완벽히 성숙된 지방세포로 분화되는 과정에서는 다양한 전사 인자 및 지방세포의 특이적 유전자의 발현 증가를 동반한다 [56].

3. 지방세포와 관련된 전사인자

3T3-L1 지방세포는 지방전구세포 단계에서 여러 호르몬과 전사인자들이 작용하여 분화되면서 생성되며, 세포 내 중성지방을 축적한다. 3T3-L1 지방전구세포는 DEXA(dexamethasone), IBMX(3-isobutyl-1-methylxanthine) 및 insulin을 함유한 MDI 호르몬 칵테일을 처리하면 지방세포 분화가 촉진된다. 지방조직의 분화는 다른 세포분화와는 다르게 여러 호르몬, 그리고 다양한 전사인자들의 상호작용을 통해 이루어지게 된다 [57]. 지방전구세포에서 지방세포로 분화가 되는 과정은 지방산과 prostaglandin과 같은 ligand가 PPAR γ (Peroxisome proliferator activated receptor gamma)에 결합하고

glucocorticoids와 같은 호르몬이 C/EBP β (CCAAT/Enhancer binding protein beta)와 C/EBP δ , SREBP-1c (sterol regulatory element binding protein) 에 작용하게 되어 시작하게 된다 [58-60]. 그리고 각각의 전사 인자는 FAS (fatty acid synthase), ACC (acetyl-CoA carboxylase)를 비롯하여 다양한 지질 대사와 관련된 효소의 발현을 조절하고, 에너지 대사에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [57, 61, 62].

3-1. PPAR γ , C/EBP α

PPAR γ (Peroxisome proliferator activated receptor gamma), C/EBP α (CCAAT-enhancer-binding protein α) 는 지방전구세포에서 지방세포로 분화가 되는 과정에서 활성화 된다 [63, 64]. 또한, PPAR γ 와 C/EBP α 는 leptin과 adiponectin 등 지방합성 유전자들의 발현을 조절한다 [65]. 특정 ligand에 의한 PPAR γ 와 C/EBP α 의 발현을 억제함으로써 지방합성을 억제시켜 항비만 효과를 유도 할 수 있다 [66].

3-2. aP2 (FABP4)

또한, 이러한 전사인자로 인한 adipose-specific 유전자인 aP2 (adipocyte protein 2)의 발현이 유도된다 [67]. aP2 (adipocyte Protein 2)는 FABP4 (fatty acid binding protein 4) 라고 불리기도 하며 [68], 지방산의 운반체 단백질로, 주로 지방세포와 대식세포에서 발현된다. aP2 (adipocyte Protein 2) 는 지방세포에서 가장 풍부한 단백질 중 하나이고, adipogenesis동안 PPAR γ 의 발현을 유도하게 된다 [69]. 이 단백질을 유전자 공학이나 약물로 억제하는 것은 심장병, 당뇨병, 천식, 비만, 지방간질환, 암등을 치료할 가능성이 있다고 알려져 있다 [68].

3-3. nrf2

Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2)는 사람에게서 NFE2L2 유전자에 의해 코딩되는 전사인자 이다 [70]. 또한, Nrf2 전사활성 인자는 ARE(antioxidant response elements)와 결합하여 산화 스트레스 반응 유전자의 발현을 조절한다 [71]. 그리고 항산화 반응 유전자의 기본 발현 조절을 통해 세포 항상성을 유지한다 [72]. Nrf2와 다른 전사인자의 작용은 산화스트레스에 대한 반응을 중재한다 [73]. 또한, Nrf2의 발현은 copd와 관련이 있다 [74]. 폐암 세포주에서 Nrf2 활성이 세포 증식 속도와 직접적으로 연관이 있으며, siRNA에 의한 Nrf2 발현 억제는 항암 약물에 의한 세포 사멸을 증가시킨다 [75]. Nrf2 활성이 AhR(aryl hydrocarbon receptor) 신호를 유도하고 지방 생성을 억제 할 수 있다고 보고되었다 [76].

3-4. SIRT1

세포 내 단백질인 sirtuin family의 7개의 단백질중 지방 세포내의 SirT1은 NAD (nicotinamide adenosine dinucleotide) dependent deacetylase 이다 [77]. SirT1은 내분비 신호, 포도당 항상성, 노화 및 수명과 같은 많은 세포과정의 조절에 관여하는 핵 단백질이다. SirT1의 표적단백질은 p53, p300, Ku70, forkhead (FoxO) transcription factors, PPAR γ , PGC-1 α 등 이다. 또한, PPAR γ 와 PGC-1 α 의 탈 아세틸화는 간에서의 포도당생성/당분해 경로를 조절하고, 금식에 반응하여 백색 지방 세포에서의 지방을 조절한다 [78-84]. 또한, SirT1은 지방산 β 산화를 감소시키며, SirT1의 과발현은 PPAR α 의 발현을 유도하고 [85], 베타세포에서 UCP2(uncoupling protein 2)를 조절하여 인슐린 분비에 영향을 준다 [86].

3-5. PGC-1 α

PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha)는 사람에게서 PPARGC1A 유전자에 코딩되는 단백질이다 [87].

PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha)는 HAR20 (human accelerated region 20) 으로서도 알려져 있다 [88]. 또한, PGC-1 α 는 에너지 대사에 관여하는 유전자를 조절하는 전사보조인자 (transcriptional coactivator)이다. 이것은 미토콘드리아 생합성의 주된 조절인자이다. 근육에서 PGC-1 α 라는 단백질이 생성될 경우, 백색지방이 갈색지방으로 전환된다는 사실이 밝혀졌고, 이 단백질은 핵 수용체(nuclear receptor)인 PPAR- γ 와 상호작용하여 이 단백질과 다중 전사인자의 상호작용을 가능하게 한다 [89-91]. PGC-1 α 는 또한 혈압을 조절하고, 세포의 콜레스테롤 항상성을 조절하며, 비만을 일으키는데 관여할 수 있다. 뿐만 아니라 당(glucose) 대사에 관여하는 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다 [92].

최근 연구에서는 PGC-1 α 가 근육운동으로 인해 β -aminoisobutyric acid 분비를 일으킨다고 제안되었다. 백색지방에서의 β -aminoisobutyric acid의 효과는 백색지방세포에서 갈색지방세포의 특이적 유전자의 발현을 증가시키고 in vitro 및 in vivo에 간세포에서 β -산화를 증가 시킨다 [93].

3-6. UCP1

UCP1 (Uncoupling protein 1)은 주로 갈색지방조직 (BAT)에서 발현되는 미토콘드리아 내부 막 수송 단백질이다. 또한, ATP 합성을 산화적 인산화로부터 분리하여 열 에너지를 방출 시킨다. 그 결과 UCP1은 열 발생에 중요한 역할을 한다 [94].

연구 결과에 따르면 mice에 피하지방세포에는 저농도의 UCP1 단백질을 발현하는 베이지 지방세포가 함유되어 있다 [95]. UCP1과 관련한 연구들에서 비만 및 제2형 당뇨병과 관련 있음을 알 수 있다 [96].

3-7. TFAM

TFAM (mitochondrial transcription factor A)은 HMG(high-mobility group) 단백질의 구성원이다. TFAM은 mtDNA의 전사인자이며 대사에 필수

적인 역할을 하는 핵단백질로서 [97], 대다수의 ATP 생산은 미토콘드리아 호흡 연쇄에 의존하기 때문에 미토콘드리아 게놈(genome)의 유지는 정상적인 건강에 중요하다. TFAM은 mtDNA 와 결합하여 mtDNA 전사 개시, packaging, 복제 기전을 조절하면서 mtDNA 사본의 수 조절 유지 및 ATP 생산의 유지에 필수적인 역할을 한다 [98, 99].

4. 백색지방조직과 갈색지방조직

지방조직에는 백색지방(WAT : White adipose tissue) 와 갈색지방(BAT: brown adipose tissue)의 두 가지 종류가 있다 [43]. 에너지를 저장하는 역할을 하는 백색지방은 허리살이나 뱃살의 주범으로 알려져 있고, 미관상으로는 건강상으로 해롭다고 알려져 있다 [100]. 그러나 갈색지방은 음식으로부터 얻은 에너지를 백색지방으로 저장하는 대신에 열로 전환시켜 신체를 따뜻하게 유지하는 역할을 한다 [43]. 다시 말해, 백색지방은 과잉의 에너지를 저장하고, 갈색지방은 에너지를 열로 방출하여 에너지를 생성시키고, 어린이들의 체온을 유지하는데도 도움을 준다고 알려져 있었다. 과거 신생아에게만 존재하는 것으로 알려졌던 갈색지방이 [101] 최근 연구결과에서 성인에게서도 쇠골에서 갈색지방세포가 존재 할 수 있음이 보고되었다 [102].

어떠한 특정한 환경에 노출에 의해 백색지방 세포의 갈색지방화의 가능성이 밝혀졌고, 이러한 연구 결과는 에너지 소비가 증가되고 체중증가가 억제되는 것을 알 수 있다 [103]. 베이지색 지방세포 역시 갈색지방세포와 유사하게 에너지를 소비하는 UCP1을 발현하고 [104], BMP7, ANP, FGF2와 같은 다양한 전사인자들에 의해서 베이지색 지방세포로 유도 될 수 있고, 근육에서의 inrigin, 간에서 FGF-21이 분비되어 미토콘드리아의 수 뿐만 아니라 미토콘드리아 내의 특징적인 게놈인 mtDNA의 수가 증가되는 것으로 보고되었다 [95]. 또한, 최근 여러 문헌에 적은 mt DNA 사본수가 비만, 심근경색증 및 암을 포함한 다양한 질병과 관련되어 있다고 보고되었지만, 이에 대한 정확한 기전은

밝혀지지 않았다 [105, 106].

5. 홍삼

인삼 (*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 고려 인삼이라고도 하며 오갈피나무과 (*Araliaceae*)의 인삼속(*Panax*)에 속하는 다년생 초본류로 아시아에서는 그 뿌리를 인삼(*Ginseng radix*)이라고 한다 [107-109]. 인삼은 수천 년 동안 동아시아의 여러 질병을 예방하거나 치료하는데 사용되어 왔다 [110]. 또한 인삼은 가공방법에 따라 홍삼과 백삼으로 분류되어 진다 [111].

그 중에서 홍삼은 국내의 연구자들에 의해 많이 연구되어 왔으며, 진세노사이드(ginsenoside)가 주요 기능성 화합물임은 알려져 있다 [112]. 홍삼(紅蔘, 영어: hongsam, Korean red ginseng)은 한약의 일종으로, 인삼 *Panax ginseng* C. A. Meyer (두릅나무과 *Araliaceae*)을 고온, 고압의 증기로 찌고 말려서 만들어진다 [113]. 연구에 따르면, 홍삼은 백삼과 비교하여 상대적으로 약리활성이 우수한 것으로 보고되었다. 이는 열처리하는 동안 생성되는 홍삼 특유의 성분과 이들의 함량이 증가되는 것에 의한 것으로 보고되었다 [114]. 홍삼은 증기로 찌는 과정에서 효소가 불활성화 되고 호화현상으로 조직이 견고해져서 10년 이상 장기보관이 가능해진다 [115]. 이러한 가공 과정에 의해 인삼에 있는 배당체로서 사포닌으로 통칭되는 화합물군인 진세노사이드와 산성 다당체 같은 기능성 물질들의 함량이 증가하거나 전환되어 Malto과 같은 인체에 유익한 8가지의 새로운 성분들이 생성된다 [116]. 홍삼의 대표적인 약리활성은 당뇨병, 면역기능강화, 항산화, 피로회복, 암 발생억제 등이 있다 [117, 118].

6. Ginsenoside Rg3

진세노사이드(ginsenoside)는 천연 스테로이드 글리코사이드이자 트라이터펜 사포닌의 일종이다. 이계열의 화합물은 인삼 속에 속하는 식물 속에서 많이 발견되며, 인삼 화합물에 대한 약리학적 연구에서 주요 성분으로 지목되고 있다 [116]. 진세노사이드는 구조에 따라 유형이 다양하고 함유 조성과 관능적 특성은 추출온도와 추출시간 등에 따라 변화 한다 [117-119]. 특히, 홍삼을 가열하여 추출하면 가수분해 반응에 의해 화학성분의 구조적 변화가 일어나 진세노사이드 Rg2, Rg3, Rh1 및 Rh2 등의 prosapogenine으로 생성 된다 [67, 121]. 진세노사이드(ginsenoside)는 많은 연구를 통해서 암세포증식의 억제 [122], 항산화 효과(Bae and Kim, 1998) [123], 항 고혈압 [124], 혈당 강화 [125], 기억력 증진 [126], 뇌혈류 증진 [127], 등 다양한 생리적 약리 효능이 밝혀지고 있다. 홍삼에 미량으로 존재하는 이러한 진세노사이드들은 기존에 인삼에 함유되어 있는 진세노사이드보다 치매예방, 면역증가, 항산화 등의 효능에서 월등한 약리활성이 검증되어 이러한 사포닌 생성을 위한 연구에 관심이 높아지고 있다 [128]. 이들 진세노사이드 중에서 홍삼의 증숙 과정에서 만들어진 홍삼 특유의 성분으로 진세노사이드 Rg3는 효능이 상당히 높다 [40, 129]. Ginsenoside Rg3는 aglycone 20번 위치의 chiral 탄소에 의하여 20(S)-Rg3와 20(R)-Rg3로 분류된다. 또한, 진세노사이드 Rg3는 Rd, Rb1, 및 Rb2와 같은 PPD ginsenosides의 열처리에 의해 주로 생성 된다 [131].

최근의 연구에 따르면 진세노사이드 Rg3는 중앙억제 및 항암전이, 항염증제, 간 보호효과, 신장보호 작용, 면역효과, 혈관확장, 혈소판 응집억제 효과, 항당뇨 및 인슐린 분비 촉진과 같이 광범위한 약리학적 활성을 가지고 있다 [33-40]. 그러나, 최근 연구에서 여러 가지 생리활성 효과와 작용 기전에 대한 연구 결과들이 보고되고있고, 항비만 효과에 대한 보고도 있지만, Rg3의 항비만 효과에 대한 연구, 그리고 Rg3의 미토콘드리아 활성 증가에 따른 갈색지방화 기전에 대한 연구는 아직 부족한 실정이다 [41, 42].

Ⅲ. 실험 재료 및 방법

1. 재료

모든 세포 배양과 관련된 물품은 SPL (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 화학 물질 및 시약은 달리 명시되지 않는 한 Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

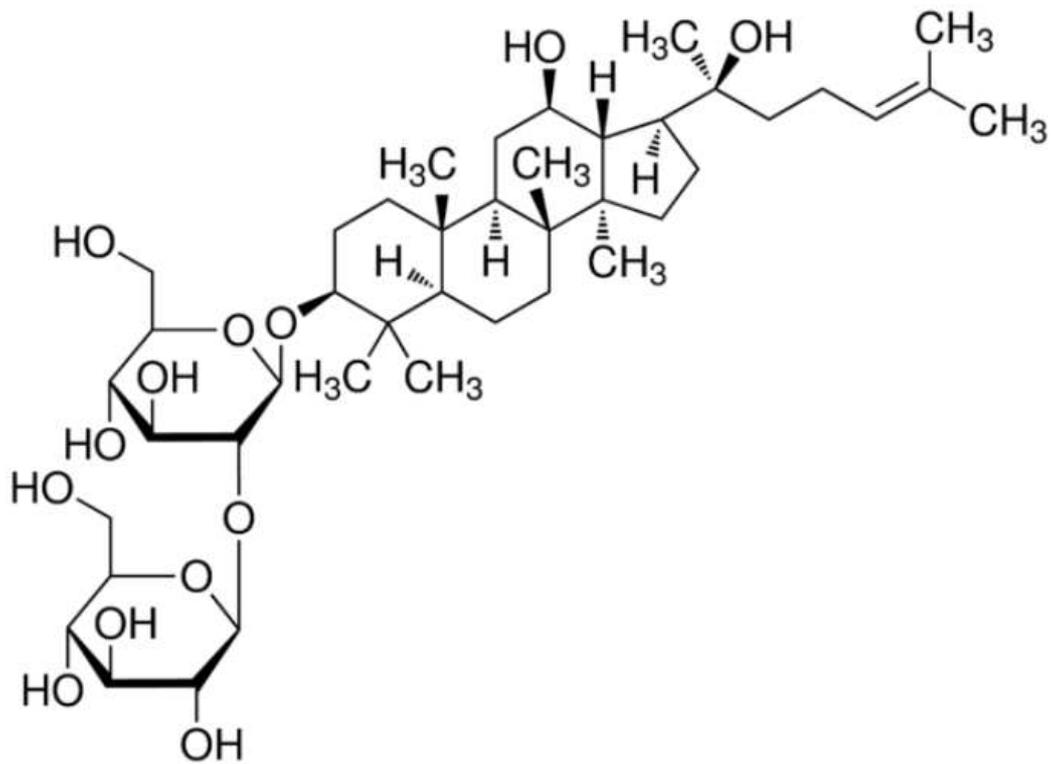
2. 시료의 준비

Ginsenoside Rg3는 Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 농축 농도 (40mg/ml)로 DMSO에 용해하고, -20°C에 보관하였다. Fig.1은 Ginsenoside Rg3의 화학분자구조를 보여준다. 본 연구에 사용된 RG는 6년근 홍삼근을 분쇄하여 분말형태로 만든 홍삼분말로써 풍기인삼농협 (Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

2-1. 시료의 추출

RG 분말 10g을 3차증류수 100mL와 혼합하였다. 다음으로 감압여과 (Whatman, Maidstone, UK) 하여 출물을 얻은 후, 이를 동결 건조시켜 분말 추출물을 얻었다. 최종적으로, 샘플을 62.5mg/ml의 농도로 DMSO에 용해시키고 시료로 사용되었다.

Figure 1. Structures of ginsenosides Rg3.



3. 실험방법

3-1. 이화학적 특성

1) TPC (Total polyphenol content)

RG 추출물의 총 폴리페놀 함량 (TPC)은 변형 된 Folin-Denis 방법 [132]을 통하여 측정하였다. 시료(10mg/mL, 5mg/mL) 10 μ l 및 1M Folin-ciocalteu phenol reagent (sigma) 75 μ l을 96-well plate에 각 well에 첨가한 후, 실온에서 5분간 반응시켰다. 4% Na₂CO₃ 용액을 반응물에 75 μ l 첨가하고, 1시간 동안 반응시키고 알루미늄 호일과 상자를 사용하여 빛으로부터 보호하였다. 흡광도는 분광 광도계 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)에 의해 실온에서 720 nm에서 측정하였다. Gallic acid를 표준물질로 하였고, 표준곡선을 바탕으로 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정하였다.

2) TFC (Total flavonoid content)

RG 추출물의 총 플라보노이드 함량 (TFC)은 변형 된 Moreno et al 방법 [133]을 통하여 측정하였다. 시료(10mg/mL, 5mg/mL) 20 μ l 및 증류수 100 μ l를 혼합하여 5% NaNO₂(Sodium nitrite) 6 μ l를 첨가하고 혼합물을 실온에서 6분간 반응시켰다. 그 후, 10% AlCl₃(Aluminium chloride) 12 μ l를 첨가하여 5분간 실온에서 반응시킨 후에, 총 40 μ l 1M NaOH를 첨가하고 510nm에서 반응물 흡광도를 측정 하였다. catechin을 표준물질로 하였고, 표준곡선을 바탕으로 추출물의 총 플라보노이드 함량을 측정하였다.

3) 진세노사이드 성분 분석

RG 분말의 진세노사이드 Rg1, Re, Rh1, Rg2, Rb1, Rc, Rb2, Rg6, Rg3, Rh2의 함량을 분석하였다. 성분은 증류수와 유기용매를 이용하여 시료에서 진세노사이드 성분을 추출한 후 최대 흡수파장인 203nm에서 정량 분석을 하였다. (표1)

Table 1. Condition of LC/Mass for analysis of ginsenosides

항목	조건
주입량	10 μ L
검출기파장	203 nm
칼럼 온도	30 $^{\circ}$ c
이동상	A : 증류수 B : 아세토니트릴
유속	1.0 mL/분

3-2. 세포 배양 및 지방세포 분화

실험에서 사용된 3T3-L1 지방전구세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. Dulbecco's Modified EaDCRT Media (DMEM, Gibco BRL)에 1% Penicilin/streptomycin (P/S)과 10% Fetal calf serum (FCS)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 세포수의 증식에 따른 과밀도 현상을 막기 위하여 성장배지의 교환을 매 24-48시간마다 실시하였으며, 세포의 밀도가 약 80%일 때 계대 배양(Subculture)을 실시하였다. Confluence 상태가 될 때까지 배양한 후에 분화시키기 위하여 10% Fetal bovine serum(FBS, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 성장배지를 교환해 주었으며, 48시간이 지난 후 (day 0) 500µM IBMX, 1µM Dex, 2nM insulin (MDI)과 10% FBS가 첨가된 DMEM에서 추출물과 함께 처치 후 48시간 동안 분화 유도를 하였다. 48시간이 지난 후(day 2), 2nM insulin (MM)과 10% FBS가 첨가된 DMEM에서 추출물과 함께 처치 후 48시간동안 배양하였으며, 원하는 분화 정도까지 24-48시간마다 배지를 교환하였다. Lipogenesis 즉, 성숙한 지방세포에서 Rg3와 RG를 처치할 경우 48시간이 지난 후(day 2) 2nM insulin (MM)과 10% FBS가 첨가된 DMEM에서 성숙한 지방세포가 될 때까지 배양하였고, 성숙한 지방세포로 완성된 후 Rg3를 3일동안 처치하였다. 배지는 24-48시간마다 교환하였다. HepG2는 Korean Cell Line Bank(KCLB, Seoul, South Korea)에서 얻어졌다. Dulbecco's Modified EaDCRT Media (DMEM, Gibco BRL)에 1% Penicilin/streptomycin (P/S)과 10% Fetal bovine serum (FBS)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였고, Fatty Oxidation Rate용으로 사용하였다.

3-3. 세포 생존율 측정 (XTT assay)

Rg3와 RG가 3T3-L1의 세포 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위해 XTT Cell Viability assay (Cell signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 수행하였다. 3T3-L1 세포를 96well-plate에 100ul의 10% FCS와 함께 24시간동안 배양하였다. 그 후, 각 well마다 Rg3와(20,40,60 µM), RG를 (30,60,90,120,150 ug/ml) 농도별로 처치하여 24시간 동안 배양하였다.

control group에는 FCS만 첨가하였다. 그 후, 배지를 fresh한 media로 농도별로 교환해주고 각 well에 XTT detection solution을 50 μ L 첨가하고 37도에서 3시간 동안 배양한 후 분광 광도계 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)에 의해 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3-4. Oil Red O 염색에 의한 지방 측정량 측정

지방세포에서 지질 축적을 측정하기 위해 중성지방만 붉은색으로 염색하는 Oil Red O(ORO)로 염색법을 사용하였다. 세포를 96well-plate에 Rg3와 (10,20,40,60 μ M), RG를 (30,60,90,120,150 μ g/ml) 농도별로 처리하면서 분화시켰다. 분화유도가 끝난 세포는 HBSS로 washing 하였고, 세포를 고정시키기 위해 10% Formaldehyde를 첨가하고 실온에서 1시간동안 고정시켰다. 그 후, Formaldehyde를 제거하고 60% Isopropanol로 washing 한 후, 10% formalin으로 실온에서 30분간 고정시킨 후에 Oil Red O working solution (sigma, Oil Red O 0.7g을 200ml Isopropanol에 녹인 용액으로 증류수와 6:4 비율로 섞은 후 0.2 μ m으로 Filter한 용액)으로 10분간 염색하여 H₂O로 4번 washing 하였다. 염색된 세포는 CKX41 도립 현미경 (Olympus, Melville, NY, USA)에서 관찰하였으며, ORO 염색약을 100% Isopropanol로 추출하여 지질 축적량을 흡광도 500nm에서 측정하였다.

3-5. 유전자(mRNA) 발현 수준 확인

분화유도가 끝난 세포는 HBSS로 washing하여 Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 세포에서 RNA를 추출하였다. 그 후, RNA 농도는 NanoDrop (Nano-200 Micro-spectrophotometer, Hangzhou City, China)에 의해 측정되었다. 1 μ g의 RNA를 20 μ L(iScript cDNA Synthesis kits, Bio-Rad, CA, USA)의 부피로 cDNA synthesis을 하였다. 유전자 발현 수준은 Real time PCR CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad,CA,USA)를 이용하여 분석하였다. Control은 36B4, RPLPO (Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0) 또는 HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase)를 사용하였다. mRNA sequence 표2에 나타내었다.

Table 2. Primer sequences of the investigated genes in a RT-PCR analysis

Primer	Primer Sequences	
SIRT1	Foward	DNA - GG TAT CTA TGC TCG CCT TGC
	Reverse	DNA - AC ACA GAG ACG GCT GGA ACT
36B4 (RPLPO)	Foward	DNA - GG ATC TGC TGC ATC TGC TTG
	Reverse	DNA - GG CGA CCT GGA AGT CCA ACT
UCP-1	Foward	DNA - AG GCT TCC AGT ACC ATT AGG T
	Reverse	DNA - CT GAG TGA GGC AAA GCT GAT TT
PGC-1 α	Foward	DNA - CC CTG CCA TTG TTA AGA CC
	Reverse	DNA - TG CTG CTG TTC CTG TTT TC
Nrf2	Foward	DNA - TG GAG AAC ATT GTC GAG CTG
	Reverse	DNA - CT GAG CCG CCT TTT CAG TAG
TFAM	Foward	DNA - GT CCA TAG GCA CCG TAT TGC
	Reverse	DNA - CC CAT GCT GGA AAA ACA CTT
PPAR γ	Foward	DNA - GG CGA TCT TGA CAG GAA AGA C
	Reverse	DNA - CC CTT GAA AAA TTC GGA TGG
CEBP α	Foward	DNA - GG TTT TGC TCT GAT TCT TGC C
	Reverse	DNA - CG AAA AAA CCC AAA CAT CCC
aP2	Foward	DNA - AG CAT CAT AAC CCT AGA TGG CG
	Reverse	DNA - CA TAA CAC ATT CCA CCA CCA GC
HPRT	Foward	DNA - TT GCT CGA GAT GTC ATG AAG GA
	Reverse	DNA - AG CAG GTC AGC AAA GAA CTT ATA GC

- 1) SIRT1: sirtuin 1
- 2) 36B4(RPLPO) : Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0
- 3) UCP-1 : Uncoupling protein - 1
- 4) PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
- 5) nrf2 : Nuclear respiratory factor 2
- 6) TFAM : mitochondrial transcription factor A
- 7) PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
- 8) C/EBP α : CCAT-enhancer-binding protein α
- 9) aP2, FABP4 : fatty acid binding protein 4
- 10) HPRT : hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase

3-6. 단백질 발현 수준 확인 (Western blot)

지방분화와 관련된 단백질의 발현 수준을 확인하기 위해 Western blot을 실시하였다. 6well-plate에서 배양되어 분화된 세포를 HBSS로 Washing 해준 후, RIPA buffer(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) 및 Phosphatase inhibitor(10x) 와 Protease inhibitor(100x)를 150 μ l 씩 첨가하고 scrapper를 이용하여 1ml tube에 옮겨 담아 Ice에서 10분씩 3회에 걸쳐 균질화 하였다. 균질화 과정 후 12,000 RPM, 4°C에서 원심 분리하여 상층액의 단백질을 얻었다. 단백질 농도를 정량하기 위해 BCA Protein Assay Kit(Thermo fisher scientific, IL, USA)를 사용하였다. BSA standard와 추출된 단백질을 준비하여 96plate에 10ul씩 첨가했다. 그 후, BCA buffer (BCA reagent A와 B의 비율을 50:1로 하여 혼합한 용액)를 200ul씩 첨가하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 그 후, 562nm에서 흡광도를 측정하였다. 정량한 단백질은 -70°C에서 보관하였다. 정량된 단백질 sample은 100°C에서 5분간 heating block에서 가열하였다. 그 후, 10% SDS-PAGE를 사용하여 전기영동을 실시하여 단백질을 분자량에 따라 분리하였다. 단백질을 분리시킨 후, PVDF Transfer Membrane(sigma)으로 Transfer 시켰다. Membrane은 5% blocking buffer(non-fat dry milk와 1X TBS-T을 1:20 비율로 혼합한 용액)로 실온에서 1시간 blocking 하였다. 그 후, TBST로 5분씩 3회에 걸쳐 Washing 해주고, 1차 anti를 1,000:1 비율로 4°C에서 over night(12-24h) 해주었다. over night 후 TBST로 5분씩 3회에 걸쳐 Washing 해주고, 2차 anti를 1,000:1 비율로 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 그 후 TBST로 5분씩 3회에 걸쳐 Washing 해주고, ChemiDoc(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 ECL(Western Lightning) 용액으로 부터의 화학 발광을 검출하였다. phospho-AMPK, AMPK, PPAR, UCP1, TFAM 및 β -actin 항체는 Cell Signaling Technology에서 구입하였고, aP2 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

3-7. Fatty Oxidation Rate Using [3H]-OA

Fatty Oxidation Rate는 A Moon et al., Olpin et al., Kang et al.에 의해 이전에 발표된 방법을 통하여 측정하였다 [134-136]. 성숙한 3T3-L1 지방 세포

와 인간의 간암세포주인 HepG2를 이용하여 방사능을 측정하였다. 실험 전날에 DMEM으로 세포를 밤새 배양했다. 그 후 [3H]-OA (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA; final concentration of 0.5 Ci/mL)를 BSA (sodium oleate - bovine serum albumin) 복합체 400 μ M와 혼합 한 후 세포에 첨가하고 2시간동안 Incubate에서 배양하였다. 2시간 후에 [3H] 방사능 함유 배지를 수확하고, 100% TCA (trichloroacetic acid) solution을 사용하여 침전시켰다. 침전 후, 알칼리성 상층액을 얻기 위해 6N NaOH를 최종 농도가 0.8-1.0N이 되도록 첨가하였다. 그 후에, 상층액을 Dowex ion-exchange resin (Acros Organics, AC202971000, Geel, Belgium)로 채워진 컬럼을 통과시켜 [3H]-H₂O를 포획 하였다. 방사능은 MicroBeta Microplate counters (PerkinElmer, Norwalk, CT, USA)에 의해 측정되었다.

3-8. Oxygen Consumption Rate (OCR) by Seahorse

미토콘드리아 호흡 활성을 측정하기 위해 XF24 extracellular flux analyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 3T3-L1 지방 세포의 O₂ 농도를 측정 하였다. 3T3-L1 세포를 젤라틴 코팅이 된 seahorse microplate (24-well)에 분화가 될 때까지 배양하였다. 그 후에 세포를 Well에 design에 맞게 Rg3(60ug/ml) 72시간동안, LPS를 48시간동안, cAMP를 12시간 동안 DMEM과 함께 배양해주었다. 미토콘드리아 Basal Respiration은 처치하지 않은 세포에서 평가되었다. 그 후, ATP 회전을 측정하기 위해 oligomycin (oligo, 2M)으로 세포를 처리했다.

Maximal Respiration은 전자 수송과 산화적 인산화의 화학적 결합체인 FCCP (carbonyl cyanide 4-trifluoromethoxy phenylhydrazone, 0.5 M)의 첨가하여 평가되었다.

미토콘드리아 호흡은 antimycin A (1M)와 rotenone (1M) (A + R)의 조합으로 차단되었다. OCR은 단백질 농도에 의해 표준화되고 pmol O₂/min/ μ g 단백질로 표시된 시간의 함수로서 세포 위의 미세 환경에서 매질의 O₂ 장력을 플로팅 함으로서 계산되었다.

3-9. Immunostaining

세포를 24well-plate에서 커버 슬라이드 상에 배양하였다. 24well-plate에서 (day 0) MDI와 10% FBS가 첨가된 DMEM에서 Rg3를 함께 처치 후 48시간 동안 분화 유도를 하였다. 48 시간이 지난 후(day 2), MM과 10% FBS가 첨가된 DMEM에서 Rg3와 함께 처치 후 48시간동안 배양하였으며, day 6 까지 24-48시간마다 배지를 교환하였다. 그 후(day 8) FBS-DMEM 및 Rg3와 함께 LPS 처치(100 ng/ml)를 해주었으며, 이를 뒤에 cAMP 처치(0.5mM)를 해주고 7시간 후에 HBSS로 Washing 한 후 4% Fixative Solution (nvtrogen, Carlsbad, CA, USA)을 2%로 희석하여 well당 300 μ l씩 첨가하였다. 그리고 parafilm으로 감고 -4°C에서 overnight 했다. 다음날, PBS로 Washing 한 후에 Blocking을 해주었고, Primary antibody(HDAC9)로 37°C에서 배양해준 후에 Secondary antibody(Goat anti-Mouse IgG)로 실온에서 1시간 배양하였다. 그 후, PBS로 Washing 해준 후에 DAPI solution을 첨가한 후에 cover glass에 mounting solution을 첨가한 상태에서 세포를 옮겨 주었다. 그 후에 암실에서 24시간 동안 건조 시켜 주었다.

이미지는 Laser Scanning Confocal Microscope (공초점레이저현미경)를 사용하여 촬영하였다.

3-10. 통계 분석

모든 시험결과는 평균표준오차(Standard Error : SE)로 나타내었고, 통계 분석 통계 계산은 Tukey 또는 Bonferroni의 다중 비교테스트로 t-test와 ANOVA (일원 또는 이원 분산 분석)를 이용하여 수행되었다. 각 실험군의 분석 항목별 통계의 유의성은 $p < 0.05$ (GraphPad Prism Version 7.0, La Jolla, CA, USA) 수준에서 검증하였다.

IV. 연구 결과

1. 홍삼(RG) 추출물의 3T3-L1 세포 분화 억제 효과

1-1. 3T3-L1 세포에 대한 세포 생존 능력

홍삼(RG) 추출물의 세포 생존 능력을 알아보기 위해 3T3-L1 지방전구세포를 사용하였다. 홍삼 추출물은 2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfohenyl)-2H-tetrazolium-5-carbox anilide salt (XTT) 분석 전에 24시간 동안 배양되었다. 그림 2에서 볼 수 있듯이, 홍삼추출물을 다른 양으로 투여 한 후에도 세포 생존률이 크게 감소하지 않았다.

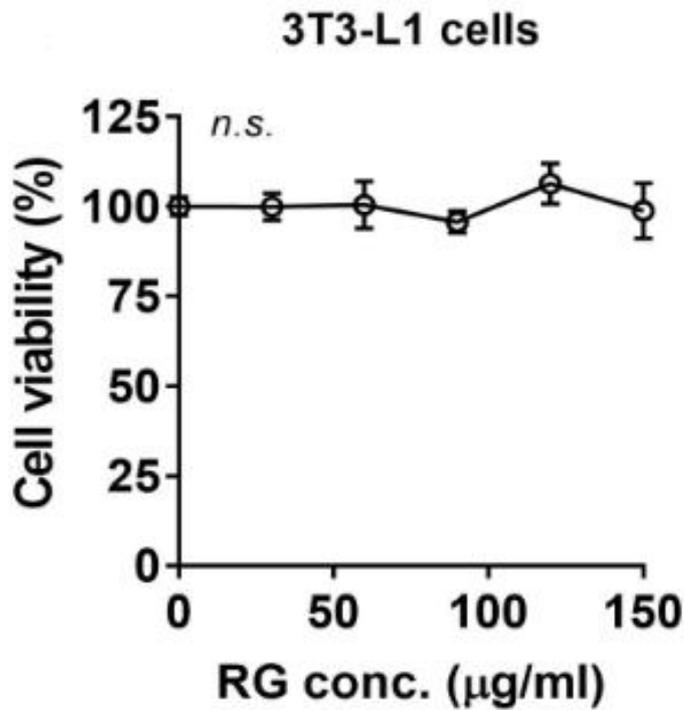


Figure 2. Effects of RG on cell viability in 3T3-L1 pre-adipocytes.
 The culture of 3T3-L1 were treated with 50-150 ug/ml of RG for 24h. XTT reagent was added 3h before measurement of OD 450 nm. Data are expressed as a percentage of the vehicle control (dimethyl sulfoxide (DMSO)). n.s. represents no significance. Data are represented as the mean SEM of three independent experiments. Values that do not share the same superscript are significantly different, as determined by one-way ANOVA ($p < 0.05$).

1-2. 홍삼(RG)의 3T3-L1 지방 세포에서 지방 생성 억제 효과

홍삼(RG) 추출물이 지방생성을 억제 할 수 있는지 알아보기 위해 3T3-L1 세포가 분화하는 동안 RG를 처치하였다. 이것은 8일 동안 진행되었다. RG를 처치(30,60,90,120 ug/ml)했을 때 현미경으로 관찰하였는데, 그림 3과 같이 지방구(lipid droplet)가 감소하는 것을 볼 수 있었으며, ORO(Oil red O) 염색으로 측정했을 때 TG(triglyceride)의 축적을 현저히 감소키는 것을 확인할 수 있었다. (그림 4)

다음으로 mRNA 발현 억제 효과는 qPCR(quantitative PCR)에 의해 결정되었다. RG를 처치했을 때, 특히 120 ug/ml 는 PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma), aP2, FABP4 (fatty acid binding protein 4), C/EBP α (CCAT-enhancer-binding protein α)에서 지방 생성 유전자 발현을 유의하게 억제하였다. (그림 5)

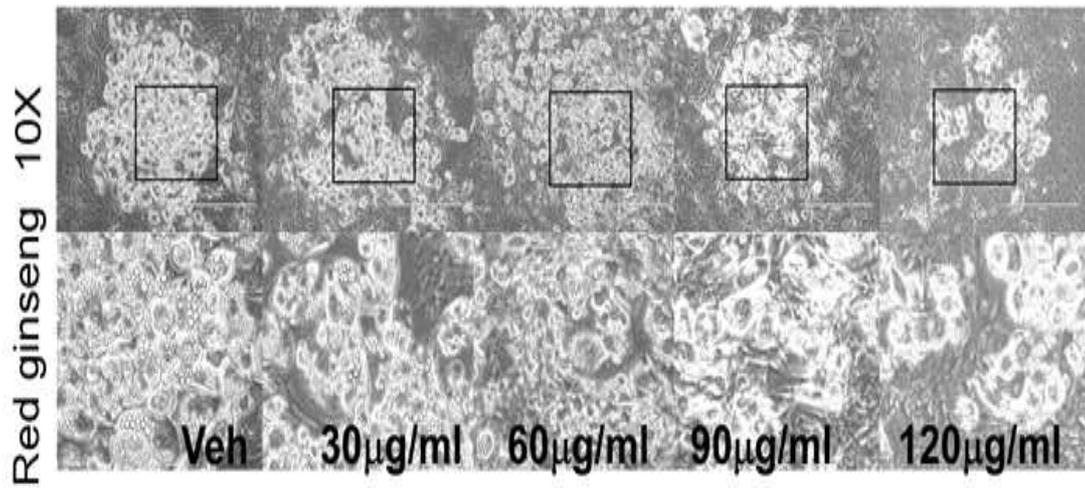


Figure 3. TG accumulation in 96-well culture plates was visualized. 3T3-L1 cells were seeded and induced to differentiation in the presence of DMSO (vehicle control), RG (30-120 ug/ml) for 8 days:

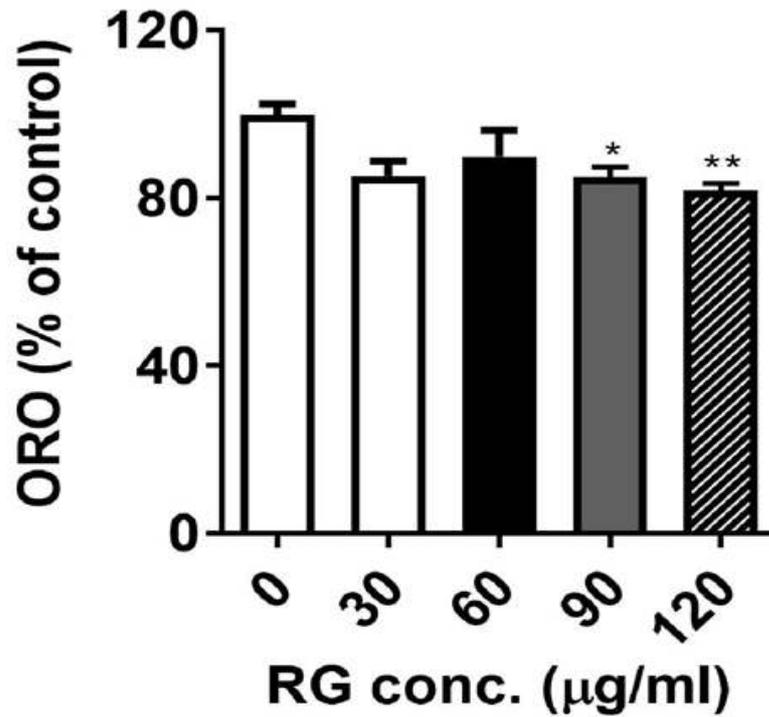


Figure 4. extracted ORO staining was quantified (OD 500 nm).

3T3-L1 cells were seeded and induced to differentiation in the presence of DMSO (vehicle control), RG (30–120 ug/ml) for 8 days: All values are presented as the mean S.E.M. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ compared with the vehicle control (DMSO treated cells) by one-way ANOVA with Bonferroni's comparison test.

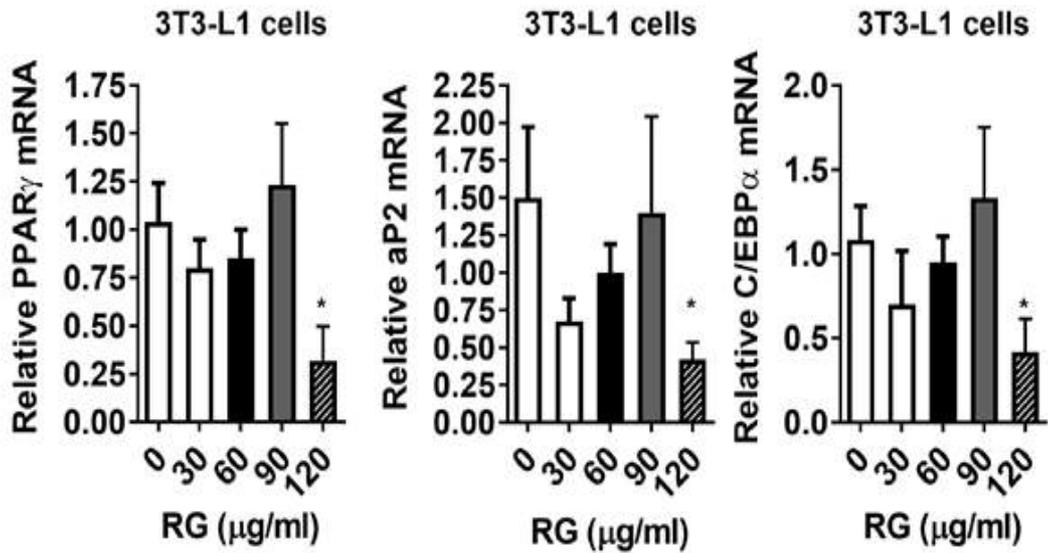


Figure 5. adipogenic gene expression of PPAR γ , aP2, C/EBP by qPCR.

3T3-L1 cells were seeded and induced to differentiation in the presence of DMSO (vehicle control), RG (30-120 ug/ml) for 8 days: All values are presented as the mean S.E.M. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ compared with the vehicle control (DMSO treated cells) by one-way ANOVA with Bonferroni's comparison test.

2. 이화학적 특성

2-1. TPC (Total polyphenol content) & TFC (Total flavonoid content) 측정

RG 추출물의 총 폴리페놀 함량은 2.36 mg Catechin/extract g이었고 총 플라보노이드 함량은 15.36mg Gallic acid/extract g이었다 (표 3).

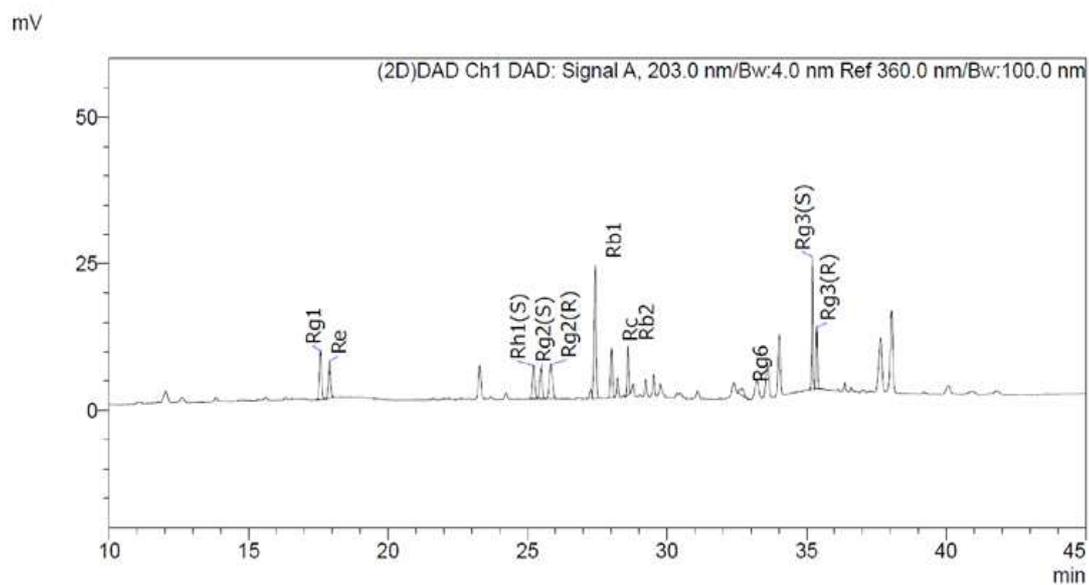
Table 3. Total polyphenol, flavonoid contents of Red ginseng extract.

Total polyphenols, Flavonoids Contents	Red ginseng extract
Total polyphenols (mg Gallic acid/extract g)	2.36 ± 0.01
Total flavonoids (mg Catechin/extract g)	15.36 ± 0.57

2-2. 진세노사이드 성분 분석

홍삼(RG) 추출물의 진세노사이드 총 함량을 분석하였다. 진세노사이드 중 Rb1이 0.38 mg/ml로 가장 많이 함유되어 있었으며, Rg3(S)가 0.17 mg/ml로 두 번째로 많았다. (표4)

Table 4. Ginsenosides Contents of Red ginseng Extracts



Ginsenosides	mg/ml
Rg1	0.11
Re	0.11
Rh1 (S)	0.08
Rg2 (S)	0.09
Rg2 (R)	0.14
Rb1	0.38
Rc	0.14
Rb2	0.11
Rg6	0.02
Rg3 (S)	0.17
Rg3 (R)	0.09
Rh2 (S)	N.D.

3. Rg3의 3T3-L1 세포 분화 억제 효과

3-1. 3T3-L1 세포에 대한 세포 생존 능력

Rg3의 세포 생존 능력을 조사하기 위해 3T3-L1 지방전구세포를 사용하였다. Rg3는 2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide salt (XTT) 분석 전에 24시간 동안 배양되었다. 그림 6에서 볼 수 있듯이, Rg3를 다른 양으로 투여 한 후에도 세포 생존률이 크게 감소하지 않았다.

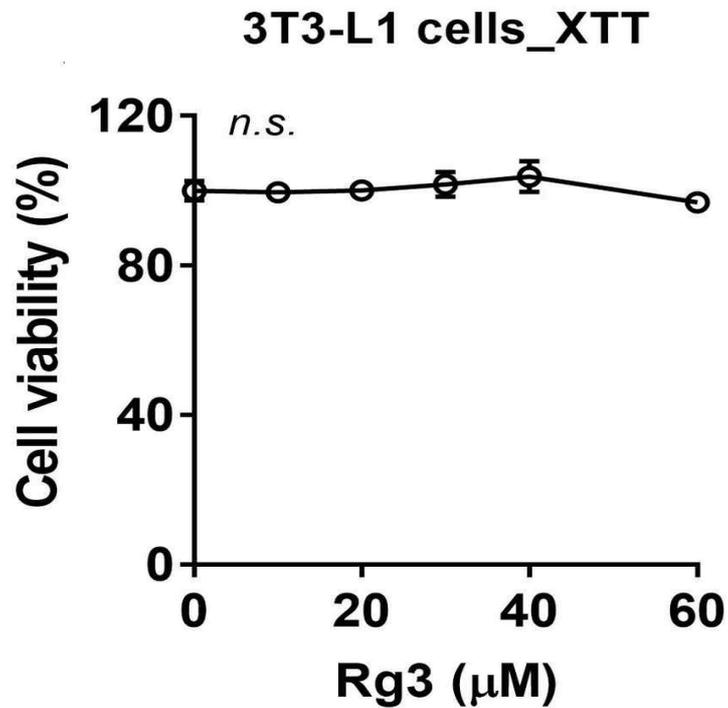


Figure 6. Effects of RG on cell viability in 3T3-L1 pre-adipocytes.

The culture of 3T3-L1 were treated with 20-60 μM of Rg3 for 24h. XTT reagent was added 3h before measurement of OD 450 nm. Data are expressed as a percentage of the vehicle control (dimethyl sulfoxide (DMSO)). n.s. represents no significance. Data are represented as the mean SEM of three independent experiments. Values that do not share the same superscript are significantly different, as determined by one-way ANOVA ($p < 0.05$).

3-2. Rg3의 3T3-L1 지방 세포에서 지방 생성 억제 효과

Rg3가 지방생성을 억제 할 수 있는지 알아보기 위해 3T3-L1 세포가 분화하는 동안 Rg3를 처리하였다. 이것은 8일 동안 진행되었다. (그림7) Rg3를 처리(10,20,40,60 μM)했을 때 ORO(Oil red O) 염색으로 TG(triglyceride)의 축적을 현저히 감소키는 것을 확인할 수 있었다. (그림 8A,8B)

다음으로 mRNA 발현 억제 효과는 qPCR(quantitative PCR)에 의해 결정되었으며, 단백질 발현은 Western blot에 의해 결정되었다. Rg3를 특히 60 μM 으로 처리했을 때 PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma), aP2,FABP4 (fatty acid binding protein 4), C/EBP α (CCAT-enhancer-binding protein α)에서 지방 생성 유전자 발현을 유의하게 억제하였다. (그림 9) 단백질 발현에서 또한 60 μM 에서 가장 많이 줄어드는 것으로 확인하였다. (그림 10) 이러한 결과를 바탕으로 나머지 실험에는 60 μM 의 농도로 Rg3를 처리하여 세포 손상을 일으키지 않도록 했다.

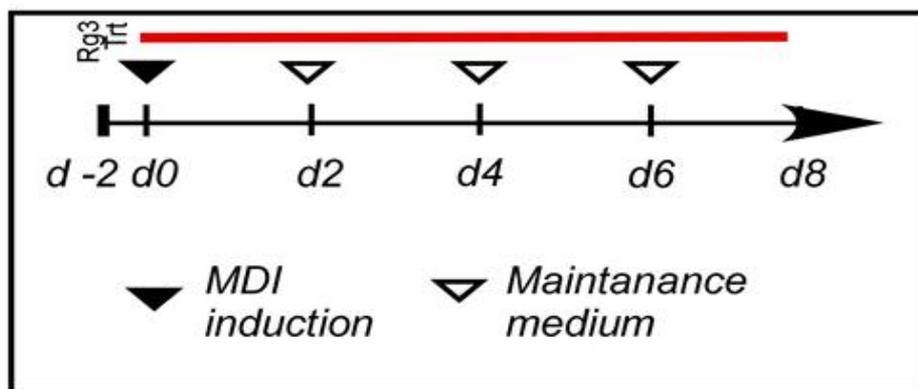


Figure 7. Rg3 inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes.

(Experimental scheme)

3T3-L1 cells were seeded and induced to differentiation in the presence of DMSO (vehicle control), Rg3 (10 - 60 μ M) for 8 days: 3T3-L1 were seeded on the second day before differentiation (d-2) and induced to differentiation (d0, MDI: methyl isobutylxanthine, dexamethasone, and insulin). And then induced differentiation into MM(insulin). Rg3(10-60 μ M) was added to 3T3-L1 cells during differentiation; this was maintained for d8 ;

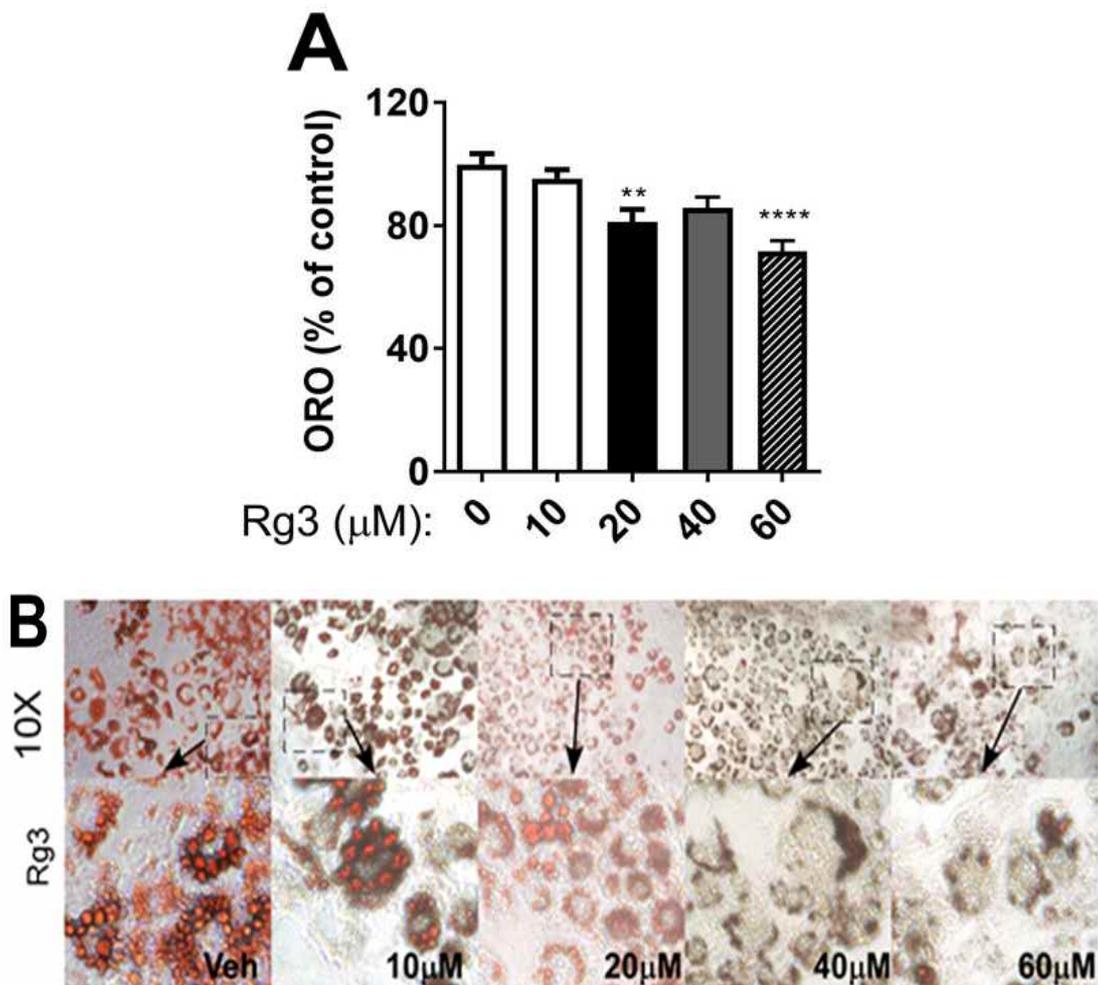


Figure 8. Effect of Rg3 inhibits adipogenesis extracted on ORO staining in 3T3-L1 adipocytes.

3T3-L1 cells were seeded and induced to differentiation in the presence of DMSO (vehicle control), Rg3 (10 - 60 μM) for 8 days: (A) extracted ORO staining was quantified (OD 500 nm); (B) representative images from five separate experiments (magnified 10X). All values are presented as the mean S.E.M. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ compared with the vehicle control (DMSO treated cells) by one-way ANOVA with Bonferroni's comparison test.

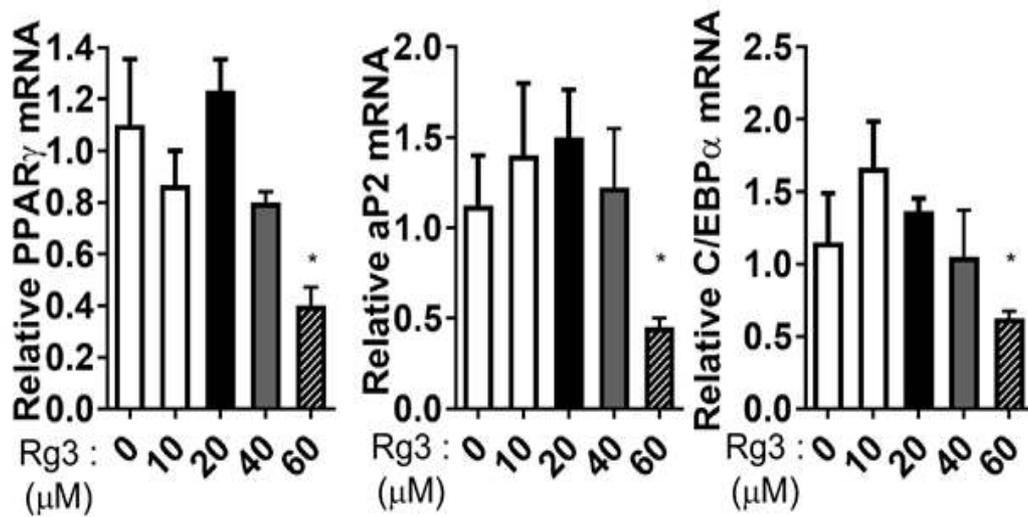


Figure 9. Effect of Rg3 inhibits adipogenic gene expression of PPAR, aP2, C/EBP by qPCR.

3T3-L1 cells were seeded and induced to differentiation in the presence of DMSO (vehicle control), Rg3 (10 - 60 μ M) for 8 days: All values are presented as the mean S.E.M. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ compared with the vehicle control (DMSO treated cells) by one-way ANOVA with Bonferroni's comparison test.

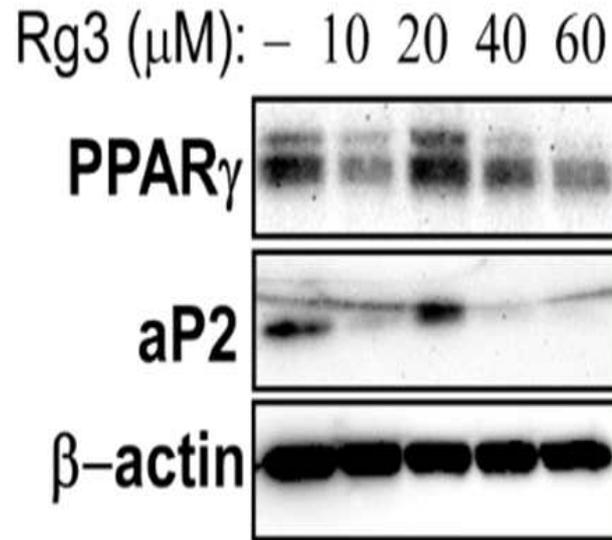


Figure 10. Effect of Rg3 inhibits adipogenic protein expressions of Fas, PPAR γ , aP2, β -actin by Western blot analysis.

3T3-L1 cells were seeded and induced to differentiation in the presence of DMSO (vehicle control), Rg3 (10 - 60 μM) for 8 days: All values are presented as the mean S.E.M. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ compared with the vehicle control (DMSO treated cells) by one-way ANOVA with Bonferroni's comparison test. .

특히, adipogenesis 동안에 Rg3를 특히 60 μ M으로 처리했을 때 PGC1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), Nrf2(Nuclear respiratory factor 2), SIRT1 (sirtuin 1)에서 mitochondrial biogenesis [137-140] 와 에너지 대사와 연관이 있는 [141, 142] gene이 유의하게 증가하는 것을 볼 수 있었다. (그림11)

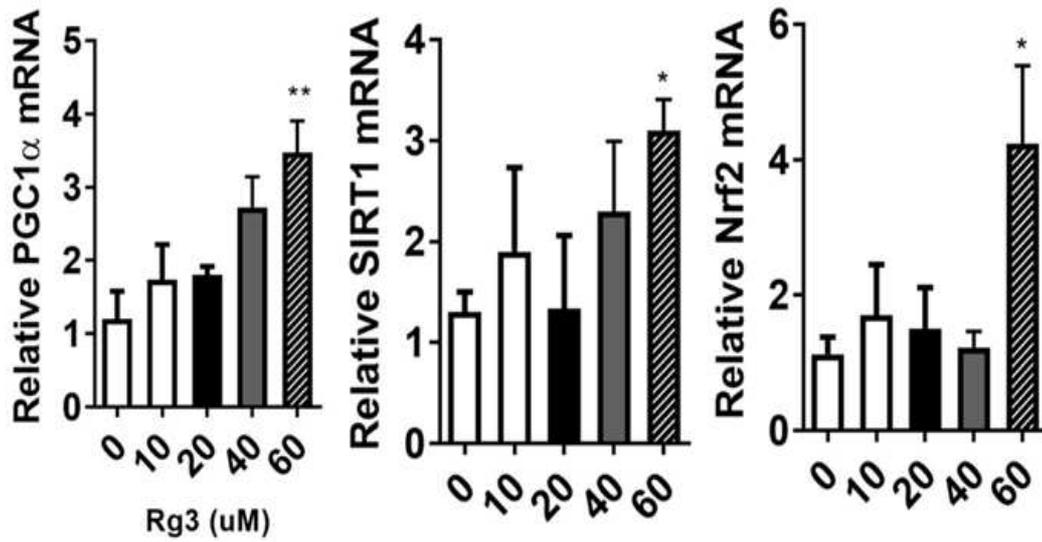


Figure 11. Effect of Rg3 inhibits adipogenic gene expression of PGC1 α , Nrf2, SIRT1 by qPCR

Rg3 associated with mitochondrial biogenesis and energy consumption.

All values are presented as the mean S.E.M. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ compared with the vehicle control (DMSO treated cells) by one-way ANOVA with Bonferroni's comparison test.

4. Rg3의 지방산 산화 및 미토콘드리아 산소 소비의 상향 조절로 인한 지방세포의 지방 생성 억제 효과

Rg3가 성숙한 지방세포에서의 지방을 억제 할 수 있는지 알아보기 위해 3T3-L1 세포가 완전히 분화된 후에 Rg3 (60 μ M)를 3일 동안 처치하였다. (그림12) Rg3를 처치(60 μ M)했을 때 ORO(Oil red O) 염색으로 TG(triglyceride)의 축적을 현저히 감소키는 것을 확인할 수 있었다. (그림 13A,13B)

다음으로 방사능 함유 배지를 사용하여 실제 지방산 산화율을 측정하여 Rg3가 처리된 세포에서 지방산 산화의 증가를 조사했다. 지방산 산화의 증가는 3T3-L1 세포와 인간 간암세포인 HepG2를 통해 확인 하였다. 3T3-L1 세포에서는 Rg3 (60 μ M)에서 [3 H]-OA의 [3 H]-H₂O로의 전환을 유의하게 증가 시켰다 (그림 14A). 또한, HepG2 에서는 OA+Rg3 처치에서 [3 H]-OA의 [3 H]-H₂O 로의 전환을 유의하게 증가시켰다 (그림 14B).

Rg3의 미토콘드리아 대사와의 연관성을 확인하기 위해 미토콘드리아의 핵심 매개 변수를 보여주는 표준 방법인 Seahorse에 의해 결정되었다. Rg3는 control에 비해 최대 호흡(Maximal respiration)을 유의하게 증가시켰다. (그림 15A,15B)

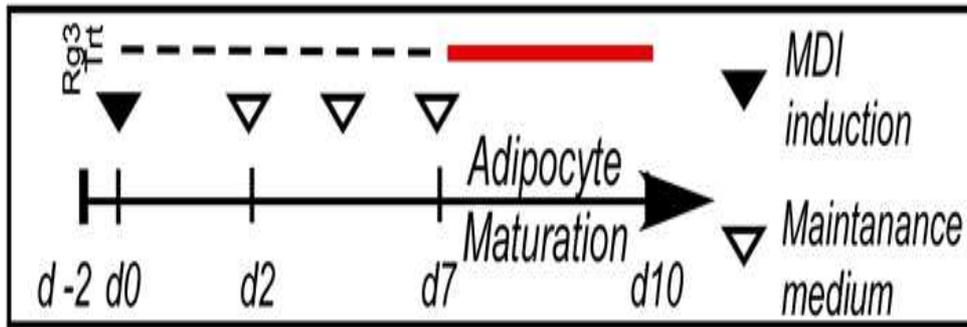


Figure 12. Rg3 inhibits lipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. (Experimental scheme)

3T3-L1 were seeded on the second day before differentiation (d-2) and induced to differentiation (d0, MDI: methyl isobutylxanthine, dexamethasone, and insulin). Keep 3T3-L1 cells differentiated into fully differentiated adipocytes until d7. Fully differentiated adipocytes (d7) were incubated with Rg3 (60 μM) for three days.

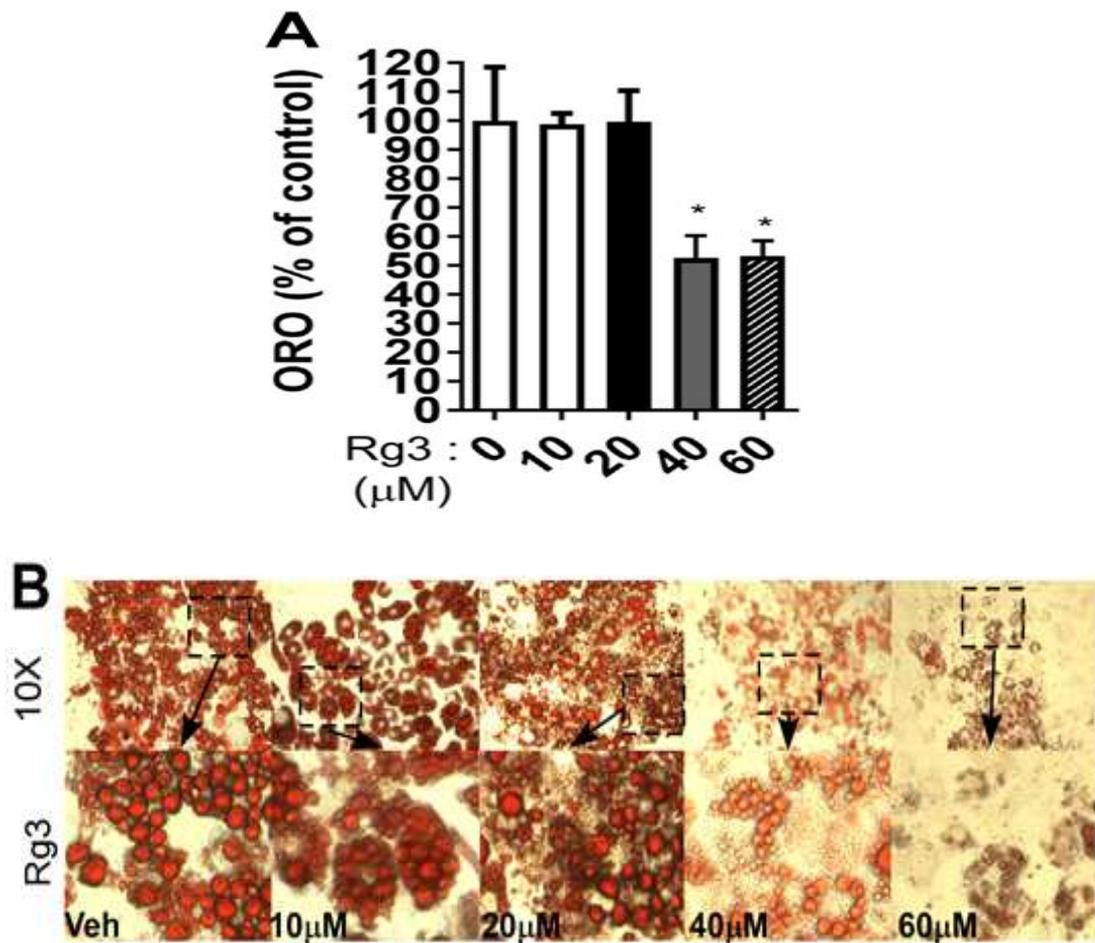


Figure 13. Effect of Rg3 inhibits lipogenesis extracted on ORO staining in 3T3-L1 adipocytes.

3T3-L1 were seeded on the second day before differentiation (d-2) and induced to differentiation (d0, MDI: methyl isobutylxanthine, dexamethasone, and insulin). Keep 3T3-L1 cells differentiated into fully differentiated adipocytes until d7. Fully differentiated adipocytes (d7) were incubated with Rg3 (60 μM) for three days. ; (A) extracted ORO staining was quantified (OD 500 nm); (B) representative images from five separate experiments (magnified 10X). All values are presented as the mean S.E.M. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ compared with the vehicle control (DMSO treated cells) by one-way ANOVA with Bonferroni's comparison test.

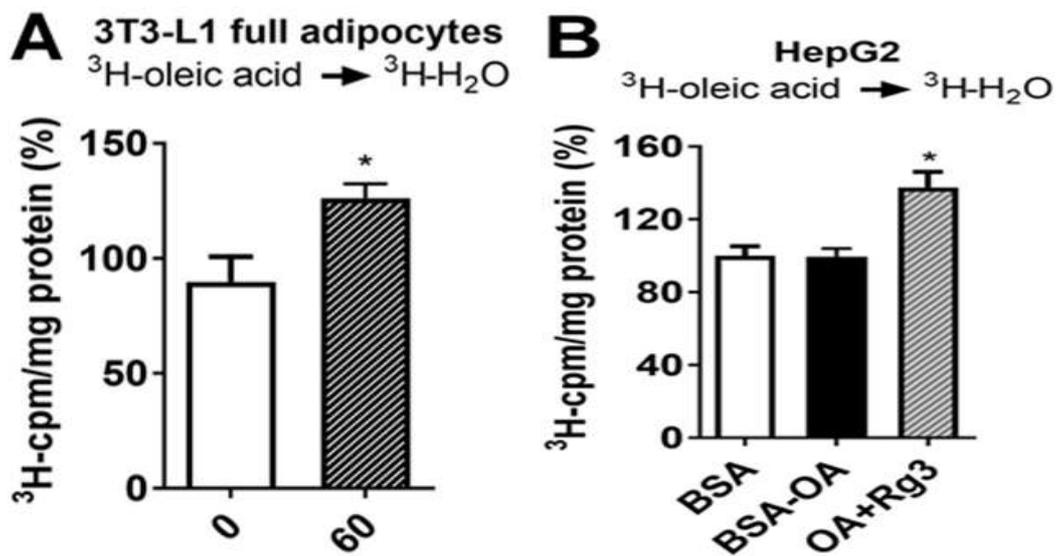


Figure 14. Rg3 attenuates lipid accumulation in cultures of adipocytes by upregulating fatty acid oxidation.

(A) Conversion of [3H]-OA into [3H]-H₂O in 3T3-L1. (B) Conversion of [3H]-OA into [3H]-H₂O in HepG2. All values are presented as the mean S.E.M. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ compared with the vehicle control (DMSO treated cells) by one-way ANOVA with Bonferroni's comparison test.

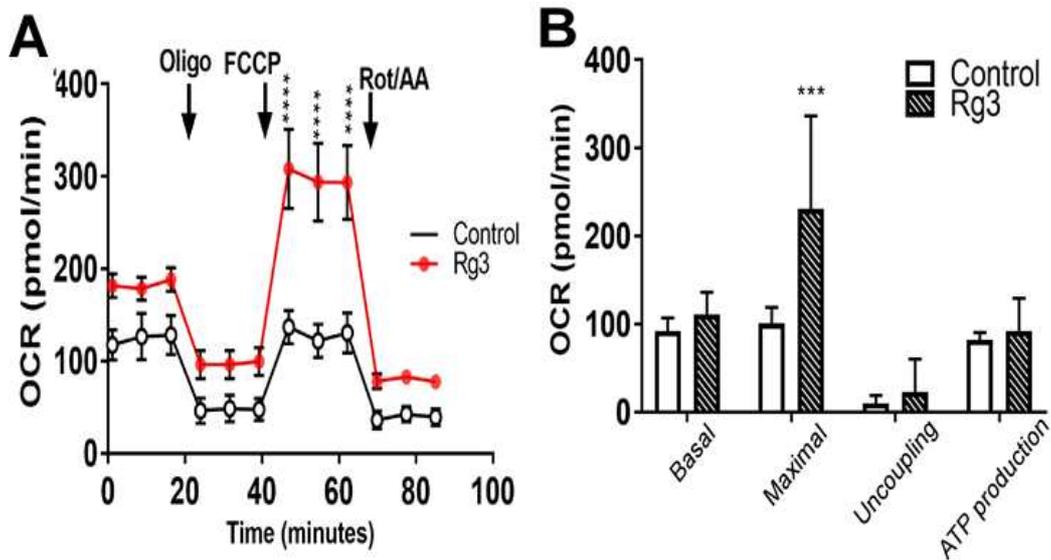


Figure 15. Rg3 attenuates lipid accumulation in cultures of adipocytes by upregulating mitochondrial oxygen consumption.

(A,B) Oxygen consumption rate (OCR) in 3T3-L1 adipocytes treated with Rg3 (red) as determined by Seahorse extracellular analyzer. All values are presented as the mean S.E.M. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ compared with the vehicle control (DMSO treated cells) by one-way ANOVA with Bonferroni's comparison test.

5. Rg3의 LPS로 유도된 갈색지방화와 mt DNA 억제 회복 효과

마지막으로, Rg3에서 갈색 지방 세포 형성의 증가에 관여 하는지를 조사 하였다. 분화 된 3T3-L1 지방 세포를 Rg3 (60 μ M)의 존재 또는 부재하에 베이 지색 지방 세포를 모방하기 위해 cAMP의 유사체인 Bt2-cAMP (dibutyryl cyclic AMP)로 처리 하였다. 또한 LPS를 처치하여 염증을 유도하였다. (그림 16) 3T3-L1 지방 세포의 Bt2-cAMP와의 배양은 UCP1 (uncoupling protein 1) 유전자의 유의적으로 증가하지 않았으며, 하지만 Nrf2는 증가하는 것을 확 인 할 수 있었다 (그림17).

흥미로운 사실은, LPS를 처치하여 염증을 유도했을 때, Bt2-cAMP만 처치 된 지방세포와 비교하여 UCP1 (uncoupling protein 1) UCP1 수준이 감소된 것을 확인할 수 있었다. 또한, Rg3를 처치했을 때, Bt2-cAMP 처치된 지방세 포와 비교하여 훨씬 더 높은 수준에서 UCP1 수준을 유의하게 증가시켰다. Rg3는 또한 PGC1 α 유전자 발현을 유의하게 향상시켰다 (그림18). 이러한 결 과는 LPS를 처치하여 염증을 유도했을 때, Rg3의 처치가 Bt2-cAMP와 연결 하여 UCP1, PGC1 α 발현 수준을 Bt2-cAMP 단독 처치에 의해 유발된 발현 수준 이상으로 증가 시킨다는 것을 보여 주었다.

위의 결과에 따른 미토콘드리아 대사와의 연관성을 조사하였다. cAMP를 모 두 처치해주었고, LPS를 처치한 Rg3에서 최대 호흡(Maximal respiration)을 훨씬 더 높은 수준으로 유의하게 증가시켰다 (그림 19).

단백질 발현에서는 Bt2-cAMP를 모두 처치해주고 LPS처치는 두 번째 줄부 터 해주었다. 그리고 Rg3의 처치 여부에 따라서 AMPK의 활성이 증가되는 것을 볼 수 있었다. 또한, UCP1, TFAM에서도 확인할 수 있었다. (그림 20) 또한, Immunostaining을 통해 Rg3와 mitochondria DNA 증가와의 연관성을 조 사하였다. Rg3를 처치했을 때, Bt2-cAMP만 처치된 지방세포와 Bt2-cAMP와 LPS가 처치된 지방세포와 비교하여 mt DNA (Mitochondrial DNA)의 활성이 증가되는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 21).

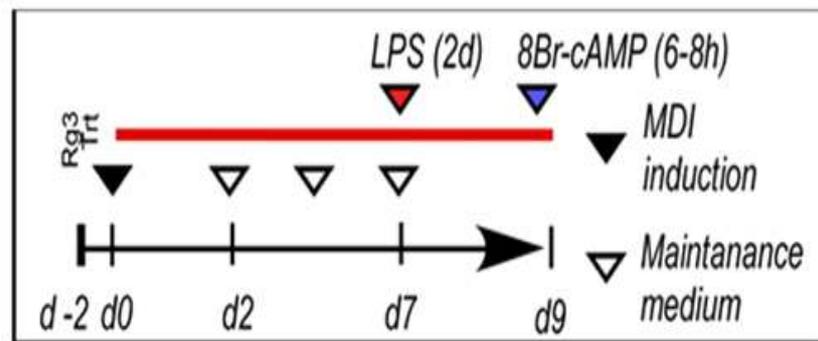


Figure 16. Rg3 recovers LPS-induced inhibition of browning. (Experimental scheme)

Experimental scheme. Pre-treatment of the 3T3-L1 cell with Rg3 for 9d during adipogenesis, Thereafter, treatment with LPS for 2d, followed by Bt2-cAMP stimulation for 6h : 3T3-L1 were seeded on the second day before differentiation (d-2) and induced to differentiation (d0, MDI: methyl isobutylxanthine, dexamethasone, and insulin). And then induced differentiation into MM(insulin). Rg3(10-60 μ M) was added to 3T3-L1 cells during differentiation; this was maintained for d9 ; and LPS was treated for 2 days to induce inflammation ; followed by Bt2-cAMP stimulation for 6h.

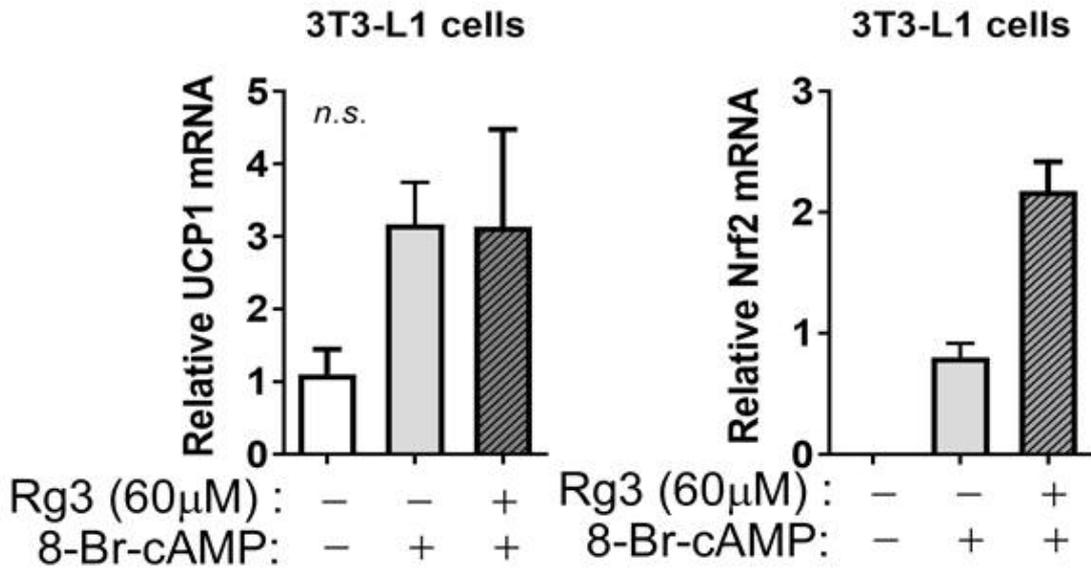


Figure 17. Effect of Rg3 of browning gene expression of UCP1, Nrf2, by qPCR.

Relative expressions of UCP1 and Nrf2 by qPCR. Pre-treatment of the 3T3-L1 cell with PSE for 7d during adipogenesis, followed by Bt2-cAMP stimulation for 6 h. All values are presented as the mean S.E.M. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ compared with the vehicle control (DMSO treated cells) by one-way ANOVA with Bonferroni's comparison test.

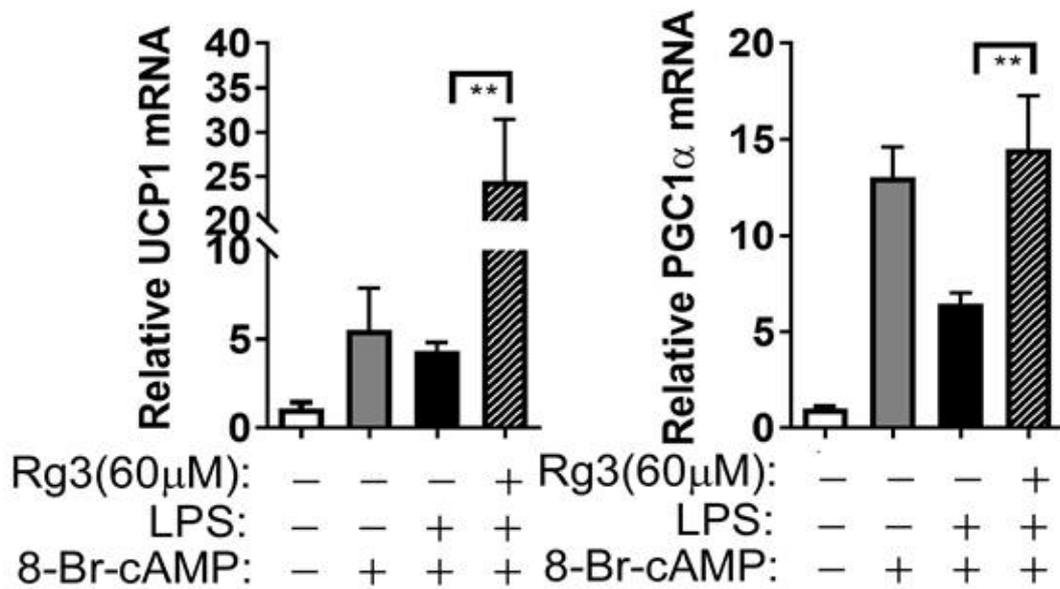


Figure 18. Effect of Rg3 recovers LPS-induced inhibition of browning gene expression of UCP1, PGC1 α by qPCR.

Relative expressions of UCP1 and PGC1 α by qPCR. Pre-treatment of the 3T3-L1 cell with Rg3 for 9d during adipogenesis, Thereafter, treatment with LPS for 2d, followed by Bt2-cAMP stimulation for 6h. All values are presented as the mean S.E.M. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ compared with the vehicle control (DMSO treated cells) by one-way ANOVA with Bonferroni's comparison test.

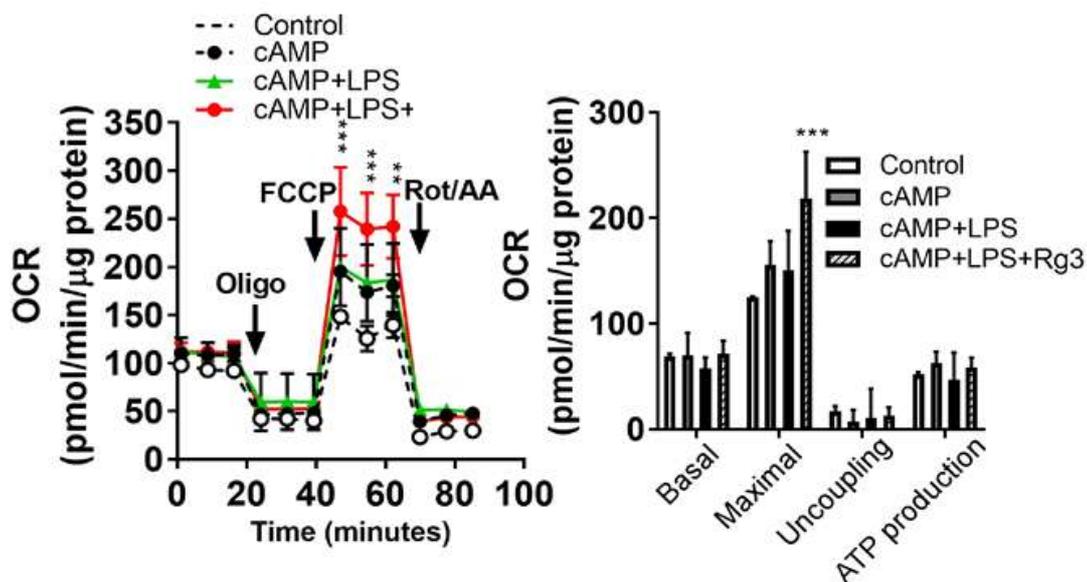


Figure 19. Rg3 recovers LPS-induced inhibition of browning by upregulating mitochondrial oxygen consumption.

Oxygen consumption rate (OCR) in 3T3-L1 adipocytes treated with cAMP (black), cAMP+LPS (green), cAMP+LPS+Rg3 (red) as determined by Seahorse extracellular analyzer. All values are presented as the mean S.E.M. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ compared with the vehicle control (DMSO treated cells) by one-way ANOVA with Bonferroni's comparison test.

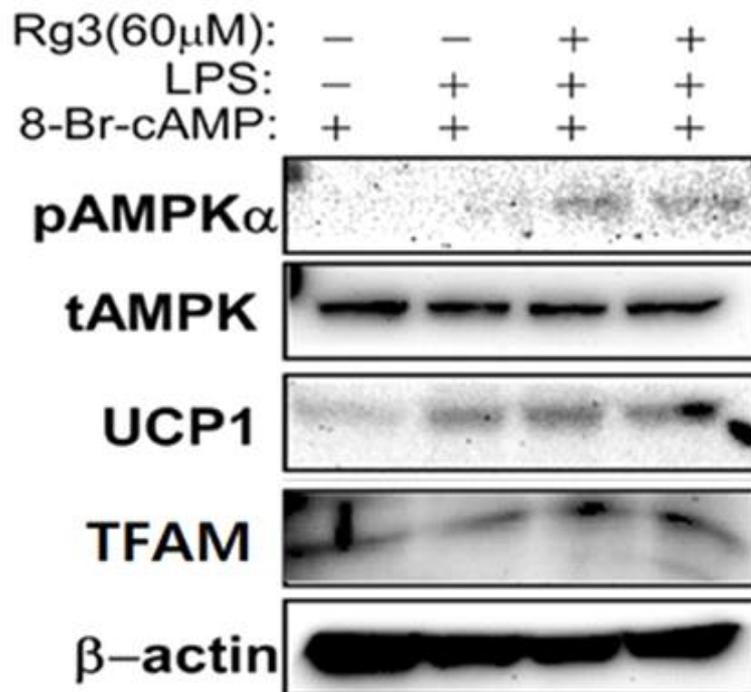


Figure 20. Effect of Rg3 inhibits adipogenic protein expressions of pAMPK α , tAMPK, UCP1, TFAM, β -actin by Western blot analysis.

Relative protein expressions of phosphor-specific, or total antibodies targeting AMPK, UCP1, TFAM, β -actin by Western blot analysis.

Pre-treatment of the 3T3-L1 cell with Rg3 for 9d during adipogenesis, Thereafter, treatment with LPS for 2d, followed by Bt2-cAMP stimulation for 6h. All values are presented as the mean S.E.M. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ compared with the vehicle control (DMSO treated cells) by one-way ANOVA with Bonferroni's comparison test.

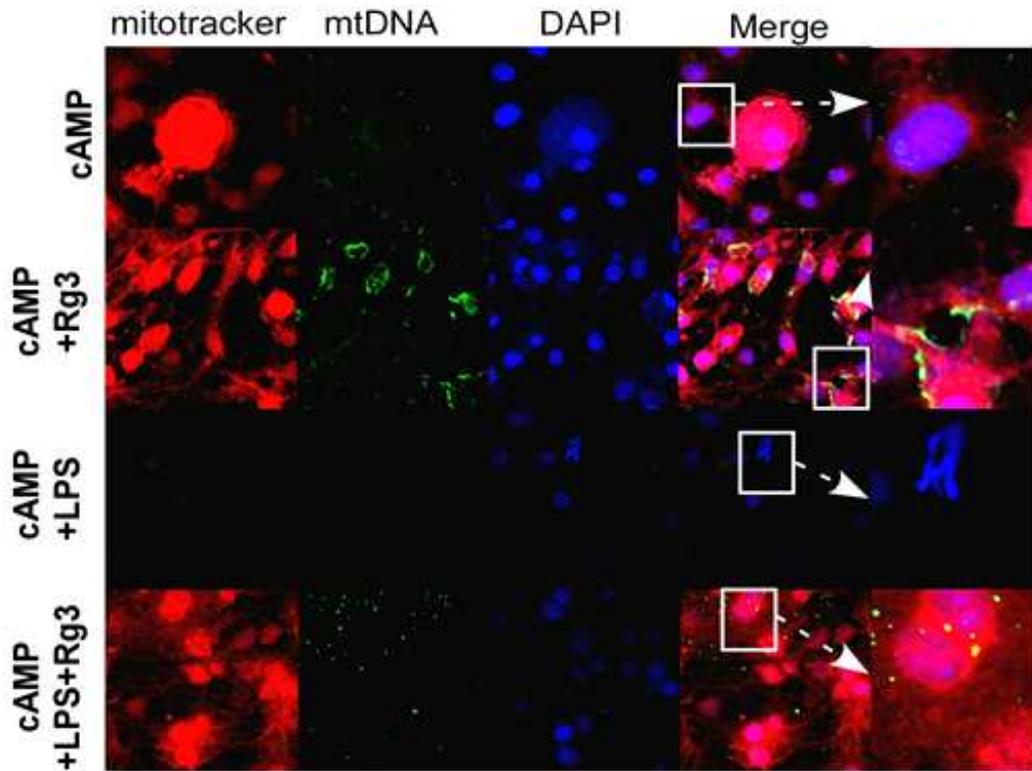


Figure 21. Rg3 recovers LPS-induced inhibition of Immunostaining by seahorse.

Immunostaining of cAMP, cAMP+Rg3, cAMP+LPS, cAMP+LPS+Rg3 by seahorse.

V. 고찰

인삼은 아시아에서 비만 관련 질병을 치료하기 위해 전통적으로 사용되어 왔다 [110]. 인삼을 증기로 찌서 건조시킨 홍삼[19]에는 진세노사이드가 주요 기능성 화합물임이 알려져 있다 [111]. 진세노사이드가 많은 연구를 통해서 암, 심혈관계질환 및 제 2형 당뇨병등 다양한 생리적 약리효능이 밝혀지고 있다 [122-127]. 그 중 Rg3는 홍삼 특유의 성분으로 효능이 상당히 높다 [40,129]. Rg3는 건강을 증진시킬 수 있는 영양 특성을 가지고 있다.

여러 보고에서 진세노사이드 Rg3가 암세포의 생성 및 전이 억제, 미토콘드리아 활성 증가, 지방세포의 분화 억제 등의 효과를 보여주었다 [33-40]. 항 비만 효과에 대한 연구는 아직 부족한 상태이기 때문에 본 연구에서는 이를 규명하고자 하였다.

따라서 먼저, 지방세포에서 홍삼의 지질 조절 특성을 조사하는 것이 적절하다고 결정하였다. 그리하여 3T3-L1 지방 전구세포에서 세포의 독성을 평가하였다. 데이터에서, 최대 150 μ g/ml 농도의 홍삼 추출물은 3T3-L1 세포에서 세포 독성이 없음을 확인하였다 (그림2). 또한, ORO 데이터, adipogenic 유전자 및 단백질 데이터를 확인한 결과 지방 생성을 억제 시킴을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 홍삼의 총 폴리페놀함량과 총 플라보노이드함량을 측정하였으며 (표3), 진세노사이드 성분을 분석하였다 (표4). 분석 결과 Rb1이 가장 많았으며, Rg3가 두 번째로 많았다. 하지만 진세노사이드 Rb1이 체내 흡수율이 낮다는 문헌 검토 [26-32]를 토대로 Rg3의 지질 조절 특성을 조사하는 것이 적절하다고 결정하였다.

홍삼과 마찬가지로 세포독성을 평가하였다. 결과로 최대 60 μ M 농도의 Rg3는 3T3-L1 세포에서 세포독성이 없음을 확인하였다 (그림6). 다른 선행연구에서 또한 Rg3의 처치가 몇몇 세포에서 세포 생존력에 영향을 미치지 않는 것으로 보인다고 제안했다. [27,33,143] 그리고 미성숙한 지방 세포에서 Rg3의 항 지방 형성 특성을 조사했다. ORO 염색을 통해 지방구가 줄어들었음을 확인하였으며, 특히, 60 μ M에서 유의적으로 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. (그림 8)

3T3-L1 세포가 adipogenesis 동안 Rg3가 지방 생성을 억제하는 것을 유전자 발현과 단백질 발현을 통해 유의적으로 감소함을 확인 할 수 있었고, 특히 60 μ M의 농도에서 유의하게 감소함을 확인함으로써, Rg3 농도에 대한 문헌 검토를 통해 나머지 실험에서는 60 μ M의 농도로 Rg3를 처리하여 세포 손상을 일으키지 않도록 하였다.

본 연구와 일관되게, 다른 연구에서 또한 Rg3가 3T3-L1 세포의 지방생성을 유의하게 감소시킨다고 보고하였다 [144]. Rg3가 지방 생성을 억제할 수 있는 메커니즘 중 하나는 PPAR γ 전사 활성의 억제이다. [42] PPAR γ 는 지방전구 세포에서 지방세포로 분화되는 과정에서 활성화 되며 PPAR γ 의 발현을 억제함으로써 지방합성을 억제시켜 항비만 효과를 유도할 수 있다고 알려져 있다. [63-66] 선행연구와 일치하여 본 연구는 PPAR γ , aP2, C/EBP의 발현을 억제함으로써 지방생성을 억제할 수 있음을 확인하였다 (그림9) 본 연구에서 항지방 생성 조절에 대해 확인 했음에도 불구하고 이것이 동물과 인간에서도 긍정적인 효과를 가질 수 있는지는 더 확인을 해보아야 할 것이다.

또한 흥미로운 사실은 에너지 대사와 mitochondrial biogenesis와 연관이 있는 PGC1 α , Nrf2, SIRT1이 유의하게 증가하는 것을 볼 수 있었다 (그림11). 에너지 대사와 미토콘드리아 활성을 확인하기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것이라고 생각된다.

이러한 결과를 바탕으로 Rg3가 lipogenesis 동안에도 지방생성을 억제 할 수 있는지 궁금했고, 60 μ M의 Rg3의 농도는 지방 생성을 효과적으로 억제하였다 (그림13). Rg3는 지방세포에 직접 작용하여 지방 발현의 감소 및 기질 산화의 촉진과 일치하는 유전자 발현 및 관련 생화학적 매개 변수의 변화를 유발한다. 이것은 방사능 함유 배지를 이용한 지방산 산화율 측정 (그림14), 그리고 Maximal OCR을 통해 확인할 수 있었다 (그림15).

Nrf2 전사인자는 산화 스트레스에 대한 방어에 관여하는 중요한 조절 인자이다. 이전의 연구들에서 Nrf2가 체외에서 지방생성에 역할을 하고, 동물에서도 비만을 방지한다고 제안했다 [145]. 본 연구에서 또한 adipogenesis 동안에 Rg3를 처리한 곳에서 유의하게 증가하는 것을 보았다 (그림11). 또한, 이전의 연구에서 Nrf2 전사인자는 백색지방조직은 mitochondriogenesis 뿐만 아니라 호

흡과 관련된 갈색 지방 조직 유전자 UCP1 발현을 증가 시켜준다고 제안했다 [146,147].

이러한 선행 연구를 바탕으로 FA 산화의 상향 조절과 Rg3의 백색 지방 세포 미토콘드리아 호흡 기능의 변화가 베이지 지방 세포 형성의 증가에 관여하는지를 조사하였다. 그리하여 본 연구에서 백색 지방세포의 베이지 지방세포 형성의 Rg3가 영향을 미치는 것을 발견할 수 있었다.

Rg3가 Bt2-cAMP와의 단독 처치에서 갈색지방화와 연관이 있는 유전자 발현에서 유의하게 증가하지 않았다 (그림17).

그러나 흥미로운 사실은 LPS를 처치하여 염증을 유도했을 때, Rg3의 처치가 Bt2-cAMP와 연결하여 UCP1, PGC1 α 발현 수준을 Bt2-cAMP 단독 처치에 의해 유발된 발현 수준 이상으로 증가 시킨다는 것을 보여 주었다 (그림18). 이것은 또한 최대 호흡을 유의하게 증가 시켜 산소 소비율에도 관여한다는 것을 알 수 있다 (그림19).

마지막으로 Rg3의 처치 여부에 따라서 AMPK, UCP1, TFAM의 활성이 증가되는 것을 볼 수 있었다 (그림20). TFAM은 미토콘드리아 전사인자라고 알려져 있으며, mt DNA에 대한 몇 가지 기능을 수행하고 TFAM과 mt DNA 사이의 상호작용은 미토콘드리아 생합성의 조절에 참여한다고 알려져 있다 [97-99]. 이러한 선행 연구를 바탕으로 Rg3와 mitochondria DNA 증가와의 연관성을 Immunostaining을 통해 조사하였다. Rg3를 처치했을 때, mt DNA (Mitochondrial DNA)의 활성이 증가되는 것을 확인 할 수 있었다. 특히, Bt2-cAMP의 단독 투여보다 Rg3를 처치했을 때 증가하는 것을 확인 할 수 있으며, LPS로 염증을 유도했을 때는 감소하고, 다시 Rg3를 처치하니 확연히 증가하는 것을 확인 할 수 있었다 (그림21).

이러한 결과는 Rg3가 LPS로 유도된 갈색지방화와 Mitochondrial DNA 억제를 회복시켜주는데 효과적이었다는 것을 확인 할 수 있었다.

Rg3가 Bt2-cAMP와의 단독 투여에서 Nrf2가 유의하게 증가한 것 (그림17)에 대해서는 더 연구가 필요할 것이며, Rg3의 존재 또는 부재하에서 대사 활동을 측정함으로써 비만 치료의 가능성을 조사하기 위해 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각되어 진다.

결과적으로, Rg3가 TG 축적을 감소시키고 지방산 산화를 증가시키는데 효과적이며, 미토콘드리아 활성을 증가시켜주며, 궁극적으로 에너지 대사를 조절할 수 있음을 보여주었다. 또한, 직접적으로 갈색지방화를 증가시켜 주진 못했지만, LPS를 유도하여 갈색지방화를 감소를 역전시키는 것을 확인함으로써, Rg3가 풍부한 식품을 섭취하면 미토콘드리아 기능의 활성화를 통해 비만과 대사성 합병증을 완화하고 예방하는 데 도움이 될 수 있을 것이라고 생각된다.

VI. 요약 및 결론

1. 홍삼(RG) 추출물의 총 폴리페놀함량과 플라보노이드함량은 2.36mg/g과 15.36mg/g으로 나타났다.

2. 홍삼(RG) 추출물의 진세노사이드 총 함량은 Rb1 0.38 mg/ml로 가장 많이 함유되어 있으며, Rg3(S)가 0.17 mg/ml로 두번째로 많았다.

3. 홍삼(RG) 추출물의 3T3-L1 세포 분화 억제 효과

(1) 3T3-L1 세포에 대한 세포 생존 능력 : 홍삼 추출물은 3T3-L1 세포에 대한 독성을 나타내지 않았다.

(2) 홍삼(RG) 추출물의 3T3-L1 세포에서 지방생성 억제 효과 : 홍삼 추출물을 3T3-L1 세포가 분화하는 동안 처리하였을 때, Oil Red O, qPCR.을 통해 지방구(Lipid droplet)가 유의하게 감소함을 확인 할 수 있었다.

4. Rg3의 3T3-L1 세포 분화 억제 효과

(1) 3T3-L1 세포에 대한 세포 생존 능력 : Rg3는 3T3-L1 세포에 대한 독성을 나타내지 않았다.

(2) Rg3의 3T3-L1 세포에서 지방생성 억제 효과 : Rg3를 3T3-L1 세포가 분화하는 동안 처리하였을 때, Oil Red O, qPCR. Western blot을 통해 지방구(Lipid droplet)가 특히 60 μ M 농도에서 유의하게 감소함을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 나머지 실험에서는 60 μ M 농도로 Rg3를 처리하여 세포 손상을 일으키지 않도록 했다.

5. Rg3의 지방산 산화 및 미토콘드리아 산소 소비의 상향 조절로 인한 지방세포의 지방생성 억제효과

(1) Rg3의 3T3-L1 세포에서 지방생성 억제 효과 : Rg3를 성숙한 3T3-L1

세포에서 3일동안 처치하였을 때, Oil Red O를 통해 지방구(Lipid droplet)가 특히 60 μ M 농도에서 유의하게 감소함을 확인 할 수 있었다.

(2) Rg3가 처리된 세포에서 지방산 산화율 측정 : 방사능 함유배지를 사용하여 실제 지방산 산화율을 측정하였다. 3T3-L1 세포에서 Rg3 60 μ M로 처치했을 때 유의하게 증가하였다. 또한, HepG2에서 OA+Rg3 로 처치했을 때 유의하게 증가하였다.

(3) Rg3가 처리된 세포에서 Mitochondrial oxygen consumption 측정: Rg3와 미토콘드리아 대사와의 연관성을 확인하였다. Rg3는 control에 비해 최대 호흡 (Maximal respiration)을 유의하게 증가시켰다.

6. Rg3의 LPS로 유도된 갈색지방화와 mt DNA 억제 회복 효과

(1) Rg3의 3T3-L1 세포에서 갈색지방화 효과 : qPCR을 통해 Rg3의 처치가 cAMP와 연결하여 UCP1, PGC1 α 발현 수준을 Bt2-cAMP 단독 처치에 의해 유발된 발현 수준 이상으로 증가 시킨다는 것을 보여 주었다. Western blot을 통해서 Rg3의 처치 여부에 따라서 AMPK, UCP1, TFAM에서 유의하게 증가하는 것을 확인 할 수 있었다.

(2) Rg3의 미토콘드리아 대사와의 연관성 : cAMP를 모두 처치해주었고, LPS를 처치한 Rg3에서 최대 호흡(Maximal respiration)을 훨씬 더 높은 수준으로 유의하게 증가시켰다(seahorse). 또한 Immunostaining을 통해 처치된 지방세포와 Bt2-cAMP와 LPS가 처치된 지방세포와 비교하여 mt DNA (Mitochondrial DNA)의 활성이 증가되는 것을 확인 할 수 있었다.

결론적으로, Rg3는 adipogenesis를 억제시켜주었으며, lipogenesis 또한 억제시켜주었다. 이러한 사실은 지방산 산화와 미토콘드리아 활성 증가를 통해 확인하였고, UCP1 발현, 미토콘드리아 활성, TFAM 단백질 발현, mt DNA 증가를 통해 Rg3가 LPS로 유도된 갈색지방화 억제를 회복시켜준음을 확인하였다.

VII. 참고문헌

1. Cummings DE., and Schwartz MW. Genetics and pathophysiology of human obesity. *Annu. Rev. Med.*, 2003; 54: 453-471
2. Spiegelman, B.M., Flier, J.S.(1996). Adipogenesis and obesity; rounding out the big picture. *Cell*. 187:377-389.
3. Anderson SE, Cohen P, Naumova EN, Jacques PF, Must A. Adolescent obesity and risk for subsequent major depressive disorder and anxiety disorder: prospective evidence. *Psychosom Med* 2007; 69: 740 - 747
4. Bradford NF. Overweight and obesity in children and adolescents. *Primary Care* 2009; 36: 319 - 339.
5. Doll HA, Petersen SE, Stewart-Brown SL. Obesity and physical and emotional well-being: associations between body mass index, chronic illness, and the physical and mental comp
6. Padwal RS1, Majumdar SR. Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant. *Lancet*. 2007 Jan 6;369(9555):71-7.
7. Spiegelman, B.M., Flier, J.S. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104, 531-543, 2001
8. Taylor, C. B., & Stunkard, A. J. (1996). Public health approaches to weight control. *Obesity Theory and therapy*(2nd). Philadelphia : Lippincott-Raven Publishers.
9. Lemonnier D. Effect of age, sex, and sites on the cellularity of the adipose tissue in mice and rats rendered obese by a high-fat diet. *J Clin Invest*. 1972 Nov;51(11):2907-15.
10. PECKHAM SC, ENTENMAN C. The influence of a hypercaloric diet on gross body and adipose tissue composition in the rat. *Res Dev Tech Rep*. 1962 Feb 5:23.

11. Jules Hirsch and Paul W. Han. Cellularity of rat adipose tissue: effects of growth, starvation, and obesity. *Journal of Lipid Research*, 1969
12. CARL C. SELTZER, HOWARD W. STOUT, JR., BENJAMIN BELL, JEAN MAYER. RELIABILITY OF RELATIVE BODY WEIGHT AS A CRITERION OF OBESITY. *American Journal of Epidemiology*, Volume 92, Issue 6, December 1970, Pages 339 - 350.
13. A Kinugasa, T Kusunolci. Dietary treatment of childhood obese. *Progress in Obesity Research*. Oomura Y, ed. John Libbey & Comp. Ltd, 1991. p549
14. Fajas, L., Fruchart, J. C. and Auerx, J. 1998. Transcriptional control of adipogenesis. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10, 165-173
15. Sisk M, Azin MJ, Hausman DB, Jewell DE. Effect of conjugated linoleic acid on fat pad weights and cellularity in Sprague-Dawley and Zucker rats. *The FASEB Journal* 12:A536 · January 1998
16. Flier J.S. The adipocyte: Storage depot or node on the energy information superhighway. *Cell*. 1995 Jan 13;80(1):15-8.
17. Chen Z, Torrens J.I, Anand A, Spiegelman B.M, Friedman J.M. Krox20 stimulates adipogenesis via C/EBPbeta-dependent and -independent mechanisms. *Cell Metab* 1, 93-106, 2005.
18. Zhang J.W, Klemm D.J, Vinson C, Lane M.D. Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis. *J Biol Chem* 279, 4471-4478, 2004.
19. Cho WC, Chung WS, Lee SK, Leung AW, Cheng CH and Yue KK (2006). Ginsenoside Re of *Panax ginseng* possesses significant antioxidant and antihyperlipidemic efficacies in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur.J.Pharmacol.* 550:173-179.
20. Shiabta S. Studies on constituents of Japanese and Chinese. crude drugs XI. Panaxadol, a sapogenin of ginseng roots(1). *Chem Pharm Bull* 11: 59-76 (1973)

21. Horhammer L, Wagner H, Lay B. Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von radix *Panax ginseng* C.A. Meyer. Pharm Ztg. 106: 1307-1311 (1961)
22. Kitagawa I, Taniyama T, Yoshikawa M, Ikenishi Y, Nakagawa Y. Chemical studies on crude drug processing VI. Chemical structures of malonyl ginsenosides Rb1, Rb2, Rc and Rd isolated from the root of *Panax ginseng* C. A. Meyer. Chem Pharm Bull. 37: 2961-2970 (1989)
23. Zhang S, Takeda T, Zhu T, Chen Y, Yao X, Tanaka O, Okihara Y. A new minor saponin from the leaves of *Panax ginseng*. Planta Med. 56: 298-300 (1990)
24. Liu, X., Cui, Y. and Yang, L. Roles of glycosidase in drug discovery and development. Tian Ran Chan Wu Yan Jiu Yu Kai Fa. 17(2), 223-228 (2005).
25. Do-Yeon Kim, Chang-Su Park, and Yeong-Su Kim. Production of Minor Ginsenoside F2 from Ginseng Extracted Saponins by Viscozyme® L. J. Chitin Chitosan 21(2), 94-99 (2016)
26. Wakabayashi C, Hasegawa H, Murata J, Saiki I. 1998. In vivo antimetastatic action of ginseng protopanaxadiol saponins is based on their intestinal bacterial metabolites after oral administration. Oncol Res 9:411-417
27. Bae EA, Han MJ, Choo MK, Park SY, Kim DH. 2002. Metabolism of 20(S)- and 20(R)-ginsenoside Rg3 by human intestinal bacteria and its relation to in vitro biological activities. Biol Pharma Bull 25:58-63
28. Kanaoka M, Akao T, Kobashi K. 1994. Metabolism of ginseng saponins, ginsenosides, by human intestinal bacteria. J Tradit Med 11:241-245
29. Keum YS, Park KK, Lee JM, Chun KS, Park JH, Lee SK, Kwon H and Surh YJ. (2000). Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng. Cancer Letters. 150:41-48.

30. Kim SE, Lee YH, Park JH and Lee SK. (1999). Ginsenoside Rg3, a new diol-type ginseng saponin, selectively elevates protein levels of p53 and p21WAF1 leading to induction of apoptosis in SK-HEP-1 cells. *Anticancer Research*. 19:487-491.
31. Kim WY, Kim JM, Han SB, Lee SK, Kim ND, Park MK, Kim CK and Park JH. (2000). Steaming of ginseng at high temperature enhances biological activity. *Journal of Natural Products*. 63:1702-1704.
32. Bao HY, Zhang J, Yeo SJ, Myung CS, Kim HM, Kim JM, Park JH, Cho JS and Kang JS. (2005). Memory enhancing and neuroprotective effects of selected ginsenosides. *Archives of Pharmacol Research*. 28:335-342.
33. Shinkai, K., H. Akedo, M. Mukai, F. Imamura, A. Isoai, M. Kobayashi, and I. Kitagawa. 1996. Inhibition of in vitro tumor cell invasion by ginsenoside Rg3. *Jpn. J. Cancer. Res.* 87(4), 357-362.
34. Mochizuki, M., Y. C. Yoo, and K. Matsuzawa. 1995. Inhibitory effect of tumor metastasis in mice by saponins, ginsenoside Rb2, 20(R)- and 20(S)-ginsenoside Rg3, of red ginseng. *Biol. Pharm. Bull.* 18(9):1197-1202.
35. Li, X., Y. S. Guan, X. P. Zhou, L. Sun, Y. Liu, Q. He, L. Fu, and Y. Q. Mao. 2005. Anticarcinogenic effect of 20(R)-ginsenoside Rg3 on induced hepatocellular carcinoma in rats. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 36(2):217-220.
36. Lee, H. U., E. A. Bae, M. J. Han, and D. H. Kim. 2005. Hepatoprotective effect of 20(S)-ginsenosides Rg3 and its metabolite 20(S)-ginsenoside Rh2 on tert-butyl hydroperoxide-induced liver injury. *Biol. Pharm. Bull.* 28(10): 1992-1994.
37. Tian, J. W., F. H. Fu, M. Y. Geng, Y. T. Jiang, J. X. Yang, W. L. Jiang, C.Y.Wang, and K. Liu. 2005. Neuroprotective effect of 20(S)-ginsenoside Rg3 on cerebral ischemia in rats. *Neurosci. Lett.* 374(2):92-9

- 7.
38. Wang, T. F., and Z. M. Meng. 1999. Experiment for immunity effects of ginsenoside Rg3. *Zhong Guo Yao Ke Da Xue Xue Bao* 30(2):55-57.
39. Kim, N. D., E. M. Kim, K. W. Kang, M. K. Cho, S. Y. Choi, and S. G. Kim. 2003. Ginsenoside Rg3 inhibits phenylephrine-induced vascular contraction through induction of nitric oxide synthase. *Br. J. Pharmacol.* 140(4):661-670.
40. Zhang, J., S. R. Wang, C. J. Cheng, P. H. Long, and J. S. Kang. 2006. Effect of ginsenosides Rg3(R), Rg3(S) and Rg5/Rk1 on memory improvement of ethanol treated mice. *Ji Lin Nong Ye Da Xue Xue Bao.* 28(3):283-284, 295.
41. Hwang, J.-T., Kim, S.-H., Lee, M.-S., Kim, S. H., Yang, H.-J., Kim, M.-J., et al.(2007). Anti-obesity effects of ginsenoside Rh2 are associated with the activation of AMPK signaling pathway in 3T3-L1 adipocyte. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364, 1002-1008. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.10.125
42. Hwang JT, Lee MS, Kim HJ, Sung MJ, Kim HY, Kim MS, Kwon D Y. Antiobesity effect of ginsenoside Rg3 involves the AMPK and PPAR-gamma signal pathways. *Phytother Res* 2009;23:262-266.
43. Enerbäck S, Jacobsson A, Simpson EM, Guerra C, Yamashita H, Harper ME, Kozak LP. Mice lacking mitochondria uncoupling protein are cold sensitive but not obese. *Nature.* 1997 May 1;387(6628):90-4.
44. Klannemark M, Orho M, Groop L. 1998. No relationship between identified variants in the uncoupling protein 2 gene and energy expenditure. *European Journal of endocrinology*, 139: 217-223
45. Walder K, Norman RA, Hanson RL, Schrauwen P, Neverova M, Jenkinson CP, Easlick J, Warden CH, Pecqueur C, Raimbault S, Ricquier D, Silver MH, Shuldiner AR. 1998. Association between uncoupling p

- rotein polymorphism (UCP2-UCP3) and energy metabolism/obesity in Pima indians. *Hum Mol Genet Sep*, 7(9): 1431-1435.
46. Walston J, Silver K, Bogardus C, Knowler WC, Celi FS, Austin S. 1995. Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the β 3-adrenergic receptor gene. *New England Journal of Medicine*, 333: 343-347.
 47. Francesc Villarroya. Irisin, Turning Up the Heat. *Cell Metabolism*. Volume 15, Issue 3, 7 March 2012, Pages 277-278
 48. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. 2000. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 14: 1293-1307
 49. Yang, J.Y., et al., Regulation of adipogenesis by medium-chain fatty acids in the absence of hormonal cocktail. *J Nutr Biochem*, 2008.
 50. Mottillo S, Filion KB, Genest J, Joseph L, Pilote L, Poirier P, Rinfret S, Schiffrin EL, Eisenberg MJ (2010): The metabolic syndrome and cardiovascular risk a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 56(14):1113-1132
 51. Noh SK. (2002) Functional action of flavonoids for treatment of obesity. *Food industry and Nutrition*. 7(2): 27-29.
 52. Lee JE. (2005) Anti-obesity Effects of *Sophora japonica* L. Sungkyunkwan University.
 53. Jo J, Gavrilova O, Pack S, Jou W, Mullen S, Sumner AE, Cushman SW, Periwai V. Hypertrophy and/or hyperplasia: dynamics of adipose tissue growth. *PLoS Comput Biol* 5: e1000324, 2009.
 54. Furuyashiki T, Nagayasu H, Aoki Y, Bessho H, Hashimoto T, Kanazawa K, Ashida H. 2004. Tea catechin suppresses adipocyte differentiation accompanied by down-regulation of PPAR γ 2 and C/EBP α in 3T3-L1 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 2353-2359.
 55. Kim GS, Park HJ, Woo JH, Kim MK, Koh PO, Min W, Ko YG, Kim CH, Won CK, Cho JH. 2012. Citrus aurantium flavonoids inhibit adip

- ogenesis through the Akt signaling pathway in 3T3-L1 cells. *BMC Complement Altern Med* 12: 31-40.
56. Kershaw EE, Flier JS. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2548-2556
 57. Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7(12): 885-896.
 58. P J Smith, L S Wise, R Berkowitz, C Wan and C S Rubin. 1988. Insulin-like growth factor-1 is an essential regulator of the differentiation in 3T3-L1 adipocyte. *J. Biol. Chem.*, 263: 9402-9408
 59. Nam, M., et al., Compound C inhibits clonal expansion of preadipocytes by increasing p21 level irrespectively of AMPK inhibition. *Arch Biochem Biophys*, 2008. 479(1): p. 74-81.
 60. Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA. 1998. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 273: 30057-30060
 61. Kim, Y., Sung, J., Sung, M., Choi, Y., Jeong, H. S. and Lee, L. 2010. Involvement of heme oxygenase-1 in the anti-inflammatory activity of *Chrysanthemum boreale* Makino extract on the expression of inducible nitric oxide synthase in RAW264.7 macrophage. *J. Ethnopharmacol.* 131, 550-554.
 62. Ho, J. N., Choi, J. W., Lim, W. C., Lim, M. K., Lee, I. Y. and Cho, H. Y. 2013. Kefir inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation through down-regulation of adipogenic transcription factor expression. *J. Sci. Food Agric.* 93, 485-490.
 63. Lehrke M, Lazar MA. 2005. The many faces of PPARgamma. *Cell* 123: 993 - 999.
 64. James MN, Kim YC. 2000. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 130: 3122S-3126S
 65. White UA, Stephens JM. 2010. Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 318: 10-14

66. Hong SP, Leiper FC, Woods A et al. 2003. Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8839 - 8843.
67. Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. 2005. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. *Pharmacol Res* 51: 117-123
68. Cheryl A. Baxa, Ronald S. Sha, Melissa K. Buel, Anne J. Smith, Valerie Matarese, Laurie L. Chin, and Kyria L. Boundy, David A. Bernlohr. *Biochemistry* 1989,28,22.
69. Hotamisligil and Bernlohr, 2015. Metabolic functions of FABPs – Mechanisms and therapeutic implications. *Nature Reviews Endocrinology* 11(10) · August 2015
70. Moi P, Chan K, Aunis I, Cao A, Kan YW (Oct 1994). "Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91 (21): 9926 - 9930.
71. Cullinan SB, Gordan JD, Jin J, Harper JW, Diehl JA. The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol Cell Biol*. 2004 Oct;24(19): 8477-8486.
72. Nguyen T, Sherratt PJ, Nioi P, Yang CS, Pickett CB. Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *J Biol Chem*. 2005 Sep 16;280(37):32485-92. Epub 2005 Jul 6.
73. Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med*. 2004 May 15;36(10):1199-1207.
74. Suzuki M, Betsuyaku T, Ito Y, Nagai K, Nasuhara Y, Kaga K, Kon

- do S, Nishimura M. Down-regulated NF-E2-related factor 2 in pulmonary macrophages of aged smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008 Dec;39(6):673-82. doi: 10.1165/rcmb.2007-0424OC. Epub 2008 Jun 19.
75. Homma S1, Ishii Y, Morishima Y, Yamadori T, Matsuno Y, Haraguchi N, Kikuchi N, Satoh H, Sakamoto T, Hizawa N, Itoh K, Yamamoto M. Nrf2 enhances cell proliferation and resistance to anticancer drugs in human lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2009 May 15;15(10):3423-32. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2822. Epub 2009 May 5.
76. Soona Shin, Nobunao Wakabayashi, Vikas Misra, Shyam Biswal, Gum Hwa Lee, Elin S. Agoston, Masayuki Yamamoto, Thomas W. Kensler. NRF2 Modulates Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling: Influence on Adipogenesis. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, Oct. 2007, p. 7188 - 7197
77. Pillarisetti S: A Review of Sirt1 and Sirt1 Modulators in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery* 2008, 3:156-164.
78. Vaziri H1, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, Guarente L, Weinberg RA. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell.* 2001 Oct 19;107(2):149-59.
79. Luo J1, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L, Gu W. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell.* 2001 Oct 19;107(2):137-48.
80. Bouras T1, Fu M, Sauve AA, Wang F, Quong AA, Perkins ND, Hay RT, Gu W, Pestell RG. SIRT1 deacetylation and repression of p300 involves lysine residues 1020/1024 within the cell cycle regulatory domain 1. *J Biol Chem.* 2005 Mar 18;280(11):10264-76. Epub 2005 Jan 4.
81. Brunet A1, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedry

- chowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*. 2004 Mar 26;303(5666):2011-5. Epub 2004 Feb 19.
82. Motta MC1, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, Bulsma Y, McBurney M, Guarente L. Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell*. 2004 Feb 20;116(4):551-63.
83. Picard F1, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, McBurney MW, Guarente L. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature*. 2004 Jun 17;429(6993):771-6. Epub 2004 Jun 2.
84. Rodgers JT1, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature*. 2005 Mar 3;434(7029):113-8.
85. Purushotham A, Schug TT, Xu Q, Surapureddi S, Guo X, Li X: Hepatocyte-Specific Deletion of SIRT1 Alters Fatty Acid Metabolism and Results in Hepatic Steatosis and Inflammation. *Cell Metabolism* 2009, 9:327-338
86. Bordone L, Motta MC, Picard F, Robinson A, Jhala US, Apfeld J, McDonagh T, Lemieux M, McBurney M, Szilvasi A, Easlson EJ, Lin SJ, Guarente L: Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol* 2006, 4:e31.
87. Esterbauer H, Oberkofler H, Krempler F, Patsch W (Feb 2000). "Human peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 (PPARGC1) gene: cDNA sequence, genomic organization, chromosomal localization, and tissue expression". *Genomics*. 62 (1): 98 - 102.
88. Pollard KS, Salama SR, Lambert N, Lambot MA, Coppens S, Pedersen JS, Katzman S, King B, Onodera C, Siepel A, Kern AD, Dehay C, Igel H, Ares M, Vanderhaeghen P, Haussler D (September 2006). "An RNA gene expressed during cortical development evolved rapidly i

- n humans". *Nature*. 443 (7108): 167 - 72.
89. Valero T (2014). "Mitochondrial biogenesis: pharmacological approaches". *Curr. Pharm. Des.* 20 (35): 5507 - 9.
 90. Sanchis-Gomar F, García-Giménez JL, Gómez-Cabrera MC, Pallardó FV (2014). "Mitochondrial biogenesis in health and disease. Molecular and therapeutic approaches". *Curr. Pharm. Des.* 20 (35): 5619 - 5633.
 91. Dorn GW, Vega RB, Kelly DP (2015). "Mitochondrial biogenesis and dynamics in the developing and diseased heart". *Genes Dev.* 29 (19): 1981 - 91.
 92. Katalin Sas, Elza Szabó, and László Vécsei. Mitochondria, Oxidative Stress and the Kynurenine System, with a Focus on Ageing and Neuroprotection. *Molecules*. 2018 Jan : 23(1): 191
 93. Roberts LD, Boström P, O'Sullivan JF, Schinzel RT, Lewis GD, Dejam A, Lee YK, Palma MJ, Calhoun S, Georgiadi A, Chen MH, Ramachandran VS, Larson MG, Bouchard C, Rankinen T, Souza AL, Clish CB, Wang TJ, Estall JL, Soukas AA, Cowan CA, Spiegelman BM, Gerszten RE (2014). " β -Aminoisobutyric acid induces browning of white fat and hepatic β -oxidation and is inversely correlated with cardiometabolic risk factors". *Cell Metabolism*. 19 (1): 96 - 108.
 94. Azzu V1, Brand MD. The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. *Trends Biochem Sci*. 2010 May;35(5):298-307. doi: 10.1016/j.tibs.2009.11.001. Epub 2009 Dec 16.
 95. Wu J1, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, van Marken Lichtenbelt WD, Hoeks J, Enerbäck S, Schrauwen P, Spiegelman BM. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012 Jul 20;150(2):366-76. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.016. Epub 2012 Jul 12.
 96. Brondani LA1, Assmann TS, Duarte GC, Gross JL, Canani LH, Crisp

- im D. The role of the uncoupling protein 1 (UCP1) on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2012 Jun;56(4):215-25.
97. Kanki T1, Ohgaki K, Gaspari M, Gustafsson CM, Fukuoh A, Sasaki N, Hamasaki N, Kang D. Architectural role of mitochondrial transcription factor A in maintenance of human mitochondrial DNA. *Mol Cell Biol.* 2004 Nov;24(22):9823-34.
 98. Kang D1, Kim SH, Hamasaki N. Mitochondrial transcription factor A (TFAM): roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. *Mitochondrion.* 2007 Feb-Apr;7(1-2):39-44. Epub 2006 Dec 8.
 99. Watanabe A1, Arai M, Koitabashi N, Niwano K, Ohyama Y, Yamada Y, Kato N, Kurabayashi M. Mitochondrial transcription factors TFAM and TFB2M regulate Serca2 gene transcription. *Cardiovasc Res.* 2011 Apr 1;90(1):57-67. doi: 10.1093/cvr/cvq374. Epub 2010 Nov 26.
 100. Kim, J.B., Spiegelman, B.M. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Gene & Development* 10: 1096-1107, 1996.
 101. Nagy TR, Blaylock ML, Garvey WT. Role of UCP2 and UCP3 in nutrition and obesity. *Nutrition.* 2004 Jan;20(1):139-44.
 102. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommelrig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, Teule GJ. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med.* 2009 Apr 9;360(15):1500-8. doi: 10.1056/NEJMoa0808718.
 103. Celi FS. Brown adipose tissue-when it pays to be inefficient. *N Engl J Med.* 2009 Apr 9;360(15):1553-6. doi: 10.1056/NEJMe0900466.
 104. Palou A, Picó C, Bonet ML, Oliver P. The uncoupling protein, thermogenin. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998 Jan;30(1):7-11.
 105. Yu M1, Zhou Y, Shi Y, Ning L, Yang Y, Wei X, Zhang N, Hao X, Niu R. Reduced mitochondrial DNA copy number is correlated with

- tumor progression and prognosis in Chinese breast cancer patients. *IUBMB Life*. 2007 Jul;59(7):450-7.
106. Karamanlidis G1, Nascimben L, Couper GS, Shekar PS, del Monte F, Tian R. Defective DNA replication impairs mitochondrial biogenesis in human failing hearts. *Circ Res*. 2010 May 14;106(9):1541-8. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.212753. Epub 2010 Mar 2
 107. Attele AS, Wu JA, Yuan CS. Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions. *Biochem Pharmacol*. 1999 Dec 1;58(11):1685-93.
 108. Chang & Sung 2006. The Effect of Ginseng and Caffeine Products on the Antioxidative Activities of Mouse Kidney. *Journal of Ginseng Research*, 30(1),15
 109. Zeuske, D. ; Weber, H. C. Growth stimulation of *Panax ginseng* C. A. Meyer (Araliaceae) arising from AMF-isolate inoculation. *Symbiosis (Rehovot)* 2000 Vol.29 No.3 pp.213-230 ref.31
 110. Choi, S.-H., Yang, K.-J., & Lee, D.-S. (2016). Effects of complementary combination therapy of Korean Red Ginseng and antiviral agents in chronic hepatitis B. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 22(12), 964-969.
 111. 남기열. 홍삼과 백삼의 비교 고찰. *고려인삼학회지*. 2005. 29, 1-18
 112. Wang, W.-N., Yan, B.-X., Xu, W.-D., Qiu, Y., Guo, Y.-L., & Qiu, Z.-D. (2015). Highly selective bioconversion of ginsenoside Rb1 to compound K by the mycelium of *Cordyceps sinensis* under optimized conditions. *Molecules*, 20(10), 19291-19309.
 113. Kim EH, Lee MJ, Kim IH, Pyo SN, Choi KT, Rhee DK (2010). Anti-apoptotic Effects of Red Ginseng on Oxidative stress Induced by Hydrogen peroxide in SK-N-SH Cells. *J. Ginseng Res* vol 34, No2 138-144
 114. Matsuda, H., *Natural Med*. 1999, 53, 217.

115. Park, J.; Lee, K.Y.; Oh, Y.J.; Kim, K.W.; Lee, S.K., *Cancer letters*. 1997, 121, 73.
116. Kim, K.Y.; Shin, J.K.; Lee, S.W.; Yoon, S.R.; Chung, H.S.; Jeong, Y. J.; Choi, M.S.; Lee, C.M.; Moon, K.D.; Kwon, J.H., *Korean J. Food Sci. Technol.*, 2007, 39, 494-499.
117. Nam KY (2005). The comparative understanding between red ginsengs and white ginsengs, processed ginsengs (*Panax ginseng* C.A. Meyer), *J. Ginseng Res.* vol. 29, No. 1, 1-18
118. Yun TK, Lee YS; Lee YH; Kim SI; Yun HY (2001). "Anticarcinogenic effect of *Panax ginseng* C.A. Meyer and identification of active compounds.". 《*Journal of Korean Medical Science*》 16 (S): 6 - 18. PMID 11748383.
119. Yoon SR (2010). Optimization of heat processing conditions for improving the functional components and physiological properties of ginseng(*Panax ginseng* C. A. Meyer). Ph. D. Thesis Kyngpook National University. p.1-155.
120. Li X, Han JS, Park YJ, Kang SJ, Kim JS, Nam KY, Lee KT and Choi JE. (2009). Extracting conditions for promoting ginsenoside contents and taste of red ginseng water extract. *Journal of Crop Science*. 54:287-293.
121. Han JS, Li X, Park YJ, Kang SJ, Kim JS, Nam KY, Lee KT and Choi JE. (2009). Saponin content and quality for the promotion of white ginseng water extraction conditions. *Journal of Crop Science*. 54:458-463.
122. Choi WY, Lee CG, Song CH, Seo YC, Kim JS, Kim BH, Shin DH, Yoon CS, Lim HW and Lee HY. (2012). Enhancement of low molecular ginsenoside contents in low quality fresh ginseng by fermentation process. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 20:117-123.
123. Kim HS, Lee EH, Ko SR, Choi KJ, Park JH and Im DS. (2004). Eff

- ects of ginsenosides Rg3 and Rh2 on the proliferation of prostate cancer cells. *Archives of Pharmacal Research*. 27:429-435.
124. Bae KC and Kim SH. (1998). Antioxidant effects of Korea ginseng radix, Korea red ginseng radix and total saponin. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology*. 12:72-81.
 125. Kang SY and Kim ND. (1992). The antihypertensive effect of red ginseng saponin and the endothelium-derived vascular relaxation. *Journal of Ginseng Research*. 16:175-182.
 126. Yokozawa T, Kobayashi T, Oura H and Kawashima Y. (1985). Studies on the mechanism of the hypoglycemic activity of ginsenoside-Rb2 in streptozotocin-diabetic rats. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 33:869-872.
 127. Lee MR, Sun BS, Gu LJ, Wang CY, Mo EK, Yang SA, Ly SY and Sung CK. (2008). Effects of white ginseng and red ginseng extract on learning performance and acetylcholinesterase activity inhibition. *Journal of Ginseng Research*. 32:341-346.
 128. Jeong DW, Moon SK, Hong JW, Shin JW, Park YM, Jung JH, Kim CH, Min IK, Park SU, Jung WS, Park JM, Go CN, Cho KH, Kim Y S and Bae HS. (2006). Effects of Korean ginseng, Korean red ginseng and fermented Korean red ginseng on cerebral blood flow, cerebrovascular reactivity, systemic blood pressure and pulse rate in humans. *Journals of the Korean Oriental Medical Society* 27:38-50.
 129. Shin, C.S.; Lee, D.H.; Kim, S.H.; Shin, M.H.; Jeong, C.H.; Shin, K. H., *J. Agric. Life Sci.* 2010, 44, 133.
 130. Kwon Han, SW., SB, Park IH, Kim JM, Park MK, Park JH: Liquid chromatographic determination of less polar ginsenosides in processed ginseng. *J Chromatogr A* 2001 , 921:335-339.
 131. Wang, P., Wei, Y., Fan, Y., Liu, Q., Wei, W., Yang, C., et al. (2015). Production of bioactive ginsenosides Rh2 and Rg3 by metabolically e

- engineered yeasts. *Metab. Eng.* 29, 97–105. doi: 10.1016/j.ymben.2015.03.003
132. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 1965, 16, 144 - 158.
133. Moreno, M.I.; Isla, M.I.; Sampietro, A.R.; Vattuone, M.A. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. Ethnopharmacol.* 2000, 71, 109 - 114.
134. A Moon and W J Rhead. Complementation analysis of fatty acid oxidation disorders. *JCI* First published January 1, 1987 - More info
135. Olpin, S.E.; Manning, N.J.; Pollitt, R.J.; Clarke, S. Improved detection of long-chain fatty acid oxidation defects in intact cells using [9,10-³H] oleic acid. *J. Inher. Metab. Dis.* 1997, 20, 415 - 419.
136. Kang, I.; Kim, Y.; Tomas-Barberan, F.A.; Espin, J.C.; Chung, S. Urolithin A, C, and D, but not iso-urolithin A and urolithin B, attenuate triglyceride accumulation in human cultures of adipocytes and hepatocytes. *Mol. Nutr. Food Res.* 2016, 60, 1129–1138.
137. Schilling J, Kelly DP (2011) The PGC-1 cascade as a therapeutic target for heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 51: 578 - 583. pmid:20888832
138. Sundaresan NR, Pillai VB, Gupta MP (2011) Emerging roles of SIRT1 deacetylase in regulating cardiomyocyte survival and hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 51: 614 - 618. pmid:21276800
139. Shane Austin and Julie St-Pierre (2002). PGC1a and mitochondrial metabolism - emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *Journal of Cell Science* 125, 4963 - 4971
140. Emilie E, Vomhof-DeKrey, Matthew J, Picklo Sr. The Nrf2-antioxidant response element pathway: a target for regulating energy metabolism. *The Journal of Nutritional Biochemistry* Volume 23, Issue 10, October 2012, Pages 1201–1206

141. Fei Yin, Alberto Boveris, and Enrique Cadenas. Mitochondrial Energy Metabolism and Redox Signaling in Brain Aging and Neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Jan 10; 20(2): 353 - 371.
142. Schneider, Kevin Scot. Functional analysis of Nrf1 and Nrf2 transcription factors in adipose tissue. 2016 UC Irvine.
143. Jia-HeWang, Jian-Fei Nao, Meng Zhang, Ping He. 20(s)-ginsenoside Rg3 promotes apoptosis in human ovarian cancer HO-8910 cells through PI3K/Akt and XIAP pathways. 2014 *Tumor Biol*
144. 이진봉. 비만모델에서 Rg3에 의한 지방세포의 지질 생합성 감소 연구. 과학기술연합대학원대학교
145. Kendig EL, Chen Y, Krishan M, Johansson E, Schneider SN, Genter MB, Nebert DW, Shertzer HG. (2011) Lipid metabolism and body composition in *Gclm* (-/-) mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 257, 338-48
146. Peng Xue, Yongyong Hou, Yanyan Chen, Bei Yang, Jingqi Fu, Hongzhi Zheng, Kathy Yarborough, Courtney G. Woods, Dianxin Liu, Masayuki Yamamoto, Qiang Zhang, Melvin E. Andersen and Jingbo Pi. Adipose Deficiency of Nrf2 in *ob/ob* Mice Results in Severe Metabolic Syndrome. *Diabetes* 2013 Mar; 62(3): 845-854.
147. Kevin Schneider, Joshua Valdez, Janice Nguyen, Marquis Vawter, Brandi Galke, Theodore W. Kurtz and Jefferson Y. Chan. Increased Energy Expenditure, *Ucp1* Expression, and Resistance to Diet-induced Obesity in Mice Lacking Nuclear Factor-Erythroid-2-related Transcription Factor-2 (Nrf2). *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* VOL. 291, NO. 14, pp. 7754 - 7766, April 1, 2016

<국문 초록>

Ginsenoside Rg3의 지방형성 억제 효과 및 관련기전 연구

高 賢 娥

濟州大學校 大學院 食品營養學科

指導教授 姜 仁 慧

진세노사이드 Rg3는 항암, 항염증, 항당뇨, 항비만등 광범위한 약리학적 활성을 가지는 것으로 보고되었다. 그러나, 진세노사이드 Rg3의 항비만 효과에 대한 연구, 그리고 Rg3의 미토콘드리아 활성 증가에 따른 갈색지방화 기전에 대한 연구는 아직 부족한 실정이다. 그래서 우리는 이러한 문제를 해결하기 위해 진세노사이드 Rg3를 지방 세포 분화과정에서 3T3-L1 세포에 처치하였다.

Rg3(60 μ M)는 지질 축적을 억제하여 지방생성 단백질의 수준을 감소시키고, PPAR, aP2, C/EBP의 활성화로 유전자 발현을 감소시킴으로써 지방 생성을 상당히 감소시켰다. 또한, mitochondrial biogenesis 와 에너지 대사와 연관이 있는 PGC1 α , Nrf2, SIRT1에서 유전자 발현을 유의하게 증가시켰다. 다음으로, Rg3가 성숙한 지방세포에서의 지방 생성을 억제 할 수 있는지 조사했다. Rg3가 지질 축적을 현저히 감소시키는 것을 ORO를 확인할 수 있었고, 반면, 방사능 함유 배지를 사용하여 [³H]-OA의 [³H]-H₂O로의 전환율을 측정하여 성숙한 3T3-L1 지방 세포에서 Rg3에 의한 지방산 산화의 상향 조절을 확인하였다. 인간 간암 세포주 HepG2 세포에서도 같은 결과를 확인하였다. 또한, Rg3는 지방 세포에서 미토콘드리아 산소 소비율 (OCR), 특히 최대 호흡을 향상시켰다.

마지막으로, Rg3의 LPS로 유도된 갈색지방화와 mt DNA 억제 회복 효과를

조사했다. Rg3가 Bt2-cAMP와의 배양에서 갈색지방화와 연관이 있는 유전자 발현에서 유의하게 증가하지 않았다. 그러나 흥미로운 사실은 LPS를 처치하여 염증을 유도했을 때, Rg3의 처치가 Bt2-cAMP와 연결하여 UCP1, PGC1 α 발현 수준을 Bt2-cAMP 단독 처치에 의해 유발된 발현 수준 이상으로 증가시킨다는 것을 보여 주었다. 또한, LPS를 처치한 Rg3는 지방세포에서 미토콘드리아 산소 소비율 (OCR), 특히 최대 호흡을 유의하게 향상시켰다. 단백질 발현에서는 Rg3의 처치 여부에 따라서 AMPK, UCP1, TFAM의 활성이 증가되는 것을 볼 수 있었다. 이러한 결과에 따른 Rg3와 mitochondria DNA 증가와의 연관성을 Immunostaining을 통해 조사하였다. Rg3를 처치했을 때, mtDNA (Mitochondrial DNA)의 활성이 증가되는 것을 확인 할 수 있었다.

결론적으로, Rg3는 지방산 산화 증가 및 미토콘드리아 활성 증가를 통한 지방세포 형성 억제에 효과적이다.